

**Estudio de proteínas que unen ácidos grasos  
(FABPs) de *Echinococcus* spp.**

Lic. Jorge Luis Pórfido

Directora: Dra. Betina Córscico

Codirectora: Dra. Adriana Esteves





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudio de proteínas que unen ácidos grasos  
(FABPs) de *Echinococcus* spp.**

---

Jorge Luis Pórfido

Directora: Dra. Betina Córscico

Co-directora: Dra. Adriana Esteves

2015

El presente trabajo de tesis, que lleva por título “Estudio de proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) de *Echinococcus* spp.”, se realizó para optar al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

El mismo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), instituto que pertenece a la UNLP y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ubicado en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). También se realizó una estadía de tres meses en el Instituto de Higiene y Microbiología de la Universidad de Wurzburg (Alemania).

Este trabajo contó con la dirección de la Dra. Betina Córscico (Investigadora Independiente, CONICET; Prof. Titular, Departamento Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Argentina) y la co-dirección de la Dra. Adriana Esteves (Prof. Adjunta, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay).

Para su realización se recibió el apoyo financiero del CONICET mediante las Becas Internas de Posgrado Tipo I (2009-2012) y Tipo II (2012-2014), y del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP a través del Programa de Retención de Recursos Humanos (2014-2015). Por otra parte, la estadía en la Universidad de Wurzburg fue financiada mediante una beca *EMBO Short Term Fellowship* de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO). El trabajo experimental se llevó a cabo mediante financiación de la organización *Wellcome Trust* (WT N° 083625, Reino Unido), de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT N° 2010/2252, Argentina) y de la UNLP (Proyecto Acreditado M152).

## AGRADECIMIENTOS

A Betina, por todo lo aprendido junto a ella durante todo este tiempo. Por haberme sumado al equipo del *Laboratorio 10*, del que espero seguir siendo parte aun cuando mi camino tome otro rumbo. Por todos los buenos momentos compartidos. Por las dificultades que hemos podido superar juntos, que siempre nos han dejado alguna enseñanza. Por haber depositado en mí su confianza.

A Adriana, por compartir conmigo la posibilidad de estudiar el complejo e interesante mundo de las FABPs de *Echinococcus*.

A todos mis compañeros y amigos del *Lab 10*, con los que he compartido todos estos años. Por su compañerismo y disposición para trabajar en equipo. Por crear un buen ambiente de trabajo, aun cuando el espacio escaseara. Por aprender juntos a disfrutar los buenos momentos, y a tirar todos para un mismo lado cuando las situaciones así lo requirieran. A Gise, por su invaluable apoyo durante mi doctorado. Por haber sido una excelente guía en el trabajo y la vida diaria del laboratorio. Por su inmensa generosidad. Por su predisposición incondicional para ayudarme en lo que necesitara. Y obviamente, por todas sus ocurrencias que me han hecho reír mucho. A Lisandro, que me acercó al *Lab 10*, por sus sugerencias y observaciones, por tener siempre presente todas las posibilidades de becas, cursos, congresos y oportunidades para cada uno de nosotros. A Edu, que me ayudó a dar mis primeros pasos en la biología molecular, y que ilustró nuestros días con sus dibujos y caricaturas, siempre cargadas de muy buen humor. A Xime, por sus enseñanzas al comienzo de mi doctorado. A Mari y Flor, por tantos momentos compartidos junto a ellas. Por haber ido descubriendo juntos el complejo mundo de la parasitología, y ayudándonos mutuamente a superar los obstáculos que se nos fueran presentando. A Lu, por todas las aventuras compartidas. Por sus ocurrencias y anécdotas diarias, por haber ido creciendo juntos en la facultad, en el laboratorio, en la docencia. A Nati B., por su excelente predisposición para colaborar en todo, por su frescura y buen humor, por sus miradas cómplices y gestos divertidos. A Nati S., por compartir su experiencia conmigo y haberme ayudado a no bajar los brazos durante la etapa de escritura de la tesis. A Juli, con quien compartí mis últimos tiempos de trabajo experimental, y que continuará con parte del trabajo relacionado con las FABPs de *Echinococcus*, por su buena onda y compañerismo. A las nuevas generaciones que se han incorporado al laboratorio y con los cuales he compartido las últimas etapas de mi tesis.

A la gente del INIBIOLP, por su apoyo y compañerismo. En especial a Annie, Juan Pablo, Martín, Lucía, Margarita, Boris, Nela y Sandra, con quienes he compartido buenos momentos, dentro y fuera del laboratorio. A Martín le agradezco también su ayuda con el trabajo con lípidos y a Juan Pablo su colaboración con el tema de lípidos y de las imágenes de microscopía. A Mabel y Ana Laura, por su ayuda y buena predisposición. A Mario, por su voluntad para ayudar en todo lo que hiciera falta, y por las excelentes figuras que ha hecho tanto para la tesis como para los capítulos del libro.

A la Dra. Gabriela Alvite, con quien compartí el estudio de EgFABP1.

Al Dr. Klaus Brehm y la gente de su laboratorio, por haberme dado la posibilidad de ir a trabajar y aprender con ellos. Especialmente a Uriel, Ferenc y Monika, que me ayudaron mucho durante mi estadía allí.

A la Dra. Mara Rosenzvit y sus estudiantes, que me han guiado en muchos aspectos relacionados con *Echinococcus* spp. Muy especialmente a Marce, con quien compartí también parte de mi estadía en Alemania, a Fede, a Lucas y a Laura K.

A la Dra. Ana María Ferreira, por las valiosas charlas que hemos compartido. Por su calidez y generosidad. A la gente de su laboratorio. En especial a María y Maite, por su buena onda y humor. A Maite también le agradezco el haber compartido conmigo sus datos de proteómica de *Echinococcus*.

A los Dres. Malcolm W. Kennedy y Alan Cooper, por su colaboración con el análisis de los experimentos de unión a ligandos y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. José María Delfino, por permitirnos acceder al equipo de difracción circular.

A Agus y Nacho, por su ayuda con las carátulas aún después de un largo día de estudio.

A mis compañeros de docencia. A los de la cátedra de Biología, con quienes di mis primeros pasos, y a los de Bioquímica 2 y 3, con quienes he compartido los últimos años. A todos muchas gracias por todo lo aprendido y los buenos momentos compartidos.

A mis amigos. Por su apoyo y generosidad. Por acompañarme en las buenas y en las malas. Por saber perdonar que a veces sea un poco colgado. Por seguir creciendo juntos. A los *Viejitos*: Boris, Cin, Clari, Mancho, Mari, Mauri, Ro y Sabri. Por todas las aventuras compartidas. Por nuestras apasionadas discusiones que siempre terminan en risas. A Andre, por todos estos años compartidos. Por su confianza. Por ayudarme a seguir adelante.

A mis padres. Porque todo ha sido posible gracias a ellos. Por enseñarme a soñar y a seguir mis convicciones. Por mostrarme, con su ejemplo, que con esfuerzo y dedicación todo es posible. Por darme libertad para elegir, y la responsabilidad de hacerme cargo de mis elecciones. Por acompañarme en todo momento.

A mis hermanos, Santi y Nacho. Porque son las personas con las que más he compartido mi vida. Por los años compartidos en La Plata. Por haberme aguantado y acompañado durante todos los vaivenes por los que he pasado. Por sus palabras de aliento. Por los consejos que cada uno, según su visión, me han dado. Por sus locuras y payasadas, que siempre logran hacerme reír sin importar cuánto intente mantener la compostura.

A mis abuelos y mi abuela honoraria, Tali. Por creer en mí y acompañarme siempre, los que están y los que ya no. Porque todo es más fácil cuando se está “sobre hombros de gigantes”.

A Val. Por ser mi gran compañera, mi guía y mi sostén. Por ayudarme a no aflojar. Por su generosidad. Por elegir seguir transitando juntos el camino. Juntos, a la par.

A todos, ¡muchísimas gracias!

## PUBLICACIONES DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE DOCTORADO

### *Relacionadas con esta tesis:*

**Jorge L. Pórfido\***, Gabriela Alvite\*, Valeria Silva, Malcolm W. Kennedy, Adriana Esteves, Betina Corsico. Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(11): e1893.

Gisela Raquel Franchini, Betina Córscico, **Jorge L. Pórfido**, Valeria Silva, Marina Ibañez Shimabukuro, Florencia Rey Burusco. Análisis Estructural y Funcional de Proteínas Solubles que Unen Lípidos de Parásitos Helmintos. Acta Bioquím Clín Latinoam 2013; 47 (2).

Gisela Raquel Franchini; **Jorge L. Pórfido**; Marina Ibañez Shimabukuro; Maria F. Rey Burusco; Julián A. Bélgamo; Brian O. Smith; Malcolm W. Kennedy; Betina Córscico. The unusual lipid binding proteins of parasitic helminths and their potential roles in parasitism and as therapeutic targets. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2015; 93:31-6.

### *No presentadas en esta tesis:*

Valeria Silva-Álvarez, Gisela R. Franchini, **Jorge L. Pórfido**, Malcolm W. Kennedy, Ana M. Ferreira, Betina Córscico. Lipid-free Antigen B Subunits from *Echinococcus granulosus*: Oligomerization, ligand binding, and membrane interaction properties. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(3):e0003552.

### *Capítulos de Libros:*

Valeria Silva, **Jorge L. Pórfido**. Interacción de lípidos con el agua y formación de estructuras empaquetadas. (2013). Análisis estructural y funcional de Macromoléculas. ISBN 978-950-34-1057-8. Capítulo 8. Pág.199-226. Ed. EDULP. Colección Libros de Cátedra, UNLP.

**Jorge L. Pórfido**, Valeria Silva. Interacción lípido-proteína. (2013). Análisis estructural y funcional de Macromoléculas. ISBN 978-950-34-1057-8. Capítulo 9. Pág. 227-258. Ed. EDULP. Colección Libros de Cátedra, UNLP.

## INDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>1.1. Parasitismo</b>	6
1.1.1. Clases de parásitos	6
1.1.2. Características del parasitismo	7
<b>1.2. Cestodos</b>	9
<b>1.3. Género <i>Echinococcus</i></b>	11
1.3.1. Ciclo de vida de <i>Echinococcus</i> spp.	12
1.3.2. Especies pertenecientes al género <i>Echinococcus</i>	13
1.3.3. Morfología de <i>Echinococcus</i> spp.	15
1.3.3.1. Adulto	16
1.3.3.2. Huevo	18
1.3.3.3. Metacestodo	19
1.3.3.4. Protoescólex	22
1.3.4. Distribución geográfica de la hidatidosis	23
1.3.5. Importancia de la hidatidosis quística en nuestra región	25
1.3.6. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis	28
<b>1.4. Metabolismo de <i>Echinococcus</i> spp. y otros cestodos</b>	30
1.4.1. Metabolismo general y obtención de energía	30
1.4.2. Metabolismo de lípidos	32
<b>1.5. Proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBPs)</b>	34
<b>1.6. Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs)</b>	37
1.6.1. FABPs en invertebrados	42
1.6.1.1. FABPs en <i>Echinococcus</i> spp.	44
<b>1.7. Hipótesis y objetivos</b>	47
1.7.1. Hipótesis general	47
1.7.2. Objetivo general	47
1.7.3. Objetivos específicos	48
1.7.3.1. Subclonado y purificación de EgFABP1	48
1.7.3.2. Análisis de la interacción de EgFABP1 con ligandos	48
1.7.3.3. Análisis de la interacción de EgFABP1 con membranas	48
1.7.3.4. Identificación y análisis de FABPs de <i>E. multilocularis</i>	49
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	50
<b>2.1. Subclonado y purificación de EgFABP1</b>	50
2.1.1. Subclonado de EgFABP1	50
2.1.1.1. Extracción y purificación de ADN plasmídico (miniprep)	50
2.1.1.2. Diseño de los primers específicos para EgFABP1	50
2.1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la secuencia codificante del gen <i>egfabp1</i>	51
2.1.1.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción	51
2.1.1.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	52



2.1.1.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	52
2.1.1.7. Desfosforilación de los extremos 5'	53
2.1.1.8. Ligación	53
2.1.1.9. Preparación de bacterias competentes	53
2.1.1.10. Transformación de bacterias competentes por <i>shock</i> térmico	54
2.1.2. Purificación de EgFABP1	55
2.1.2.1. <i>Screening</i> de expresión de proteínas recombinantes	55
2.1.2.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	55
2.1.2.3. Expresión y Purificación de EgFABP1	56
2.1.2.4. Cuantificación de EgFABP1 purificada	57
2.1.3. Control de la integridad estructural de EgFABP1	58
2.1.3.1. Análisis por cromatografía de exclusión molecular	58
2.1.3.2. Análisis por dicroísmo circular	58
<b>2.2. Análisis de la interacción de EgFABP1 con ligandos</b>	<b>59</b>
2.2.1. Análisis de lípidos de <i>Escherichia coli</i> unidos a EgFABP1 recombinante	59
2.2.1.1. Extracción de los lípidos con solventes orgánicos	59
2.2.1.2. Cromatografía en capa fina	59
2.2.1.3. Cromatografía gas-líquido	60
2.2.2. Análisis de la interacción con ligandos por proteólisis parcial de EgFABP1	60
2.2.2.1. Digestión parcial de EgFABP1 empleando la proteasa ArgC	60
2.2.2.2. Análisis por electroforesis Tricina-SDS-PAGE	61
2.2.3. Análisis por dicroísmo circular de la interacción de EgFABP1 con ácidos grasos	61
2.2.4. Análisis de la interacción de EgFABP1 con análogos fluorescentes de ácidos grasos	62
<b>2.3. Análisis de la interacción de EgFABP1 con membranas</b>	<b>63</b>
2.3.1. Preparación de vesículas unilamelares pequeñas	63
2.3.2. Determinación del coeficiente de partición ( $K_P$ ) de 12AS entre EgFABP1 y SUVs	64
2.3.3. Determinación de la velocidad de transferencia de 12AS desde EgFABP1 a SUVs	65
2.3.4. Determinación de la unión de EgFABP1 a SUVs por competencia con citocromo c	66
<b>2.4. Identificación y análisis de FABPs de <i>E. multilocularis</i></b>	<b>66</b>
2.4.1. Análisis bioinformático del genoma de <i>E. multilocularis</i>	66
2.4.2. Diseño de siRNAs contra EmFABP1 y EmFABP2	67
2.4.3. Obtención, aislamiento y cultivo de células de <i>E. multilocularis</i>	67
2.4.4. Electroporación de células de <i>E. multilocularis</i>	69
2.4.5. Monitoreo de los niveles de expresión de las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	69
2.4.5.1. Extracción de proteínas	69

2.4.5.2.	SDS-PAGE/Western Blot	70
2.4.5.3.	Extracción de ARN	70
2.4.5.4.	Síntesis de cDNA	71
2.4.5.5.	RT-PCR semicuantitativa	72
2.4.6.	Clonado y caracterización de FABPs de <i>E. multilocularis</i>	72
2.4.6.1.	Clonado de las secuencias codificantes de las diferentes EmFABPs	72
2.4.6.2.	Caracterización bioinformática de las secuencias proteicas de las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	74
2.4.6.3.	Caracterización bioinformática de los genes de las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	74
2.4.6.4.	Predicción de FABPs en <i>E. granulosus</i> y comparación con las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	74
2.4.6.5.	Análisis de la expresión de FABPs en <i>E. multilocularis</i>	75
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	76
<b>3.1.</b>	<b>Subclonado y purificación de EgFABP1</b>	76
3.1.1.	Subclonado de EgFABP1	76
3.1.2.	Purificación de EgFABP1	79
3.1.3.	Control de la integridad estructural de EgFABP1	85
<b>3.2.</b>	<b>Análisis de la interacción de EgFABP1 con ligandos</b>	87
3.2.1.	Análisis de lípidos de <i>Escherichia coli</i> unidos a EgFABP1 recombinante	87
3.2.2.	Análisis de la interacción con ligandos por proteólisis parcial de EgFABP1	89
3.2.3.	Análisis por dicroísmo circular de la interacción de EgFABP1 con ácidos grasos	90
3.2.4.	Análisis de la interacción de EgFABP1 con análogos fluorescentes de ácidos grasos	92
<b>3.3.</b>	<b>Análisis de la interacción de EgFABP1 con membranas</b>	95
3.3.1.	Determinación del coeficiente de partición ( $K_P$ ) de 12AS entre EgFABP1 y SUVs	95
3.3.2.	Transferencia de análogos fluorescentes de ácidos grasos desde EgFABP1 hacia vesículas unilamelares pequeñas.	96
3.3.3.	Determinación de la unión de EgFABP1 a SUVs por competencia con Citocromo c	101
<b>3.4.</b>	<b>Identificación y análisis de FABPs de <i>E. multilocularis</i></b>	102
3.4.1.	Ensayos de silenciamiento en células de <i>E. multilocularis</i>	104
3.4.2.	Clonado y caracterización de las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	108
3.4.2.1.	Clonado de las secuencias codificantes de las diferentes EmFABPs	108
3.4.2.2.	Caracterización bioinformática de las secuencias proteicas de las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	110
3.4.2.3.	Caracterización bioinformática de los genes de las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	119
3.4.2.4.	Predicción de FABPs en <i>E. granulosus</i> y comparación con las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	125



## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla I-1.</b> Taxonomía del género <i>Echinococcus</i> .	15
<b>Tabla I-2.</b> Nomenclatura y localización de las FABPs de humanos	39
<b>Tabla R-1.</b> Deslipidización de EgFABP1	82
<b>Tabla R-2.</b> Datos de las secuencias predichas para FABPs en <i>E. multilocularis</i>	108
<b>Tabla R-3.</b> Análisis de identidad de secuencias entre las diversas FABPs de <i>E. multilocularis</i>	115
<b>Tabla R-4.</b> Comparación de secuencias de las FABPs de <i>E. multilocularis</i> con la base de datos de proteínas del NCBI	118
<b>Tabla R-5.</b> Comparación de secuencias de las FABPs de <i>E. multilocularis</i> con la base de datos de proteínas de mamíferos del NCBI	118
<b>Tabla R-6.</b> Posición y tamaño de los intrones en las diferentes EmFABPs	119
<b>Tabla R-7.</b> Datos de las secuencias predichas para FABPs en <i>E. granulosus</i>	125
<b>Tabla R-8.</b> Análisis de identidad de secuencias entre las diversas FABPs de <i>E. granulosus</i>	126
<b>Tabla R-9.</b> Análisis de identidad de secuencias entre las FABPs de <i>E. granulosus</i> y <i>E. multilocularis</i>	127
<b>Figura I-1.</b> Esquema del tegumento de un cestodo adulto	11
<b>Figura I-2.</b> Esquema de los ciclos de vida de <i>E. granulosus</i> s.l. y <i>E. multilocularis</i>	12
<b>Figura I-3.</b> Adulto de <i>E. granulosus</i>	17
<b>Figura I-4.</b> Huevo de <i>E. granulosus</i>	19
<b>Figura I-5.</b> Esquema de la estructura del metacestodo	21
<b>Figura I-6.</b> Esquema de un protoescólex de <i>E. granulosus</i>	22
<b>Figura I-7.</b> Distribución geográfica de la hidatidosis quística y alveolar	24
<b>Figura I-8.</b> Principales focos de hidatidosis quística en Argentina	26
<b>Figura I-9.</b> Metabolismo lipídico en cestodos	34
<b>Figura I-10.</b> Estructura terciaria de las FABPs	40
<b>Figura I-11.</b> Posición de intrones en genes de FABPs	43
<b>Figura I-12.</b> Estructura terciaria de EgFABP1	46
<b>Figura R-1.</b> Control del inserto egfabp1 y el plásmido pET-11b digeridos.	77
<b>Figura R-2.</b> <i>Screening</i> por PCR de bacterias transformadas con plásmidos recombinantes.	78
<b>Figura R-3.</b> Chequeo de los plásmidos recombinantes por digestión con enzimas de restricción.	78
<b>Figura R-4.</b> <i>Screening</i> de expresión de EgFABP1	79
<b>Figura R-5.</b> Pasos de la purificación de EgFABP1	80
<b>Figura R-6.</b> Cromatograma correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular.	81
<b>Figura R-7.</b> SDS-PAGE de las muestras colectadas de la cromatografía de exclusión molecular.	81
<b>Figura R-8.</b> Cromatograma correspondiente a la cromatografía de interacción hidrofóbica.	82
<b>Figura R-9.</b> SDS-PAGE de la muestra obtenida luego de la cromatografía de interacción hidrofóbica.	83

<b>Figura R-10.</b> Cromatograma correspondiente a la cromatografía de intercambio iónico.	83
<b>Figura R-11.</b> Espectros de absorción de diferentes muestras de EgFABP1.	84
<b>Figura R-12.</b> Análisis por cromatografía de exclusión molecular de EgFABP1 purificada.	86
<b>Figura R-13.</b> Espectros de dicroísmo circular de EgFABP1.	87
<b>Figura R-14.</b> Análisis de lípidos de <i>E. coli</i> unidos a EgFABP1 recombinante	88
<b>Figura R-15.</b> Proteólisis parcial de EgFABP1 en sus formas apo- y unida a diferentes ligandos	90
<b>Figura R-16.</b> Espectros de dicroísmo circular de EgFABP1 en sus formas apo- y unida a diferentes ligandos	91
<b>Figura R-17.</b> Titulación fluorimétrica de 12AS con EgFABP1	93
<b>Figura R-18.</b> Titulación fluorimétrica de 16AP con EgFABP1	94
<b>Figura R-19.</b> Titulación del complejo EgFABP1-12AS con SUVs de EPC/NBD-PC	95
<b>Figura R-20.</b> Efecto de la concentración de vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de 12AS desde EgFABP1 a SUVs de EPC/NBD-PC	97
<b>Figura R-21.</b> Efecto de la carga superficial de las vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de 12AS desde EgFABP1 a SUVs	98
<b>Figura R-22.</b> Efecto de la concentración de vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de 12AS desde EgFABP1 a SUVs con carga neta negativa	99
<b>Figura R-23.</b> Efecto de la fuerza iónica del buffer sobre la velocidad de transferencia de 12AS desde EgFABP1 a SUVs con carga neta negativa	100
<b>Figura R-24.</b> Inhibición de la unión de CitC a vesículas fosfolipídicas aniónicas	102
<b>Figura R-25.</b> Agregados de células primarias de <i>E. multilocularis</i> luego de 12 días en cultivo	105
<b>Figura R-26.</b> Western Blots contra Eip y FABPs en células de <i>E. multilocularis</i> tratadas con siRNAs	106
<b>Figura R-27.</b> Niveles de expresión relativa de FABPs en células de <i>E. multilocularis</i> tratadas con siRNAs	106
<b>Figura R-28.</b> RT-PCR en células electroporadas sin siRNAs y con siRNA $\alpha$ -FABP1	107
<b>Figura R-29.</b> Digestiones con EcoRI de los plásmidos pGEM-T recombinantes	109
<b>Figura R-30.</b> Análisis de los dominios de las FABPs predichas en <i>E. multilocularis</i>	111
<b>Figura R-31.</b> Predicción de la estructura secundaria de EmFABP1	112
<b>Figura R-32.</b> Predicción de la estructura secundaria de EmFABP2	112
<b>Figura R-33.</b> Predicción de la estructura secundaria de EmFABP3	113
<b>Figura R-34.</b> Predicción de la estructura secundaria de EmFABP5	113
<b>Figura R-35.</b> Predicción de la estructura secundaria de EmFABP4	114
<b>Figura R-36.</b> Alineamiento de las secuencias de las FABPs de <i>E. multilocularis</i>	116
<b>Figura R-37.</b> Alineamiento de las secuencias de EmFABP1 y EmFABP2	116
<b>Figura R-38.</b> Alineamiento de las secuencias de EmFABP1 y EmFABP2 con cada una de las demás FABPs	117
<b>Figura R-39.</b> Esquema de la posición y tamaño de los intrones en las secuencias de aminoácidos de las EmFABPs	120

<b>Figura R-40.</b> Esquema de la posición de los genes <i>emfabp1-4</i> en el cromosoma 7 de <i>E. multilocularis</i>	121
<b>Figura R-41.</b> Esquema de la posición del gen <i>emfabp5</i> en el cromosoma 4 de <i>E. multilocularis</i>	121
<b>Figura R-42A.</b> Alineamiento de las dos copias de EmFABP1 en el genoma de <i>E. multilocularis</i>	123
<b>Figura R-42B.</b> Alineamiento de las dos copias de EmFABP1 en el genoma de <i>E. multilocularis</i>	124
<b>Figura R-43.</b> Alineamiento de las secuencias proteicas de EgFABP1 y EgFABP1.2	126
<b>Figura R-44.</b> Comparación entre las secuencias proteicas de las EmFABPs y las EgFABPs	128
<b>Figura R-45.</b> Esquema de la posición de los genes <i>emfabp2</i> , <i>emfabp1</i> y <i>emfabp1.2</i> en el scaffold_007 de la versión “Egranulosus_genome_v3” del genoma de <i>E. granulosus</i>	129
<b>Figura R-46.</b> Comparación de la secuencia de EmFABP3 con la secuencia equivalente propuesta por Y. Zheng et al. (2013)	129
<b>Figura R-47.</b> Análisis de los dominios de la proteína Emul_FABP1 predicha por Y. Zheng et al. (2013)	130
<b>Figura R-48.</b> Análisis de la expresión relativa de diferentes EmFABPs en diferentes tejidos de <i>E. multilocularis</i> .	131
<b>Figura A-1.</b> Mapa del vector pET-5a	142
<b>Figura A-2.</b> Mapa del vector pET-11a	143
<b>Figura A-3.</b> Mapa del vector pGEM-T Easy	144
<b>Figura A-4.</b> Verificación de la secuencia del inserto EgFABP1 subclonado en el plásmido pET-11b	145
<b>Figura A-5.</b> Verificación de la secuencia del inserto EmFABP1 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy	146
<b>Figura A-6.</b> Verificación de la secuencia del inserto EmFABP2 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy	146
<b>Figura A-7.</b> Verificación de la secuencia del inserto EmFABP3 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy	147
<b>Figura A-8.</b> Verificación de la secuencia del inserto EmFABP4 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy	147
<b>Figura A-9.</b> Verificación de la secuencia del inserto EmFABP5 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy	148
<b>Figura A-10.</b> Caracterización de los anticuerpos policlonales anti-EgFABP1 por <i>Western Blot</i>	152
<b>Figura A-11.</b> <i>Western Blot</i> de muestras de proteínas de <i>E. multilocularis</i> .	152
<b>Figura A-12.</b> Inmunofluorescencias <i>in toto</i> en protoescolices de <i>E. granulosus</i> .	155
<b>Figura A-13.</b> Inmunohistoquímica en cortes de vesículas de <i>E. multilocularis</i> obtenidas <i>in vitro</i> .	157

## ABREVIATURAS

°C	grado Celsius
<b>12AO</b>	ácido 12-(9-antroiloxi)-oleico
<b>12AS</b>	ácido 12-(9-antroiloxi)-esteárico
<b>16AP</b>	ácido 16-(9-antroiloxi)-palmítico
<b>2AP</b>	ácido 2-(9-antroiloxi)-palmítico
<b>AC</b>	anhidrasa carbónica
<b>Acetil-CoA</b>	acetil-coenzima A
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AEC</b>	3-amino-9-etilcarbazol
<b>AG</b>	ácidos grasos
<b>AOFA</b>	antroiloxi-ácidos grasos
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ASCT</b>	acetato:succinato CoA-transferasa
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>cDMEM</b>	medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle's</i> condicionado
<b>cDNA</b>	ADN complementario al ARN mensajero
<b>CDS</b>	secuencias codificantes (del inglés <i>coding DNA sequences</i> )
<b>CG</b>	capa germinativa
<b>CIAP</b>	fosfatasa alcalina de intestino de ternero (del inglés <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> )
<b>CitC</b>	citocromo c
<b>LL</b>	capa laminar (del inglés <i>laminated layer</i> )
<b>CL</b>	cardiolipina
<b>CRABPs</b>	proteínas celulares que unen ácido retinoico (del inglés <i>cellular retinoic acid binding proteins</i> )
<b>CRBPs</b>	proteínas celulares que unen retinol (del inglés <i>cellular retinol binding proteins</i> )
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>DPE</b>	dansil-fosfatidiletanolamina
<b>dpm</b>	desintegraciones por minuto
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EgAgB</b>	Antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i>
<b>ELISA</b>	enzimoinmunoensayo (del inglés <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> )
<b>EPC</b>	fosfatidilcolina de huevo
<b>EPE</b>	fosfatidiletanolamina de huevo
<b>FABPs</b>	proteínas que unen ácidos grasos (del inglés <i>fatty acid binding proteins</i> )
<b>FAMEs</b>	ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés <i>fatty acid methyl ester</i> )
<b>FITC</b>	isotiocianato de fluoresceína

<b>FRET</b>	transferencia de energía de resonancia de Förster (del inglés <i>Förster resonance energy transfer</i> )
<b>Fw</b>	<i>primer</i> directo (del inglés <i>forward</i> )
<b>g</b>	gramo
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente (del inglés <i>green fluorescent protein</i> )
<b>GLC</b>	cromatografía gas-líquido (del inglés <i>gas-liquid chromatography</i> )
<b>GTP</b>	guanosina trifosfato
<b>HDL</b>	lipoproteínas de alta densidad (del inglés <i>high density lipoprotein</i> )
<b>HLBPs</b>	proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (del inglés <i>hydrophobic ligand binding protein</i> )
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IPTG</b>	isopropil $\alpha$ -D-tiogalactósido
<b>K<sub>d</sub></b>	constante de disociación
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>kg</b>	kilogramo
<b>K<sub>p</sub></b>	coeficiente de partición
<b>l</b>	litro
<b>LB</b>	medio Luria Bertani
<b>LDL</b>	lipoproteínas de baja densidad (del inglés <i>low density lipoprotein</i> )
<b>LUV</b>	vesículas unilamelares grandes (del inglés <i>large unilamellar vesicles</i> )
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligramo
<b>miRNAs</b>	microRNAs
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mRNA</b>	ARN mensajero
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<b>NBD-PC</b>	N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-fosfatidilcolina
<b>nm</b>	nanómetro
<b>ON</b>	durante la noche (del inglés <i>overnight</i> )
<b>PAF</b>	paraformaldehído
<b>PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>PAIR</b>	punción, aspiración, inyección y reaspiración
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEP</b>	fosfoenolpiruvato
<b>PEPCK</b>	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (del inglés <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> )
<b>PM</b>	peso molecular
<b>PPAR</b>	receptores activados por proliferador de peroxisoma (del inglés <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
<b>PS</b>	fosfatidilserina
<b>PVDF</b>	fluoruro de polivinilideno (del inglés <i>polyvinylidene difluoride</i> )
<b>RNAi</b>	interferencia por ARN
<b>RNA-seq</b>	secuenciación de ARN



<b>RT-PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
<b>Rv</b>	<i>primer</i> reverso (del inglés <i>reverse</i> )
<b>SD</b>	desvío estándar
<b>SDS</b>	dodecilsulfato de sodio
<b>seg</b>	segundo
<b>siRNAs</b>	ARN de interferencia pequeños (del inglés <i>small interference RNAs</i> )
<b>SUVs</b>	vesículas unilamelares pequeñas (del inglés <i>small unilamellar vesicles</i> )
<b>TLC</b>	cromatografía en capa fina (del inglés <i>thin layer chromatography</i> )
<b>T<sub>M</sub></b>	temperatura de fusión (del inglés <i>melting temperature</i> )
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>Tris</b>	tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>U</b>	unidad
<b>UTR</b>	región no traducida (del inglés <i>untranslated region</i> )
<b>V</b>	voltios
<b>VLDL</b>	lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés <i>very low density lipoprotein</i> )
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranósido
<b>α-</b>	anti
<b>μg</b>	microgramo
<b>μl</b>	microlitro
<b>μM</b>	micromolar

### Medios y *Buffers*

<b>LB</b>	10g/l Triptona; 10g/l NaCl; 5g/l Extracto de Levadura
<b>PBS</b>	137mM NaCl; 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1mM NaN <sub>3</sub> ; pH 7,4
<b>TAE</b>	40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8
<b>TBE</b>	90mM Tris-Borato, 2mM EDTA, pH 8
<b>TBS</b>	40mM Tris, 100mM NaCl, pH 7,4
<b>TBST</b>	20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8
<b>TE</b>	10mM Tris-Hcl, 1mM EDTA, pH 8
<b>TEK</b>	10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; 100mM KCl; pH 7,4
<b>TFB1</b>	100mM RbCl; 50mM MnCl <sub>2</sub> ; 30mM Acetato de Potasio; 10mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glicerol; pH 5,8
<b>TFB2</b>	10mM MOPS; 10mM RbCl; 75mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glicerol; pH 8



Los cestodos del género *Echinococcus*, en particular su estadio larval o metacestodo, son los agentes patógenos responsables de las enfermedades denominadas hidatidosis o echinococcosis, de importancia tanto en la salud humana como de animales domésticos. Las especies más representativas, por su amplia distribución geográfica y el impacto que representan en la economía y la salud pública, son *E. granulosus* y *E. multilocularis*. La Organización Mundial de la Salud ha incluido a estas enfermedades dentro de un grupo prioritario de enfermedades tropicales desatendidas.

Estos cestodos, al igual que muchos otros platelmintos parásitos, son incapaces de sintetizar la gran mayoría de sus lípidos *de novo*, por lo que deben adquirirlos a partir de sus hospedadores. En ese contexto, se cree que las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) podrían tener un rol importante en la adquisición de dichos nutrientes y la distribución de los mismos entre los diferentes tejidos, estadios y/o vías metabólicas de estos cestodos.

Hasta el momento, sólo una FABP de *E. granulosus*, denominada EgFABP1, ha sido parcialmente caracterizada. Sin embargo, para poder determinar si esta proteína participa en el transporte e intercambio de lípidos, es necesario avanzar en el análisis de los ligandos que EgFABP1 es capaz de unir y en su capacidad de intercambiar estos ligandos. Para ello, en la presente tesis se aplicaron diversas técnicas biofísicas y bioquímicas para la caracterización de la interacción de EgFABP1 con ligandos y membranas fosfolípídicas. Mediante análisis por cromatografía en capa fina y cromatografía gas-líquido de los lípidos que copurifican con EgFABP1 recombinante expresada en *Escherichia coli*, se logró determinar que en un ambiente celular complejo, como es el citoplasma de una bacteria, EgFABP1 sólo uniría ácidos grasos libres y no lípidos más complejos, como por ejemplo, fosfolípidos. Asimismo, mediante técnicas de proteólisis parcial y difracción circular se estableció que la unión de EgFABP1 a ligandos es capaz de inducir diferentes cambios conformacionales en la proteína, dependiendo del tipo de ácido graso al que se una. Por otro lado, el estudio de los mecanismos de transferencia de ácidos grasos fluorescentes a membranas fosfolípídicas artificiales mostró que EgFABP1 emplearía un mecanismo de transferencia de tipo colisional, lo cual implica que la proteína debe interactuar con la membrana para entregar sus ligandos. Esto es similar a lo observado para FABPs de mamíferos, ampliamente estudiadas, que se asemejan a EgFABP1 tanto a nivel de secuencia como de estructura terciaria, lo que puede facilitar el enfoque de futuros estudios sobre esta proteína de *E. granulosus*.

Por otra parte, la exploración de los genomas de *E. granulosus* y *E. multilocularis* recientemente publicados, permitió establecer la existencia de un total de seis genes de FABPs en cada una de las dos especies, destacándose en el caso de *E. multilocularis* el hecho de que dos de esos genes codifican para una misma proteína. En el presente trabajo, se clonaron las cinco secuencias codificantes de *E. multilocularis*, por lo que se pudo establecer experimentalmente parte de la estructura génica de dichos genes. Asimismo,

ensayos preliminares sugieren que estas FABPs se expresan diferencialmente en distintos tejidos del parásito. Por otro lado, se realizó una caracterización bioinformática de los genes y proteínas FABPs predichos en ambos cestodos, comparándolos con información existente sobre proteínas de esta familia en otros organismos.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis amplían el conocimiento relativo a las FABPs de *Echinococcus* spp., revelando la existencia de toda una familia de FABPs que podrían cumplir roles específicos en diferentes tejidos y/o estadios de estos parásitos. A diferencia de lo que se creía previamente, esto plantea un panorama bastante más complejo en el transporte y metabolismo de ácidos grasos, y posiblemente otros ligandos hidrofóbicos, en parásitos cestodos. Asimismo, la capacidad de EgFABP1 de interactuar con membranas y transferir ácidos grasos podría implicar su relación con el transporte y derivación de ligandos hacia diferentes compartimentos y/o vías metabólicas en las células de *E. granulosus*. Los cambios conformacionales inducidos por ciertos ligandos, podrían tener implicancias desde el punto de vista de la señalización y regulación génica, análogamente a lo descrito para otras FABPs.



## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo aborda diferentes aspectos vinculados a las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) de parásitos cestodos del género *Echinococcus*; en particular, de las especies *E. granulosus* y *E. multilocularis*. En esta sección se pretende presentar información básica en relación a los helmintos parásitos, prestando particular atención a las especies antes mencionadas. Asimismo, se brindará información relativa a las FABPs, partiendo de los conocimientos acumulados en relación a las FABPs de mamíferos (las primeras en ser descubiertas y las más estudiadas), pasando por FABPs de invertebrados en general, hasta llegar a las de *E. granulosus*.

### 1.1 Parasitismo

Es sabido que en la naturaleza conviven e interactúan entre sí organismos de diferentes especies, con diferentes grados de dependencia. Dichas asociaciones se conocen como simbiosis. De acuerdo a la dependencia entre el simbiote y el hospedador, se admiten normalmente tres grados de simbiosis: mutualismo, comensalismo y parasitismo.

En el caso del mutualismo, se benefician tanto el hospedador como los simbiotes, y existe una dependencia fisiológica mutua. Un ejemplo de mutualismo lo constituyen las termitas y sus protozoos intestinales. Las termitas proporcionan el hábitat y la celulosa, proveniente de la madera, que ellas no son capaces de digerir. Los protozoos intestinales, por su parte, son capaces de hidrolizar la celulosa, la cual puede ser usada tanto para su propio beneficio como también para el de las termitas.

Por su parte, el comensalismo consiste en un fenómeno en el que el hospedador brinda el hábitat y el alimento a sus simbiotes, sin resultar él dañado ni beneficiado. Al hospedador le resulta indistinto interactuar o no con sus simbiotes. Los simbiotes, sin embargo, sí dependen fisiológicamente de su hospedador. Ejemplos de comensales resultan ser ciertos protozoos que viven en el intestino del hombre.

El parasitismo es la relación en la cual el simbiote, que es fisiológicamente dependiente de su hospedador, puede perjudicar a este último. Los trematodos, cestodos, acantocéfalos, y varios protozoos y nematodos resultan ser ejemplos de parásitos animales (Olsen, 1977a).

#### 1.1.1. Clases de parásitos

Existen diferentes clasificaciones de parásitos dependiendo de la localización en el cuerpo y el período que pasa el parásito en contacto con su hospedador, así como del grado de

dependencia con el mismo. Si los parásitos viven sobre la superficie externa del hospedador son considerados *ectoparásitos*, mientras que si el hábitat es el interior del hospedador, los mismos son denominados *endoparásitos*. Los *ectoparásitos* pueden vivir sobre la superficie propiamente dicha del cuerpo del hospedador, o bien sobre cavidades que comunican directamente con el exterior, como pueden ser las branquias de los peces. Los ejemplos más comunes de este tipo de parásitos resultan ser los piojos y garrapatas. Por su parte, los *endoparásitos* pueden hallarse en diferentes localizaciones del interior del organismo del hospedador como pueden ser el tubo digestivo, los pulmones, el hígado y muchos otros tejidos y células. Ejemplos de este tipo de parásitos son los cestodos, trematodos digeneos, nematodos y protozoos.

Teniendo en cuenta el período que los parásitos pasan sobre o dentro del hospedador, se los puede clasificar como *parásitos temporales* o *parásitos estacionarios*. Los *parásitos temporales* solo tienen contacto con el hospedador para alimentarse. Una vez satisfechas sus necesidades, lo abandonan. Ejemplos claros de este tipo de organismo resultan ser los artrópodos hematófagos y las sanguijuelas. Los *parásitos estacionarios*, por su parte, pasan un período definido de su ciclo de vida dentro o sobre su hospedador. Dependiendo de la duración de dicho período, se los puede subdividir a su vez en: *parásitos periódicos*, que son aquellos que pasan parte de su ciclo de desarrollo en contacto con el hospedador y luego lo abandonan para adoptar un tipo de vida no parasitario, y *parásitos permanentes*, que son los que permanecen durante toda su existencia en los hospedadores, salvo por los momentos en los que pasan de un hospedador a otro.

Por otra parte, se habla de *parásitos accidentales* cuando los mismos aparecen en hospedadores poco comunes, y *parásitos erráticos* cuando migran a órganos poco comunes de un hospedador normal.

Todas las clasificaciones mencionadas se aplican a *parásitos obligados*, es decir, organismos cuyo desarrollo se lleva a cabo, al menos en parte, en su hospedador. Sin embargo, existen animales que a pesar de ser, en condiciones normales, organismos de vida libre, pueden existir durante breves períodos en el cuerpo de otros animales a los que llegan accidentalmente. Este tipo de organismos son considerados *parásitos facultativos* e incluyen ciertos nematodos de vida libre, así como larvas de algunas moscas (Olsen, 1977a).

### **1.1.2. Características del parasitismo**

La característica más destacable del parasitismo es la capacidad de adaptación. Si bien las necesidades básicas de un parásito son similares a las de los organismos de vida libre (hábitat, alimento, reproducción), su modo de vida dependiente de otro organismo ha llevado

a que los parásitos desarrollen diversas adaptaciones para poder ingresar, permanecer y, eventualmente, salir de su hospedador.

Para poder vivir en un determinado hospedador, los parásitos han debido desarrollar estructuras para poder aferrarse a él. Esas adaptaciones consisten en ganchos, ventosas y otras estructuras de adherencia.

Asimismo, ciertos parásitos necesitan poder salir de su hospedador para poder infectar uno nuevo. Para ello, se utilizan diferentes vías dependiendo de cuál sea la localización del parásito en el cuerpo del hospedador. Los que se localizan en el aparato digestivo, pulmones, hígado o sistema reproductor, pueden utilizar las salidas naturales de dichos sistemas como vías para eliminar quistes o huevos. Los que viven en sistema circulatorio, como el protozoo causante de la malaria, generalmente requieren de animales hematófagos que les permitan salir de su hospedador. En muchos casos, se completa parte del desarrollo en el organismo que sirve como vector de dichos parásitos, el cual también servirá para inocular al parásito en nuevos hospedadores. Ciertos gusanos que se alojan en tejidos subcutáneos son capaces de dañar la epidermis y formar aberturas a través de las cuales sus larvas pueden salir para infectar nuevos hospedadores. Otros organismos, como los cestodos, abandonan a su hospedador intermediario por medio de predadores o carroñeros, los cuales son, a su vez, sus hospedadores definitivos.

Por otra parte, los parásitos han desarrollado también adaptaciones importantes para poder sobrevivir en los períodos de transferencia entre un hospedador y otro. Aquellos que tienen un ciclo vital directo, en el cuál existe un período de desarrollo en el suelo o el agua, se observa el desarrollo de quistes protectores, huevos con gruesas membranas, larvas con cutículas protectoras y otras adaptaciones tendientes a brindar protección frente a los riesgos de desecación, congelación y demás inclemencias climáticas. Los parásitos con ciclo vital indirecto, es decir, que tienen períodos de desarrollo en al menos un hospedador intermediario, pueden poseer alguna de las características antes mencionadas para períodos de transferencia entre distintos hospedadores. Sin embargo, dado que la mayor parte del tiempo su desarrollo se lleva a cabo dentro de algún hospedador, estos organismos deben adaptarse a los diferentes medios bióticos que constituyen los cuerpos de sus diferentes hospedadores. La supervivencia en los diferentes hospedadores depende de la capacidad que hayan desarrollado los parásitos para resistir las reacciones inmunológicas del hospedador, la acción de los jugos digestivos, o bien la habilidad para alcanzar hábitats donde existan los nutrientes necesarios para el crecimiento y reproducción en niveles adecuados. Cabe destacar que los parásitos más eficaces resultan ser los que han desarrollado una mayor capacidad reproductiva, con la finalidad de compensar las posibles pérdidas causadas a lo largo de sus complejos ciclos de vida. Dicho potencial puede alcanzarse mediante el aumento de la producción de huevos, la duplicación de órganos sexuales en segmentos (como ocurre



en los cestodos), o mediante reproducción asexual extendida por largos períodos (Olsen, 1977a).

## 1.2 Cestodos

El phylum *Platyhelminthes*, incluye una gran variedad de especies de gusanos, tanto parásitos como de vida libre. Los miembros de las clases *Trematoda*, *Monogenea* y *Cestoda* constituyen la mayor parte de los platelmintos parásitos. Los platelmintos son gusanos, o helmintos, planos (dorsoventralmente aplanados). Se caracterizan por tener cuerpos bilateralmente simétricos, carentes de cutículas o capas protectoras, por tener un bajo grado de cefalización, y carecer de ano. Usualmente son hermafroditas (Brusca & Brusca, 2003; Maule & Marks, 2006).

Dentro del phylum *Platyhelminthes*, son de particular interés para el presente trabajo los organismos pertenecientes a la clase *Cestoda*. Los cestodos son, en su forma adulta, gusanos planos con forma de cinta, exclusivamente endoparásitos (Brusca & Brusca, 2003; Olsen, 1977b; Smyth & McManus, 2007). Los estadios adultos de los parásitos pertenecientes a la subclase *Eucestoda* se localizan casi exclusivamente en el tubo digestivo de hospedadores vertebrados. Algunas excepciones se localizan en órganos y tejidos relacionados de igual manera con procesos digestivos como pueden ser la vesícula biliar o los túbulos pancreáticos (Brusca & Brusca, 2003; Smyth & McManus, 2007).

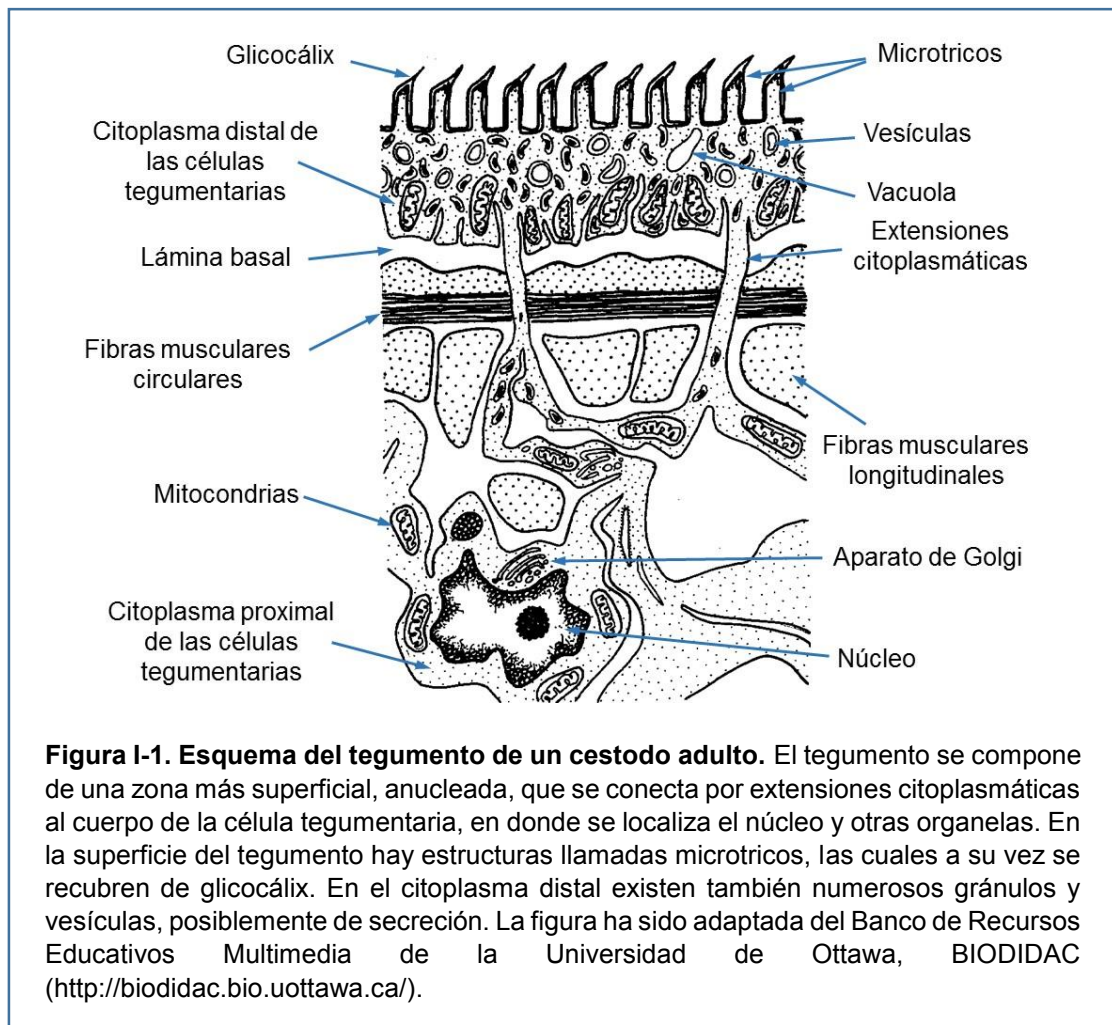
Dado que los parásitos del género *Echinococcus* (sobre los cuales se centra el presente trabajo) pertenecen a la familia *Taeniidae*, dentro del Orden *Cyclophillidea* de los *Eucestoda* (Brusca & Brusca, 2003; Olsen, 1977b); se describirá brevemente a continuación la anatomía de los cestodos tenioides. Dichos organismos, en su estadio adulto, presentan tres zonas bien definidas y características: el escólex, el cuello y el estróbilo.

El escólex es un órgano de fijación que en el caso de los cestodos del orden *Cyclophillidea* es de tipo acetabulado, con presencia de ventosas. Este tipo de escólex puede ser a su vez penetrativo o no penetrativo. Estos últimos, como su nombre lo indica, no penetran demasiado profundamente en la mucosa intestinal del hospedador, mientras que los escólex penetrativos permiten una fijación al hospedador más íntima, dado que invaden las criptas de Lieberkühn del intestino del hospedador. En los *Taeniidae*, este tipo de escólex usualmente posee, aparte de las ventosas, un rostelo, que es una extensión en forma de cúpula o dedo sobre el mismo. En muchas especies el rostelo posee ganchos que colaboran con la fijación del parásito a la mucosa de su hospedador. En varias especies se han descrito glándulas de secreción en el escólex, aunque sus funciones no han sido claramente definidas (Smyth & McManus, 2007).

El cuello es una pequeña región, inmediatamente posterior al escólex, que contiene una zona germinativa desde donde se originan las proglótides que forman el estróbilo (Brusca & Brusca, 2003).

El estróbilo consiste en un tronco elongado, segmentado, formado por proglótides (Brusca & Brusca, 2003). Cabe destacar que, aunque se observan constricciones en el estróbilo que delimitan las proglótides, el interior posee un parénquima ininterrumpido y existen músculos longitudinales que atraviesan la totalidad del cuerpo del organismo (Smyth & McManus, 2007). El grado de maduración de las proglótides aumenta conforme las mismas se alejan del escólex. A medida que se van formando nuevas proglótides a partir del cuello, las más viejas se alejan del escólex, maduran, resultan inseminadas y se llenan de embriones (Brusca & Brusca, 2003).

Dada la ausencia de aparato digestivo en los cestodos, la pared de su cuerpo ha debido adaptarse para llevar a cabo tareas de absorción de nutrientes y eliminación de desechos. Dicha pared, el tegumento, es un epitelio sincitial (*Ver Figura I-1*). El mismo está constituido por dos zonas: una superficial, anucleada, denominada citoplasma distal; y una nucleada, denominada citoplasma proximal, que se encuentra en el mesénquima. El citoplasma distal contiene abundantes mitocondrias, gránulos y vesículas. Dichos gránulos y vesículas derivarían del aparato de Golgi ubicado en el citoplasma proximal, y estarían involucrados en el mantenimiento del glicocálix. El citoplasma proximal y el distal se encuentran conectados mediante túbulos citoplasmáticos que atraviesan la lámina basal (Smyth & McManus, 2007). Una característica del tegumento de los cestodos es que en su superficie externa cuenta con plegamientos llamados microtricos, que suelen compararse con las microvellosidades intestinales. Se ha propuesto que los microtricos no sólo aumentarían la superficie de absorción del tegumento, sino que también servirían como estructuras adhesivas (para evitar que el parásito sea expulsado del tubo digestivo). Asimismo, sus extremos puntiagudos servirían para erosionar las células del hospedador, permitiendo una mayor disponibilidad de nutrientes para el parásito (Olsen, 1977b). Como se mencionó más arriba, por fuera de la membrana apical del tegumento existe una capa de glicocálix, el cual está formado por mucopolisacáridos y glicoproteínas. En cestodos, la alta proporción de grupos acídicos que forman el glicocálix otorga una carga neta negativa a dicha superficie. Entre otras propiedades, el glicocálix tiene la capacidad de concentrar iones, tanto orgánicos como inorgánicos, que podrían servir para activar enzimas unidas a la membrana plasmática de los cestodos. Asimismo, tendría capacidad de unir sustancias con alto peso molecular, como enzimas del hospedador (Smyth & McManus, 2007).



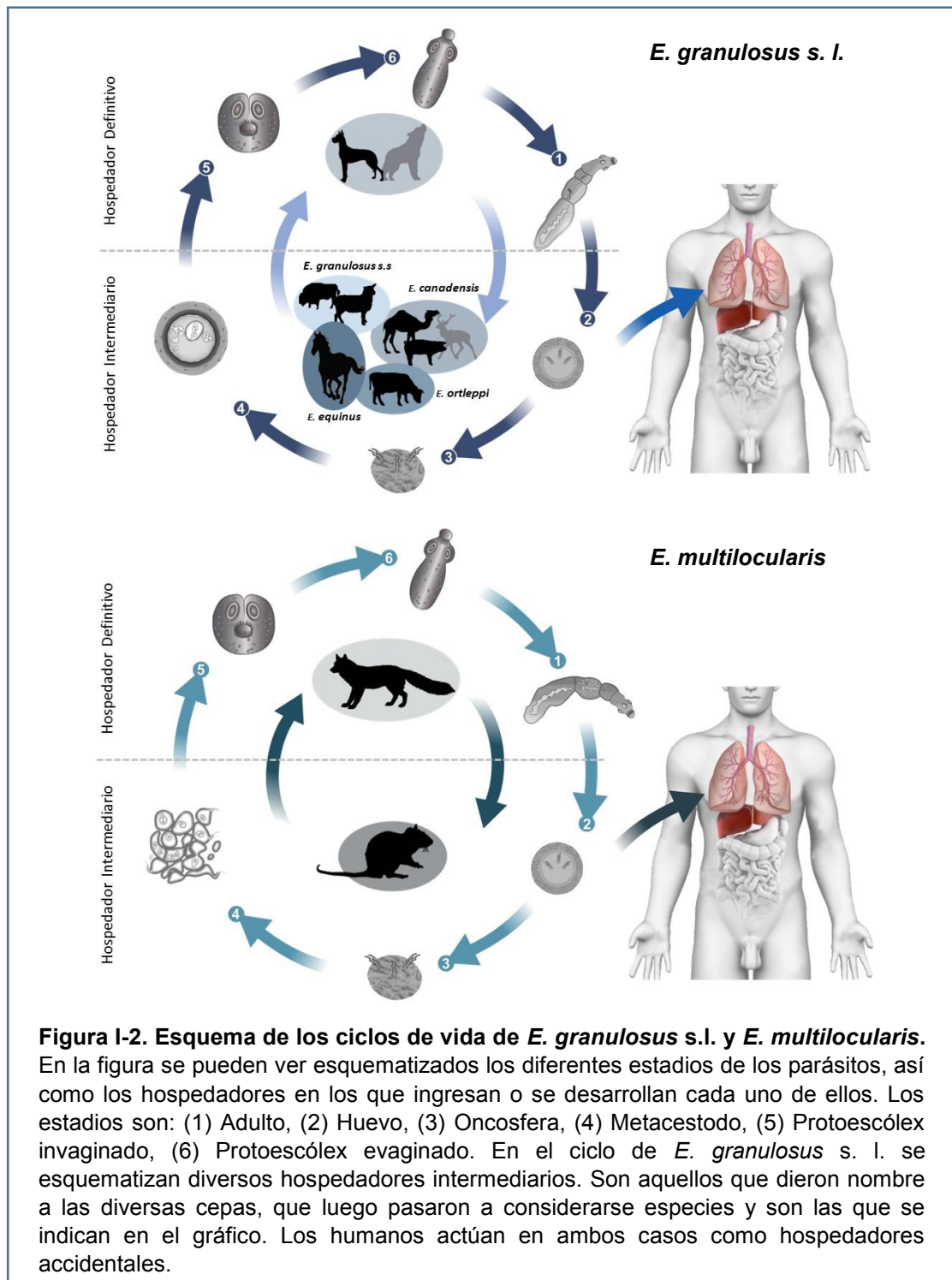
### 1.3 Género *Echinococcus*

Los cestodos del género *Echinococcus*, en particular su estadio larval (o metacestodo), son los agentes responsables de las enfermedades conocidas como hidatidosis o echinococcosis. La hidatidosis quística y la hidatidosis alveolar son las dos formas más frecuentes en humanos, y son provocadas por *E. granulosus* y *E. multilocularis*, respectivamente.

Estas zoonosis forman parte de un grupo de 17 enfermedades tropicales desatendidas, prioritarias para la Organización Mundial de la Salud. En su conjunto, esas 17 enfermedades afectan a más de 1000 millones de personas alrededor del mundo, generando mayores impactos en los países con economías más vulnerables (WHO, 2015).

### 1.3.1. Ciclo de vida de *Echinococcus* spp.

El ciclo de vida de *Echinococcus* spp. (Ver Figura I-2) se caracteriza por ser un ciclo indirecto, en el que están involucrados dos hospedadores mamíferos. De modo muy general, se puede decir que el ciclo involucra a animales carnívoros como hospedadores definitivos (alojan el estadio adulto), y sus respectivas presas como hospedadores intermedios (alojan al estadio larval) (Ver Tabla I-1).



Dado que el parásito adulto se aloja en el intestino de su hospedador definitivo, los huevos infectivos son eliminados con las heces del hospedador y son capaces de contaminar el agua y las pasturas que frecuentan los animales que actúan como hospedadores intermediarios.

Cuando los huevos de *Echinococcus* spp. son ingeridos por los hospedadores intermediarios, los mismos eclosionan al alcanzar el intestino delgado del hospedador y liberan la oncosfera (o hexacanto).

La oncosfera atraviesa la pared del intestino y alcanza las vénulas de la porta hepática. A través del torrente sanguíneo, la oncosfera alcanza el hígado, los pulmones u otros órganos del hospedador intermediario en donde es capaz de establecerse y dar origen a un metacestodo (estadio larval), cuyas características pueden variar dependiendo de cuál sea la especie del género *Echinococcus* involucrada (*Ver más adelante*), aunque en todas ellas se trata de estructuras quísticas dentro de las cuáles se generan, por reproducción asexual, gran cantidad de protoescólices.

El ciclo de vida del parásito se cierra cuando el hospedador definitivo ingiere metacestodos alojados en las vísceras de su presa. Al pasar por el sistema digestivo del hospedador definitivo, se liberan los protoescólices que desarrollarán gusanos adultos en el intestino de dicho animal. Cabe destacar que los humanos pueden actuar como un hospedador accidental, siendo capaces de alojar metacestodos de *Echinococcus* spp. en sus órganos internos.

### **1.3.2. Especies pertenecientes al género *Echinococcus***

El número de especies pertenecientes al género *Echinococcus* ha sido tema de debate entre los especialistas durante muchos años. Tal es así, que no fue sino hasta la década del 50 del siglo XX que se determinó que la especie responsable de la echinococcosis alveolar era *E. multilocularis*, y no *E. granulosus* como se creía hasta ese momento (Nakao et al., 2013). Por otra parte, las variaciones fenotípicas observadas en aislamientos de *Echinococcus* obtenidos a partir de diferentes hospedadores intermediarios generaban aún más confusión al momento de determinar las especies pertenecientes a dicho género. Se observaban diferencias en el desarrollo de parásitos provenientes de diferentes especies de hospedadores intermediarios, diferencias en la infectividad de los mismos, ya sea hacia humanos o hacia otros potenciales hospedadores, etc. Dichas variaciones, hicieron necesario adoptar un sistema informal de designación de esas variantes o “cepas” de *E. granulosus* (Thompson & McManus, 2002). Las cepas se definieron como variantes “que difieran estadísticamente de otros grupos de la misma especie en frecuencias de genes, y en uno o más caracteres que sean o pudieran ser relevantes para la epidemiología o control de la echinococcosis” (Thompson & Lymbery, 1988). De esta manera, se definieron las cepas oveja, búfalo, caballo, vaca, camello, cerdo, cérvido y león, basándose principalmente en la

especificidad por el hospedador intermediario; salvo por la cepa león, que se definió en base a la especificidad por el hospedador definitivo. Mientras tanto, se incluían solamente cuatro especies dentro del género *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthra* (previamente designado *E. oligarthrus*) (Nakao et al., 2013). Posteriormente, con el avance en las técnicas de secuenciado de ADN, se comenzaron a analizar genes mitocondriales y nucleares de los diversos integrantes del género *Echinococcus*. Dichos estudios confirmaron que *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthra* eran diferentes entre sí y que *E. granulosus* podía subdividirse en diferentes genotipos (indicados con la letra G seguida de un número), los cuales se correspondían a su vez con las cepas previamente determinadas en base a observaciones fenotípicas. La relación entre los genotipos y las cepas resultó ser la siguiente: G1 (cepa oveja), G2 (cepa oveja de Tasmania), G3 (cepa búfalo), G4 (cepa caballo), G5 (cepa vaca), G6 (cepa camello), G7 (cepa cerdo), G8 (cepa cérvido) y G10 (cepa cérvidos de Escandinavia). El genotipo G9 es aún motivo de discusión y se considera, hasta que se demuestre lo contrario, una variación del genotipo G7 (Alvarez Rojas et al., 2014; Nakao et al., 2013). Posteriormente, y a medida que progresaban los estudios filogenéticos basados en secuencias de ADN, incluyendo secuencias completas de ADN mitocondrial, se observó que los genotipos de *E. granulosus* eran aún más divergentes de lo que se creía. Tal es así, que se reconsideró la taxonomía del género *Echinococcus*, de modo tal que, hoy por hoy, se considera a *E. granulosus* como un complejo de especies que incluye a *E. granulosus* sensu stricto (genotipos G1 a G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5) y, en principio, *E. canadensis* que incluiría a los genotipos G6-G10 (Nakao et al., 2013; H. Zheng et al., 2013). En su conjunto, estas especies pueden denominarse *E. granulosus* sensu lato (*E. granulosus* s. l.). Asimismo, lo que se consideraba “cepa león” de *E. granulosus*, pasó luego a ser considerada una nueva especie, *E. felidis*; y se descubrió también otra especie en China, más relacionada a *E. multilocularis*, denominada *E. shiquicus* (McManus, 2013; Nakao et al., 2013). Recientemente, se ha sugerido que sería posible una división de *E. canadensis* (G6 a G10) en otras tres especies (Lymbery et al., 2015). Si bien dichos autores sostienen que aún resta trabajo por hacer en cuanto al análisis genético de dichas variantes, se apoyan en el hecho de que existen diferencias en la distribución geográfica, rango de hospedadores y morfología de las mismas, suficientes como para proponer que se designen nuevas especies a partir de los genotipos mencionados dentro de *E. canadensis*. Lo que se propone es retomar nomenclaturas propuestas en los estudios morfológicos que describieron originalmente la diferencia entre dichos organismos. De este modo, lo que se postula es que *E. canadensis* (G6/G7) pase a ser *E. intermedius*, *E. canadensis* (G8) sea *E. borealis*, y *E. canadensis* (G10) permanezca como tal (Lymbery et al., 2015). Claramente, este es un campo de estudio muy amplio en el que todavía pueden surgir novedades. Para los fines de este trabajo, al hablar de *E. granulosus* se hará referencia a *E. granulosus* s. l., salvo que se especifique lo contrario.

En la *Tabla I-1* se muestra una compilación de la información discutida en los párrafos previos a modo de resumen del estado actual en materia de taxonomía del género *Echinococcus* (McManus, 2013; Moro & Schantz, 2009; Nakao et al., 2013; Thompson & McManus, 2002).

Especie	Genotipos	Cepas	Distribución	Hospedador Definitivo <sup>(a)</sup>	Hospedador Intermediario <sup>(a)</sup>	Tipo de metacestodo
<i>E. granulosus sensu stricto</i>	G1/G2/G3	Oveja/Oveja de Tasmania/Búfalo	Mundial	Perro, zorro, dingo, chacal, hiena	Oveja, vaca, cabra, cerdo, camello, canguro	Unilocular
<i>E. equinus</i>	G4	Caballo	Mundial (Esporádico)	Perro	Caballo, otros equinos	Unilocular
<i>E. ortleppi</i>	G5	Vaca	Mundial	Perro	Vaca, oveja, búfalo, cabra	Unilocular
<i>E. canadensis (E. intermedius)</i> <sup>(b)</sup>	G6/G7	Camello/Cerdo	Mundial	Perro	Camello, cerdo, vaca, oveja, cabra	Unilocular
<i>E. canadensis (E. borealis)</i> <sup>(b)</sup>	G8	Cérvidos	Ártica norte y boreal	Lobo	Alce, ciervo canadiense	Unilocular
<i>E. canadensis (E. canadensis)</i> <sup>(b)</sup>	G10	Cérvidos de Escandinavia	Ártica norte y boreal	Lobo, perro	Alce, reno, ciervo canadiense	Unilocular
<i>E. multilocularis</i>	Europeo, Asiático, Norteamericano		Holártica	Zorro rojo, zorro ártico, lobo, coyote, perro, gato	Roedores arvicolininos, mono	Alveolar
<i>E. vogeli</i>			Neotropical	Perro venadero ( <i>S. venaticus</i> ), perro	Paca, agutí ( <i>Dasyprocta</i> spp.)	Poliquistico
<i>E. oligarthra</i>			Neotropical	Felinos salvajes (puma, jaguar, yaguarundí, ocelote)	Paca, agutí	Poliquistico
<i>E. shiquicus</i>			Meseta tibetana	Zorro tibetano	Pica	Unilocular
<i>E. felidis</i>		León	África	León, ¿hiena?	¿Facóquero común?	¿Unilocular?

**Tabla I-1. Taxonomía del género *Echinococcus*.** La tabla muestra un resumen del estado actual de la taxonomía del género *Echinococcus*, incluyendo algunos datos generales de distribución geográfica de las distintas especies, posibles hospedadores y tipo de metacestodo que generan en sus hospedadores intermediarios. Con fondo gris se destacan las especies que conforman el complejo conocido como *E. granulosus* sensu lato.

(a) Se enumeran sólo algunos hospedadores susceptibles.

(b) El reconocimiento de las especies entre paréntesis ha sido recientemente propuesto por Lymbery et al. (2015)

### 1.3.3. Morfología de *Echinococcus* spp.

A continuación se presentarán brevemente las características morfológicas de los diferentes estadios de los cestodos pertenecientes al género *Echinococcus*. De no especificarse, se estará considerando a *E. granulosus* s. l.

### 1.3.3.1. Adulto

El adulto es el estadio de *Echinococcus* spp. que se aloja en el intestino de su hospedador definitivo. Se puede decir de modo general que el estadio adulto de *Echinococcus* spp. es un gusano muy pequeño, de entre 2mm a 1cm de longitud (dependiendo de la especie) que consiste en un escólex, un cuello y entre 3 y 5 proglótides, de las cuales las primeras son inmaduras, las intermedias son sexualmente maduras, y las últimas, grávidas (contienen huevos ya desarrollados) (Nakao et al., 2013).

El escólex de *Echinococcus* spp. se caracteriza por ser acetabulado (con cuatro ventosas), y por poseer un rostelo armado con dos filas de ganchos, unos mayores y otros menores. El tamaño de los ganchos varía de una especie a otra y se ha utilizado, junto a otros caracteres, para diferenciarlas.

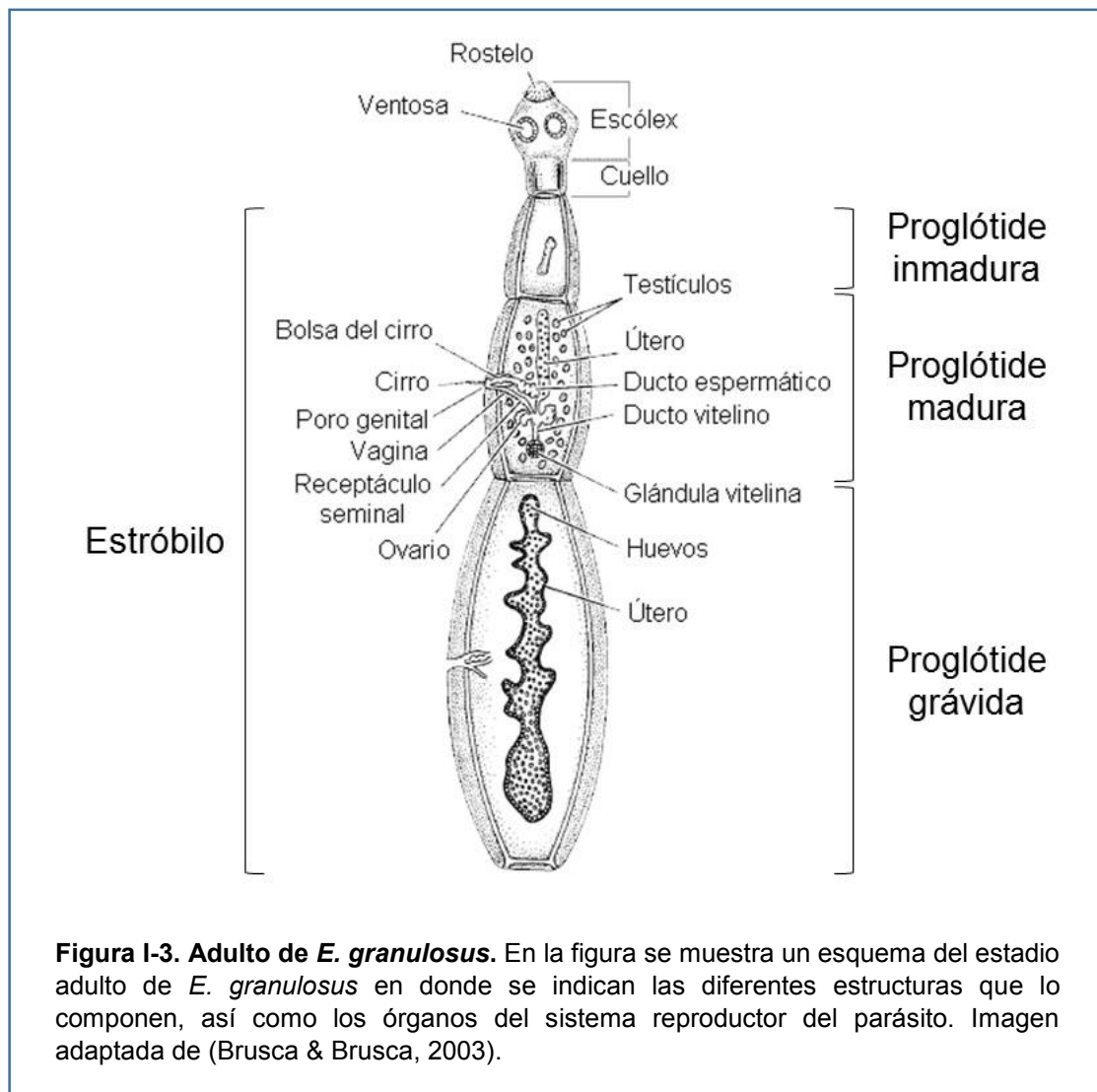
A continuación del escólex se extiende un pequeño segmento alargado, el cuello, que da origen a las proglótides, las cuales constituyen las unidades reproductoras del estadio adulto, hermafrodita, de *Echinococcus* spp. (Ver Figura 1-3).

El sistema reproductor masculino consiste en un gran número de testículos distribuidos por el parénquima, los cuales se conectan, a través de los vasos deferentes, a la vesícula seminal que se encuentra en la bolsa del cirro. El sistema reproductor femenino, por su parte, consiste en un ovario desde donde surge el oviducto, el cual desemboca a su vez en el ootipo, que es una especie de cámara donde se ensamblan varios componentes de los huevos. El ootipo se encuentra a su vez rodeado por la glándula de Mehlis, mientras que el útero se extiende a lo largo de la proglótide y se conecta con el ootipo. El receptáculo seminal, donde ocurre la fertilización, se conecta con la vagina, la cual desemboca junto a la bolsa del cirro en un atrio genital común (Brownlee et al., 1994). La ubicación del atrio genital en las proglótides, así como variaciones morfológicas de los órganos reproductores varían ligeramente entre las distintas especies del género *Echinococcus* (Lymbery et al., 2015).

Se ha reportado que varias especies del género *Echinococcus* son capaces de auto-inseminarse. Esto es, el cirro (órgano sexual masculino) se introduce en la vagina de la misma proglótide para llevar a cabo la inseminación (Smyth & McManus, 2007). Aunque la inseminación cruzada (entre proglótides de diferentes individuos) sería teóricamente posible, no ha podido demostrarse que verdaderamente ocurra. Por otra parte, la auto-inseminación entre dos proglótides diferentes de un mismo individuo es considerada poco probable tanto por la corta distancia que las separa, que impediría que el cestodo pueda doblarse para que entren en contacto ambos poros genitales, como por el hecho de que en *Echinococcus* spp. no suele haber dos proglótides con el mismo grado de madurez al mismo tiempo (Mohammadzadeh et al., 2014; Smyth & McManus, 2007). Luego de la fertilización, una vez que los huevos se desarrollan por completo, el útero queda extendido, ocupando



prácticamente la totalidad del último segmento, esto es, la proglótide grávida. Es justamente ese segmento el que al desprenderse del estróbilo posibilita la dispersión de los huevos en el ambiente a través de las heces del hospedador.



Otro aspecto que vale comentar en relación a la anatomía y fisiología del estadio adulto de *E. granulosus*, es la presencia de un sistema nervioso bien desarrollado, compuesto tanto por componentes centrales como periféricos. El sistema nervioso central consiste en un par de ganglios laterales ubicados dentro del escólex que se conectan mediante un anillo nervioso central y una comisura cerebral transversal. De la parte anterior de los ganglios laterales se extiende un par de nervios que se conectan con los ganglios rostellares, de los cuales parten a su vez nervios que inervan el rostelo armado. Los ganglios posterolaterales, a diferencia de los antes mencionados, se conectan sólo a través de nervios, que a su vez los vinculan también con los cordones nerviosos medianos. Las ventosas son inervadas por nervios provenientes de los ganglios laterales y posterolaterales, y de los cordones medianos. A partir

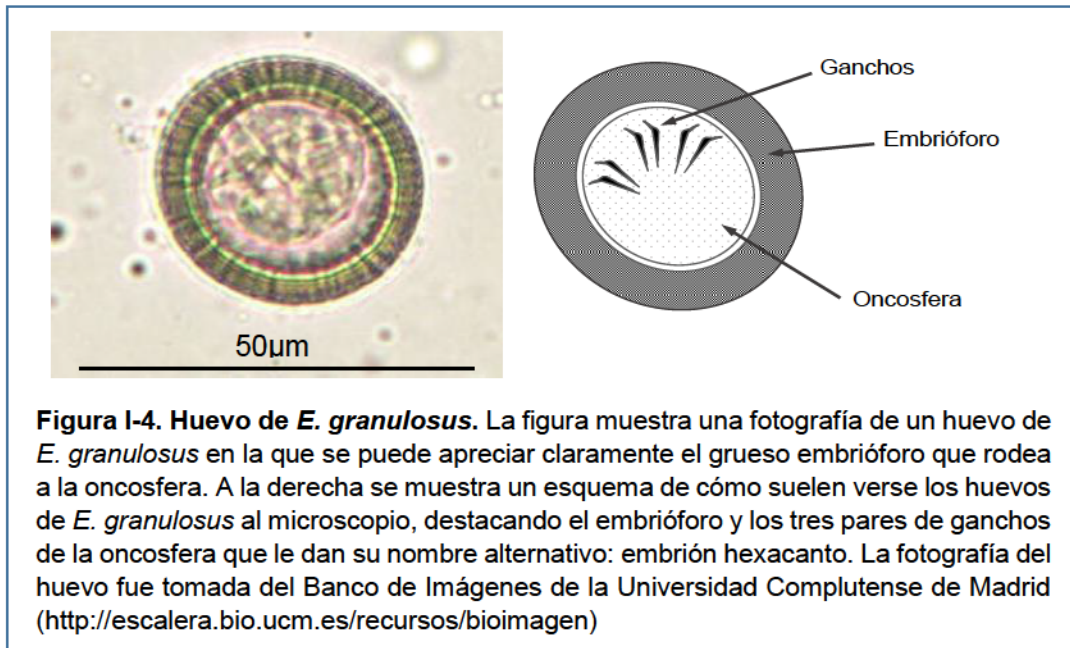
de los ganglios laterales parte un conjunto de 10 cordones nerviosos, los dos cordones nerviosos laterales mayores, los cordones ventrolaterales, los dorsolaterales y dos pares de cordones nerviosos medianos. Los cordones laterales pasan por los ganglios posterolaterales antes de extenderse por el resto del cuerpo del parásito. A lo largo del recorrido de los nervios, los mismos se conectan a través de comisuras transversales. El sistema nervioso periférico se compone de plexos nerviosos que, sumados a los que inervan a las ventosas y el rostelo, se asocian a la musculatura subtegumentaria y elementos del sistema reproductor, entre otras estructuras (Brownlee et al., 1994).

En cuanto al sistema excretor, el mismo está compuesto por túbulos colectores que convergen en canales excretores que se extienden a lo largo del cuerpo del cestodo. Este sistema es de tipo protonefridial (Smyth & McManus, 2007).

Existen también en el cuerpo del cestodo adulto capas musculares longitudinales y circulares que se encuentran por debajo del tegumento.

### 1.3.3.2. Huevo

Los huevos de *Echinococcus* spp. tienen forma ovoide y un tamaño que ronda los 30-40µm. Se caracterizan por tener una cápsula embrionaria muy fina que suele perderse al depositarse los huevos con las heces del animal hospedador. La ausencia de dicha protección se compensa mediante un engrosamiento del embrióforo, el cual está formado por bloques de queratina unidos por una sustancia cementante (Ver Figura I-4). Estas estructuras son las que le dan al huevo un aspecto estriado al observarlo al microscopio (Eckert et al., 2001; Smyth & McManus, 2007). Cabe destacar que los huevos de *Echinococcus* spp. son altamente resistentes a diversos factores, pudiendo ser infectivos por largo tiempo si se encuentran en condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Por ejemplo, huevos de *E. multilocularis* se han mantenido viables por 16 meses en agua a 4°C. Por otra parte, el calor seco o el agua hirviendo son capaces de matar a los huevos de *E. granulosus*, y probablemente también a las otras especies del género; mientras que tanto los huevos de *E. granulosus* como los de *E. multilocularis* son altamente resistentes a temperaturas de congelación de alrededor de -20°C (aunque a -80°C sobreviven sólo unas 48hs). Los huevos de estos cestodos son sensibles a la desecación, perdiendo viabilidad entre los 2 y 4 días con humedades relativas de alrededor de 25%. Finalmente, con respecto a la resistencia frente a compuestos químicos desinfectantes, se ha observado que los huevos de *E. granulosus* conservan viabilidad luego de permanecer entre 5 y 60 min en etanol al 50%, 70% o 95%, aunque casi no sobreviven al glutaraldehído al 5% o 10% (Eckert et al., 2001).



En el interior del huevo se localiza el embrión denominado oncosfera (o hexacanto). La estructura básica de la oncosfera consiste en un pequeño núcleo de células germinativas que darán origen al metacestodo, un par de glándulas de penetración, tres pares de ganchos accionados por un complejo sistema de músculos, un sistema nervioso primitivo y un fino epitelio que recubre lo antes mencionado, el cual posee también extensiones citoplasmáticas (Smyth & McManus, 2007). Se han propuesto diversas funciones para las glándulas de penetración. Entre otras, se ha propuesto que sus secreciones podrían producir lisis de los tejidos del hospedador, que protegerían a la oncosfera del ataque del sistema inmune del animal al que está invadiendo o que podrían asistir en la adhesión previa a la penetración del tejido. Sin embargo, aún no es claro el rol de estas glándulas en el proceso de penetración del intestino del hospedador intermediario (Holcman & Heath, 1997; Smyth & McManus, 2007). En cuanto a los ganchos de este estadio de *Echinococcus* spp., se ha propuesto que los mismos podrían ayudar a romper los tejidos del hospedador, movilizados por la acción de los músculos presentes en la oncosfera (Holcman & Heath, 1997).

Una vez atravesado el intestino del hospedador, la oncosfera alcanza la vena porta hepática y se traslada a través de la sangre hasta alcanzar el órgano blanco en el cual dará origen al metacestodo. Normalmente el sitio de establecimiento del metacestodo es el hígado o el pulmón, aunque muchas otras localizaciones son posibles.

### 1.3.3.3. Metacestodo

El metacestodo es el estadio larval de *Echinococcus* spp. que se desarrolla en los órganos internos de los animales que actúan como hospedadores intermediarios de dichos parásitos.

Cabe recordar que es este estadio el responsable de las zoonosis que afectan al ser humano conocidas como hidatidosis (o echinococcosis) quística, causada por *E. granulosus* s.l.; hidatidosis (o echinococcosis) alveolar, causada por *E. multilocularis*; y las echinococcosis neotropicales causadas por *E. oligarthra* y *E. vogeli*. *E. granulosus* s.l. es también el agente causal de la hidatidosis en animales de producción ganadera, tales como ovejas, vacas y cerdos, por lo que afecta no sólo a la producción agropecuaria sino que incrementa las posibilidades de infección del ser humano, por mantener el ciclo doméstico entre el perro y el ganado.

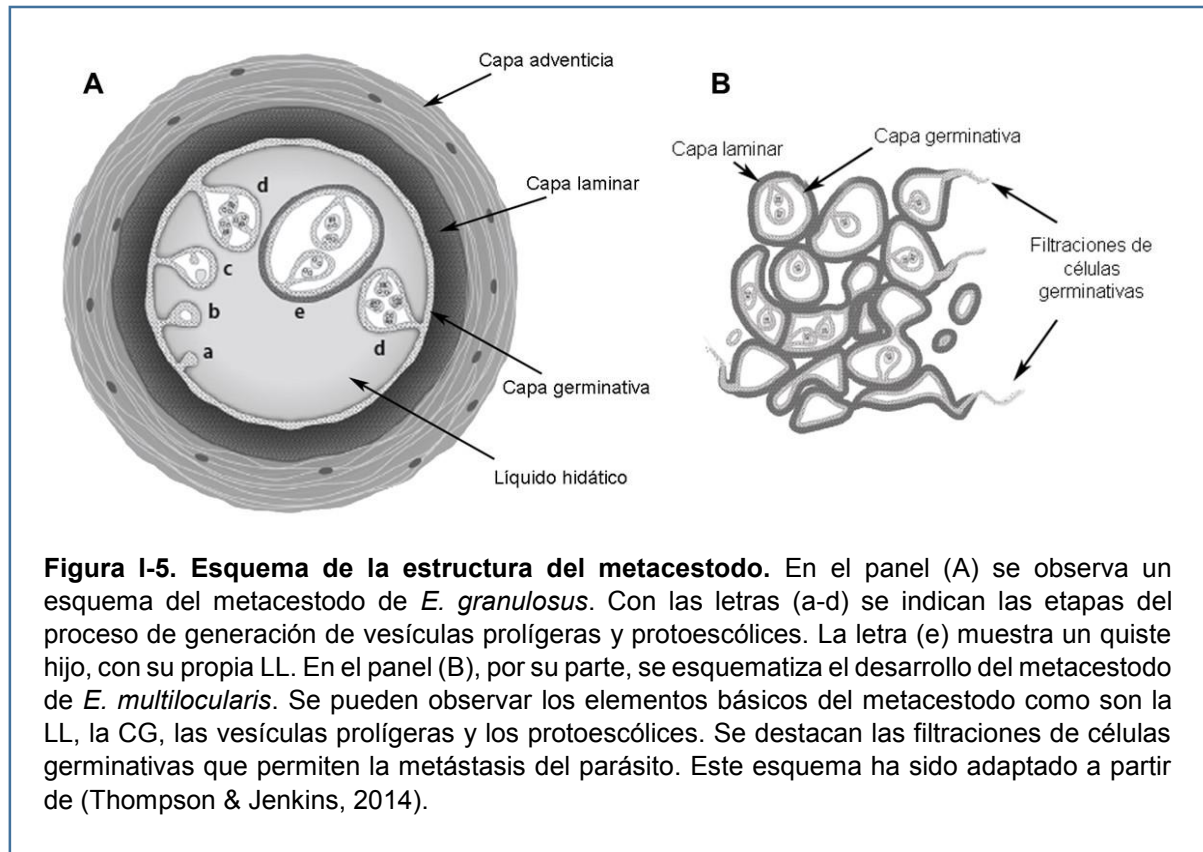
A continuación se hará una descripción de las principales características del metacestodo de *E. granulosus* y se mencionaran luego las diferencias con los metacestodos de las otras especies del género.

El metacestodo de *E. granulosus* consiste en una estructura vesicular (o quística) turgente, con líquido en su interior (líquido hidático), que crece gradualmente aumentando su diámetro. Dicha vesícula se encuentra delimitada por una pared compuesta por una fina capa celular interna (capa germinativa); y una capa acelular externa (capa laminar), que puede llegar a medir unos 3 milímetros de espesor. El metacestodo suele estar rodeado por una tercera capa más externa, la capa adventicia. Ésta es generada por el hospedador como resultado de la resolución de la respuesta inflamatoria temprana inducida por la presencia del parásito en los tejidos del hospedador. El conjunto formado por el metacestodo y la capa adventicia se denomina quiste hidático (*Ver Figura 1-5*).

Por brotación interna, la capa germinativa (CG) da origen a las vesículas prolíferas, las cuales a su vez generan protoescólices en su interior. La CG posee también un tegumento sincitial, con microtricos truncados, cuya cara apical se orienta hacia afuera del quiste; y otros tipos celulares como células musculares, de almacenamiento de glucógeno e indiferenciadas. Hacia el interior del quiste, las células de la CG no forman sincitio ni poseen complejos de unión, por lo que el líquido intercelular de la CG sería continuo respecto al líquido hidático (Díaz et al., 2011).

Tal como se mencionó previamente, entre la CG y el tejido del hospedador, se encuentra la capa laminar (LL). Esta estructura es una matriz extracelular especializada, que se encuentra únicamente en organismos del género *Echinococcus*. Su función está relacionada con mantener la integridad física del metacestodo, así como con proteger a las células de la CG del ataque del sistema inmune del hospedador. El gran espesor de la LL de *E. granulosus* ayudaría a mantener turgentes a los quistes hidáticos vivos, contrarrestando la presión ejercida desde el exterior del mismo.

El entramado de fibrillas que conforman la LL está compuesto por mucinas (glicoproteínas altamente glicosiladas) y los carbohidratos que componen la LL son O-glicanos del tipo mucina. Por otra parte, en el caso de *E. granulosis* (pero no en *E. multilocularis* ni *E. vogeli*) existen depósitos de inositol-hexakisfosfato de calcio en la LL, aunque su función se desconoce (Díaz et al., 2011).



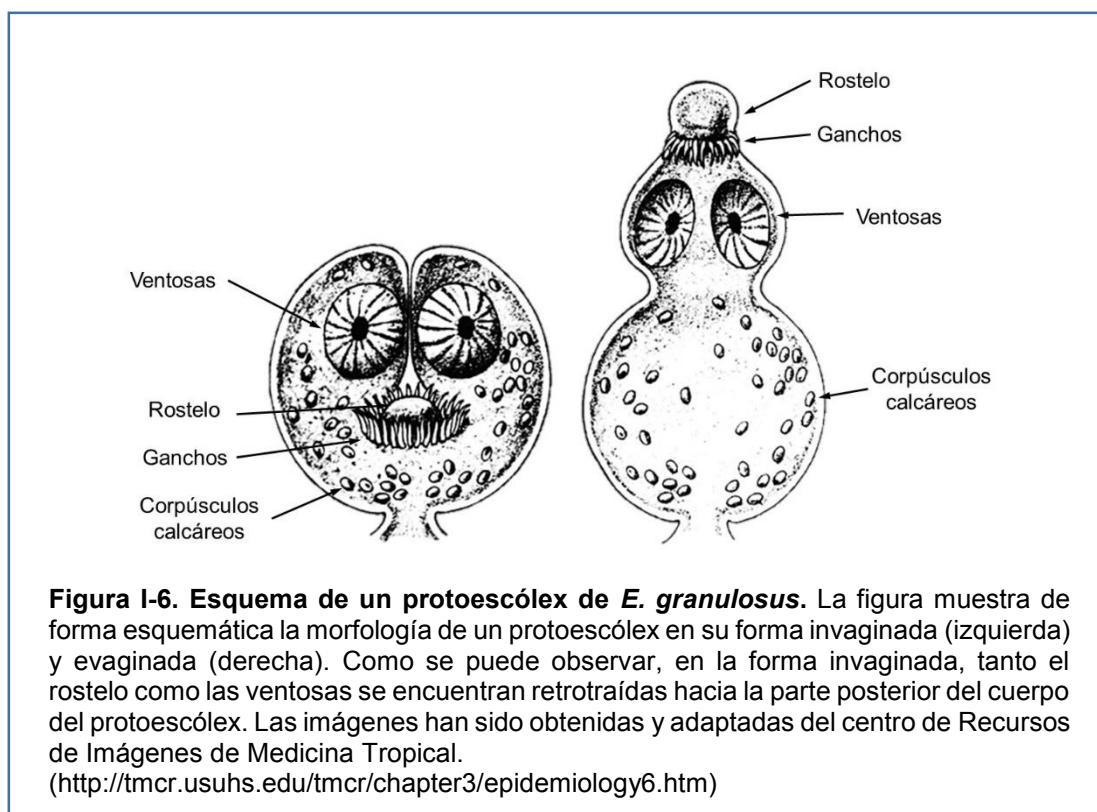
Los metacestodos de las otras especies del género *Echinococcus* tienen una estructura similar al metacestodo de *E. granulosis*, pero presentan ciertas variaciones. *E. vogeli* y *E. oligartha* se diferencian en que sus metacestodos tienden a formar quistes con múltiples cámaras, de allí que se llame hidatidosis poliquística a la enfermedad causada por estos cestodos en sus hospedadores intermediarios. En cuanto a *E. multilocularis*, su metacestodo se desarrolla (principalmente en el hígado) como una especie de laberinto de vesículas. A medida que crece, el metacestodo se infiltra en los tejidos del hospedador pudiendo incluso generar metástasis y originar focos de crecimiento del parásito en otros órganos, lo que hace que la hidatidosis alveolar sea una enfermedad mucho más agresiva y letal que la hidatidosis quística (Ver Figura I-5). Recientemente, se han descrito elementos musculares y nerviosos en la CG de *E. multilocularis*. Si bien el quiste es una estructura inmóvil y se desconoce qué función cumplirían las fibras musculares, se cree que estarían vinculadas con la invaginación de la CG en la formación de las vesículas prolíferas. En cuanto a las fibras nerviosas, se ha

propuesto que podrían ser parte de un sistema neuroendócrino que regule el desarrollo de la larva de *E. multilocularis* (Kozioł et al., 2013).

A diferencia de lo que ocurre en *E. granulosus*, la LL generada en los metacestodos de *E. vogeli* y *E. multilocularis* ronda los 400µm y los 10-12µm de espesor, respectivamente (Díaz et al., 2011).

#### 1.3.3.4. Protoescólex

Los protoescólices se generan por brotación a partir de la CG, en un proceso clonal y asincrónico. Durante el desarrollo de los protoescólices, los mismos se encuentran unidos a la membrana germinativa mediante un tallo, o pedúnculo, del cual pueden liberarse una vez alcanzado su desarrollo completo. Morfológicamente, el protoescólex consiste en un escólex con un roseto armado y cuatro ventosas, muy similar a lo que es el escólex del cestodo adulto, sólo que normalmente se encuentra invaginado en la parte posterior del cuerpo (Ver Figura I-6). El sistema nervioso de los protoescólices se asemeja mucho al del cestodo adulto (Kozioł et al., 2013). Por otra parte, en los protoescólices completamente desarrollados es evidente la presencia de corpúsculos calcáreos, que desaparecen al desarrollarse el adulto (Martínez et al., 2005).



Como se mencionó al hablar del ciclo de vida de *Echinococcus* spp., los protoescólices son el estadio infeccioso para los hospedadores definitivos. Al ser el metacestodo ingerido por un

hospedador adecuado, se liberan los protoescólices, los cuales se evaginan, activados por enzimas digestivas, cambios de pH, sales biliares, etc.; para finalmente desarrollarse al estadio adulto. No obstante, es muy importante destacar la gran plasticidad fenotípica que poseen los protoescólices. No sólo son capaces de desarrollarse hacia el estadio adulto al ser ingeridos por el hospedador definitivo, sino que, si se liberan del metacestodo (por ruptura del quiste) son capaces de desarrollar nuevos metacestodos en los órganos del hospedador intermediario.

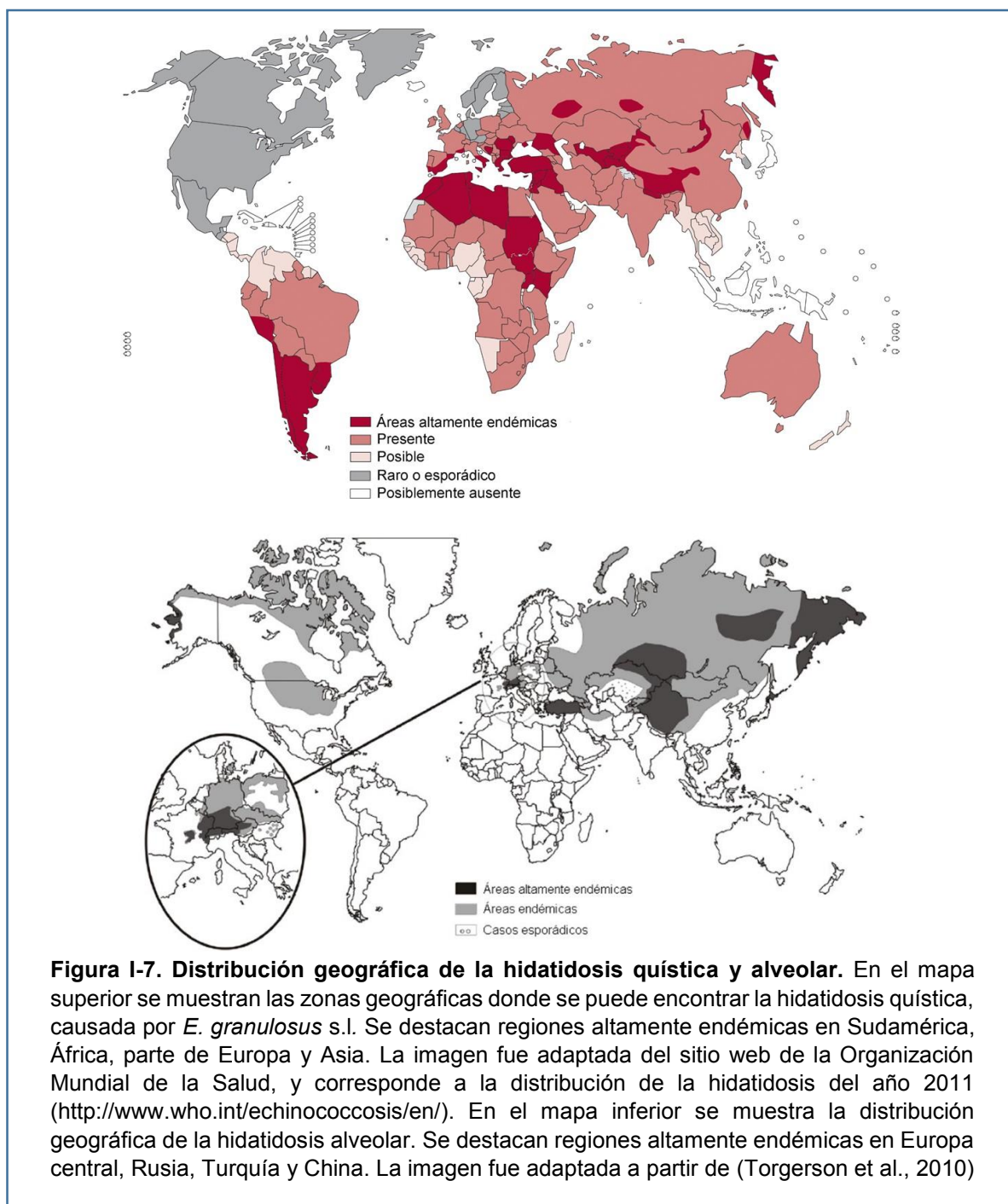
#### 1.3.4. Distribución geográfica de la hidatidosis

Si bien la hidatidosis quística tiene una distribución prácticamente global, existen ciertas regiones altamente endémicas para dicha parasitosis (*Ver Figura 1-7*). Entre ellas se puede mencionar el cono sur de Sudamérica, el norte de África, el sur y este de Europa, la zona este del mar Mediterráneo, Siberia, Asia central y el oeste de China (Crompton, 2013). Es importante recordar que actualmente se ha determinado la existencia de varias especies causantes de hidatidosis quística, las cuales previamente eran consideradas cepas o genotipos de *E. granulosus*. Teniendo en cuenta ese escenario, es posible delinear la distribución geográfica de las diferentes especies, a saber: *E. granulosus* s.s. (Genotipo G1) está presente en Australia, Europa, Estados Unidos, Nueva Zelanda, África, Sudamérica y Rusia; *E. granulosus* s.s. (G2) en Tasmania y Argentina; *E. granulosus* s.s. (G3) en Asia; *E. equinus* (G4) en Europa, Oriente Medio y Sudáfrica; *E. ortleppi* (G5) en Europa, Sudáfrica, India, Rusia y Sudamérica; *E. canadensis* (G6/G7) en Europa, África y Sudamérica; *E. canadensis* (G8/G10) en América del Norte y el norte de Europa y Asia (Alvarez Rojas et al., 2014; Thompson & McManus, 2002).

La hidatidosis alveolar, por su parte, se encuentra exclusivamente distribuida en el hemisferio norte, existiendo focos endémicos muy importantes en China, en donde se han registrado zonas con hasta un 5% de la población humana infectada. Asimismo, se ha detectado un aumento del número de casos reportados de hidatidosis alveolar en Suiza, que parecen estar relacionados con el aumento en la población de zorros (Torgerson et al., 2010).

En cuanto a la hidatidosis poliquistica, producida por *E. vogeli* y *E. oligarthra*, se puede decir que su impacto en la salud humana es significativamente menor que el de las dos especies antes mencionadas. Dicha situación parece estar relacionada con el hecho de que los ciclos selváticos de los cestodos causantes de las echinococosis neotropicales se encuentran prácticamente aislados de la población humana. No obstante, existe la posibilidad de que el riesgo aumente si los animales domésticos, principalmente perros y gatos, entran en contacto con los hospedadores intermediarios de *E. vogeli* y *E. oligarthra* (respectivamente). Dicha situación podría aumentar las probabilidades de infección de los

pobladores de las regiones endémicas para estos cestodos, que abarcan zonas de América central y del sur donde habitan sus respectivos hospedadores (D'Alessandro & Rausch, 2008).





### 1.3.5. Importancia de la hidatidosis quística en nuestra región

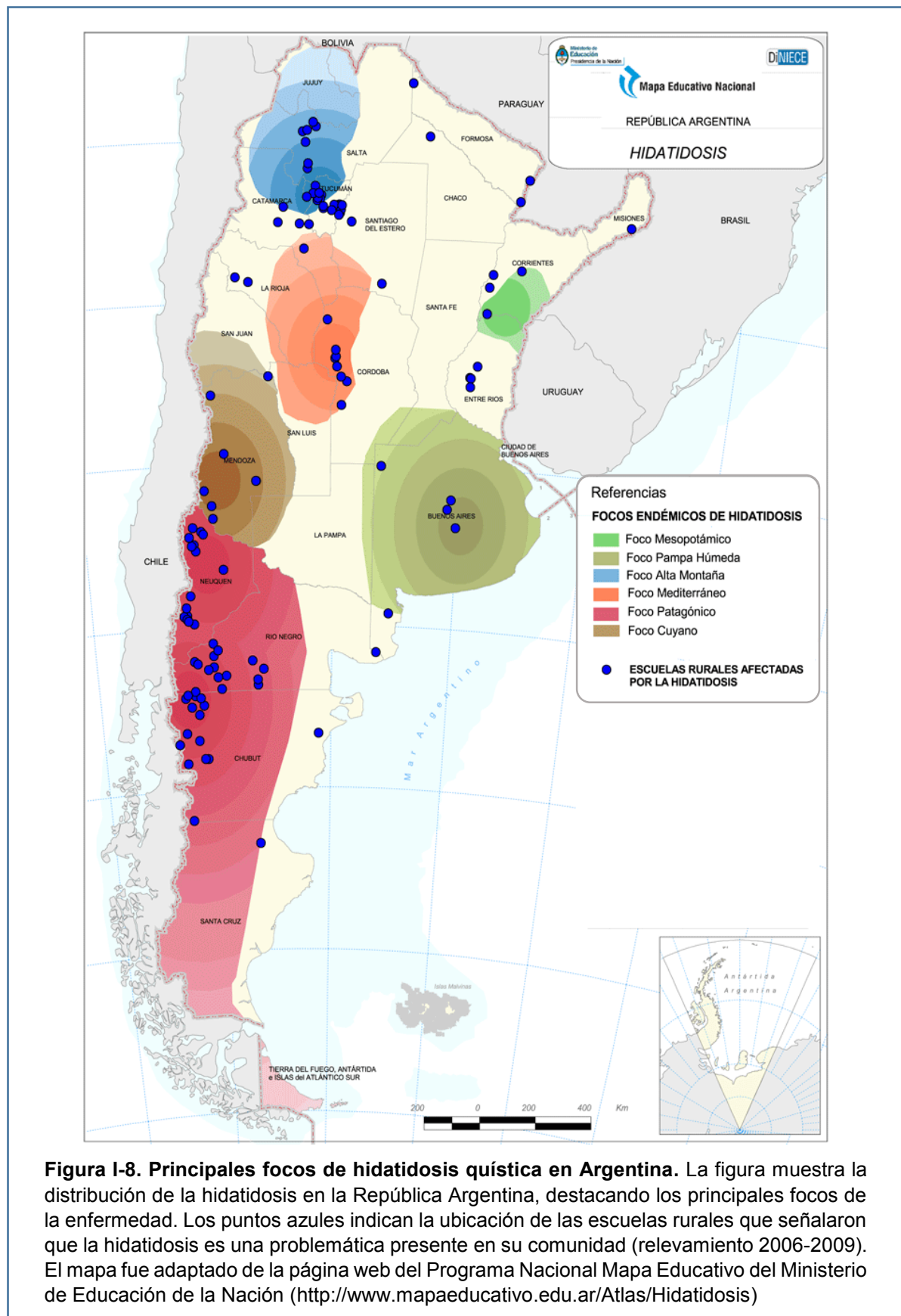
Teniendo en cuenta los posibles hospedadores intermediarios de *E. granulosus* s.l. y la importancia de las actividades ganaderas en los países de la región, no sorprende que tanto Argentina, como Uruguay, Brasil y Chile representen una zona altamente endémica para la hidatidosis.

En el caso de Argentina, la hidatidosis está distribuida prácticamente en todo el territorio nacional, con mayor prevalencia en zonas rurales y, en particular, en regiones de cría de ganado ovino y caprino, aunque también afecta regiones de cría de ganado bovino y porcino. Se calcula que el ciclo zoonótico de *E. granulosus* se localiza en un 30% del territorio argentino, lo que representa un área endémica de cerca de 1.211.912km<sup>2</sup>. No obstante, la distribución no es uniforme en todo el territorio, sino que existen provincias afectadas en toda su extensión y otras sólo parcialmente (*Ver Figura 1-8*). Los mayores focos endémicos de hidatidosis en Argentina se localizan en las Áreas: Patagónica (Tierra del Fuego, Santa Cruz, Chubut, Río Negro y Neuquén), de la Pampa Húmeda (Provincia de Buenos Aires, sur de Santa Fe y Córdoba), Mesopotámica (territorio de Corrientes, al sur del río Corrientes, y norte de Entre Ríos hasta el eje La Paz, Federal y Concordia), Cuyana (Provincia de Mendoza y oeste de San Juan), Mediterránea (parte de las provincias de Córdoba, Santiago del Estero, San Luis, La Rioja, Catamarca y San Juan), y de Alta Montaña del Noroeste (Tucumán, Salta, Jujuy y noroeste de Catamarca) (Moral, 2012).

Los análisis de los genotipos (algunos de ellos considerados hoy especies diferentes) de *E. granulosus* presentes en el territorio argentino han podido identificar la presencia de G1 y G2 (*E. granulosus* s.s.), G5 (*E. ortleppi*), G6 y G7 (*E. canadensis*). Dado que los análisis de genotipificación no se han realizado con fines epidemiológicos, sino que se efectuaron a muestras recolectadas en hospitales de alta complejidad y/o mataderos rurales, por solicitud de estos, no se han podido calcular prevalencias e infectividades por especies (Guarnera, 2009). De hecho, de esos estudios parecía desprenderse que el genotipo G7 no era infectivo para el humano, y recientemente se ha establecido que hay infecciones humanas causadas por *E. canadensis* (G7) en diversos países (Alvarez Rojas et al., 2014).

Desde el punto de vista de la salud pública, la hidatidosis es un problema grave en las zonas endémicas, especialmente en aquellas vinculadas a actividades agroganaderas, y más aún en zonas de bajos recursos. La hidatidosis es una enfermedad crónica, que no sólo puede ser mortal, sino que puede generar diversos grados de discapacidad que varían tanto en gravedad como en duración. La gravedad de la enfermedad varía mucho de acuerdo a la localización del quiste hidático. Por ejemplo, los quistes hepáticos suelen ser asintomáticos durante mucho tiempo, aun cuando desarrollen un tamaño importante, mientras que los quistes cerebrales u oculares pueden traer grandísimas complicaciones incluso siendo

pequeños; esto explica por qué los quistes intracerebrales suelen detectarse en niños, mientras que los hepáticos se registran a edades más avanzadas (Moro & Schantz, 2009).



En cuanto al impacto económico de la hidatidosis quística en la región, se ha estimado que las pérdidas monetarias debidas a la infección del ganado oscilarían aproximadamente entre los 44 y 66 millones de dólares anuales. Haciendo correcciones por la estimación de casos no reportados, las pérdidas rondarían entre los 77 y 115 millones de dólares. Estas pérdidas se deben al decomisado de hígados infectados, la disminución en la producción de carne, leche, lana y de la fecundidad de los animales enfermos, entre otros factores. Por su parte, las estimaciones de pérdidas económicas anuales por hidatidosis quística en humanos oscilan entre los 15 y 30 millones de dólares, dependiendo de los métodos aplicados para realizar el cálculo. Para estimar las pérdidas monetarias por la enfermedad en humanos se consideran tanto los gastos de tratamientos como la pérdida de salarios relacionada a la incapacidad que genera en algunos casos la enfermedad (Irabedra & Roig, 2007).

En varios de los países de la región existen, o existieron, programas de control y vigilancia de la hidatidosis, tendientes a reducir la prevalencia de la enfermedad. Muchos de ellos se han basado en la administración de drogas antihelmínticas (Praziquantel) a los perros de regiones altamente endémicas ocho veces al año, con la finalidad de evitar que el parásito llegara a su estado grávido y pudiera esparcir sus huevos en el ambiente. Estos programas enfrentan, sin embargo, graves complicaciones para poder llegar a ser completamente exitosos. Los mismos tienen amplios requerimientos de vehículos y recursos humanos para lograr desparasitar ya sea a grandes poblaciones de perros, o poblaciones pequeñas pero muy dispersas. Sumado a eso, los accesos a las zonas de mayor prevalencia de hidatidosis muchas veces son bastante precarios, dificultando aún más las tareas de control. No obstante las complicaciones técnicas, han habido algunos avances en el control de la hidatidosis en ciertas regiones, como Uruguay y las provincias argentinas de Tierra del Fuego, Neuquén y Río Negro. En algunos casos, aunque la enfermedad siga afectando al ganado y los perros permanezcan parasitados, se ha logrado disminuir la prevalencia de la hidatidosis en humanos mediante programas de educación sanitaria, detección y tratamiento temprano de los infectados. Cabe destacar que el más grande desafío que deben vencer los programas de control, aparte de las complicaciones técnicas y logísticas, es la continuidad en el tiempo, ya sea por decisiones económicas y/o políticas. En regiones de Chile, por ejemplo, se han suspendido programas de control de la hidatidosis que estaban progresando con éxito (Larrieu & Zanini, 2012).

Recientemente, en la Provincia de Río Negro, se ha realizado una prueba de campo, en ovejas, de la vacuna EG95. Esta vacuna se basa en una proteína recombinante de la oncosfera de *E. granulosus* (Jabbar et al., 2011). Los resultados han sido prometedores, y han mostrado protección frente a la infección por *E. granulosus* en animales de hasta tres años. No obstante, aún se requieren más estudios que confirmen que los animales se mantienen protegidos durante toda su vida productiva (Larrieu et al., 2013). Cabe destacar

que si bien la aplicación de la vacuna EG95 no está exenta de complicaciones técnicas, de infraestructura y económicas, la misma representa una herramienta más en la lucha contra la hidatidosis.

### **1.3.6. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis**

El diagnóstico de hidatidosis se lleva a cabo mediante examen clínico, diagnóstico por imágenes y serología. En las etapas iniciales del desarrollo de la hidatidosis normalmente no se presentan síntomas, razón por la cual la hidatidosis suele diagnosticarse en adultos en los que el/los quiste/s han crecido durante varios años. La aparición de los síntomas puede variar mucho dependiendo de cuál sea el órgano afectado y de la posición y tamaño del quiste en dicho órgano. Asimismo, pueden surgir complicaciones debidas a rupturas del quiste que pueden generar infecciones secundarias en otros tejidos del hospedador (debido a la plasticidad fenotípica antes mencionada de los protoescólices). La ruptura del quiste puede provocar también reacciones anafilácticas y otras complicaciones sumamente peligrosas para la salud.

Una de las herramientas más útiles para el diagnóstico de la hidatidosis es la ecografía, la cual permite el diagnóstico, clasificación (existe un sistema estandarizado de clasificación por ecografía de los quistes hidáticos, establecido por la Organización Mundial de la Salud) y seguimiento de los quistes, aunque la sensibilidad es baja para quistes de pequeño tamaño. Otras técnicas de imágenes, como la resonancia magnética y la tomografía, son usadas también para el diagnóstico.

Las pruebas serológicas constituyen también una herramienta útil para el diagnóstico y seguimiento de la hidatidosis. No obstante, a pesar de su uso muy difundido, aún existen dudas sobre su eficacia, ya que la misma parece variar con la localización, tamaño y estado del quiste. Asimismo, se ha reportado reacción cruzada con antígenos propios de otras helmintiasis, cirrosis hepáticas y ciertos tipos de cáncer, lo cual pone en duda su especificidad.

Respecto al tratamiento de la hidatidosis quística, existen cuatro posibilidades, dependiendo del estado de los quistes: cirugía, esterilización percutánea, tratamientos con drogas u observación.

La cirugía es el tratamiento más habitual y, si bien suele ser efectivo, no garantiza que no se produzca recurrencia. Se aplica a quistes grandes, a quistes infectados, propensos a ruptura o localizados en órganos importantes. Por otra parte, es más difícil de aplicar en pacientes con múltiples quistes en diversos órganos.

Las técnicas de esterilización percutánea incluyen a PAIR (Punción, aspiración, inyección y reaspiración), que destruye la capa germinativa del quiste; y cateterismos modificados, que remueven la totalidad del quiste. La técnica de PAIR involucra una punción percutánea del

quiste (asistida por ultrasonido), la aspiración del contenido, inyección de algún protoescolicida adecuado, y reaspiración luego de 15 a 20 minutos. Un choque anafiláctico es un posible riesgo de aplicar esta técnica. Este tratamiento se acompaña de administración de drogas antihelmínticas para prevenir quistes secundarios.

Los fármacos antiparasitarios que se utilizan para el tratamiento de la hidatidosis se conocen como benzimidazoles, en particular se utilizan el mebendazol y el albendazol, siendo este último el más usado actualmente. Estas drogas son más efectivas para el tratamiento de quistes pequeños, no siendo útiles para tratar quistes de más de 10cm de diámetro. Los benzimidazoles poseen también efectos secundarios no deseados asociados a su uso prolongado.

Finalmente, en algunos casos de quistes no complicados, se opta por la estrategia de observación, ya que muchas veces los quistes terminan calcificándose y volviéndose totalmente inactivos, sin generar inconvenientes mayores.

En el caso de *E. multilocularis*, las posibilidades de tratamiento se reducen a la cirugía (con administración posterior de drogas para prevenir recurrencias), o bien a la administración por largos períodos de benzimidazoles, para los casos que no pueden ser operados. Estas drogas inhiben la proliferación de la larva, pero no la matan. En casos terminales de hidatidosis alveolar se han llevado a cabo trasplantes hepáticos, pero el uso de inmunosupresores asociado a este tipo de intervenciones puede estimular el crecimiento del parásito en caso de no haberse removido por completo (McManus et al., 2012).

De lo antes mencionado se desprende claramente que, a pesar de los avances obtenidos en la lucha contra la hidatidosis, aún resta mucho por hacer en lo que respecta al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Sobre todo teniendo en cuenta que algunas de las alternativas existentes, aunque eficaces, requieren de una gran infraestructura para ser llevadas a cabo o poseen costos muy elevados, siendo que las personas más vulnerables a esta enfermedad suelen ser las de menores recursos. Por ejemplo, la técnica PAIR debe ser llevada a cabo por equipos altamente capacitados, capaces de lidiar con un choque anafiláctico. Asimismo, el costo de los benzimidazoles y las preocupaciones respecto a su eficacia hacen que se necesiten nuevas drogas para tratar esta enfermedad (McManus et al., 2012).

Debe tenerse en cuenta que para poder llevar a cabo el desarrollo de drogas específicas contra la hidatidosis que reduzcan el uso de terapias invasivas, es de suma necesidad ampliar nuestro conocimiento en lo que respecta a la biología del parásito, los factores que favorecen su establecimiento, su relación con el hospedador y otras variables que permitan interrumpir su desarrollo, y por consiguiente, el de la enfermedad.

## 1.4 Metabolismo de *Echinococcus* spp. y otros cestodos

El profundizar en el conocimiento del metabolismo de los cestodos no sólo es importante, e interesante, desde el punto de vista básico, sino que de él pueden llegar a desprenderse estrategias que permitan intervenir en el establecimiento y desarrollo de estos parásitos en sus hospedadores, y por ende contribuir al control de la hidatidosis y el impacto que ella genera sobre la salud de la población. A continuación se hará una descripción de algunos aspectos del metabolismo general de los cestodos que ayudarán a comprender el motivo por el cual resulta de interés el estudio de las FABPs de estos organismos. Cabe destacar que la información disponible acerca del metabolismo de los cestodos ha surgido del estudio de diversas especies, principalmente de *Hymenolepis diminuta*. No obstante, se ha visto que algunas vías estudiadas también en otros cestodos (incluyendo *Echinococcus* spp.) se asemejan notablemente a las de *H. diminuta* e inclusive a las de parásitos trematodos como *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni*. Esto quizás se deba al hecho de que, esencialmente, todos los platelmintos mencionados están perfectamente adaptados a su estilo de vida parasitario, por lo que muchas de sus adaptaciones resultan ser comunes a las diferentes especies.

### 1.4.1. Metabolismo general y obtención de energía

Hasta el momento es ampliamente aceptado el concepto de que la fuente de energía por excelencia de los platelmintos parásitos son los hidratos de carbono, siendo el glucógeno la forma de almacenamiento de los mismos. Estas reservas le permiten a los parásitos subsistir durante las etapas de sus ciclos de vida en las que se encuentran fuera del hospedador (huevos, en el caso de *Echinococcus*), así como durante los períodos de ayuno del hospedador, en los que la concentración de glucosa en el intestino son bajas, como se ha determinado para *H. diminuta* (Maule & Marks, 2006).

Respecto a los mecanismos utilizados para la obtención de energía, se considera que los estadios de vida libre de los parásitos utilizan vías aeróbicas para catabolizar las reservas endógenas de las cuales se suplieron mientras se encontraban en su hospedador. El camino seguido para la degradación de las reservas de glucógeno consiste en la vía clásica de glucólisis de Embden-Meyerhof, la oxidación de piruvato a acetil-coenzima A (acetil-CoA) dentro de las mitocondrias por acción del complejo de la piruvato deshidrogenasa, y la posterior oxidación del acetil-CoA a CO<sub>2</sub> mediante las reacciones del ciclo de Krebs. El ATP es formado, en su mayor parte, por fosforilación oxidativa acoplada a la cadena de transporte

de electrones mitocondrial, aunque obviamente existen también reacciones donde se produce ATP por fosforilación a nivel de sustrato (Maule & Marks, 2006; Smyth & McManus, 2007).

En el caso de los parásitos adultos, los mismos no degradan los hidratos de carbono hasta  $\text{CO}_2$ , sino que generan una cierta variedad de compuestos (dependiendo de qué especie se trate) como resultado de procesos fermentativos. Existen dos vías fermentativas principales: la glucólisis anaeróbica y la dismutación del malato.

La glucólisis anaeróbica, la cual genera lactato como producto final y rinde 2 ATP por molécula de glucosa, se lleva a cabo por la vía clásica de Embden-Meyerhof. *E. granulosus* se encuentra dentro del grupo de parásitos que libera una cantidad considerable de lactato. Si bien todos los platelmintos parásitos utilizan en cierta medida la glucólisis anaeróbica, en la mayoría de los casos es la otra vía (dismutación del malato) la que resulta de mayor relevancia.

En la vía de dismutación del malato, se degrada la glucosa, vía glucólisis, hasta fosfoenolpiruvato (PEP). Luego, el PEP es carboxilado por acción de la enzima PEP carboxiquinasa (PEPCK, por sus siglas en inglés) a oxalacetato, el cual es luego reducido a malato. El malato es transportado a la mitocondria, en donde una porción del malato se oxida a acetato y otra se reduce a succinato, pudiendo formarse luego, en algunas especies, propionato. En la rama oxidativa de esta vía, el malato pasa a piruvato por acción de la enzima málica, y luego el piruvato se oxida a acetil-CoA por acción del complejo de la piruvato deshidrogenasa, que estaría adaptado, en los helmintos parásitos, a actuar en condiciones anaeróbicas. En algunos parásitos se ha determinado que el acetil-CoA pasa luego a acetato mediante la acción de una enzima llamada acetato:succinato CoA-transferasa (ASCT). El succinil-CoA generado por la ASCT pasa luego a succinato, y genera energía en forma de ATP (o GTP) por acción de la enzima succinil-CoA sintetasa (la misma que normalmente forma parte del ciclo de Krebs). Teniendo en cuenta que la dismutación del malato es una vía fermentativa, el balance neto de poder reductor debe ser nulo, por lo que el NADH generado en la oxidación del malato a acetato debe reoxidarse. Para ello, parte del malato es reducido a succinato por una serie de reacciones que revierten, en parte, algunas de las reacciones del ciclo de Krebs. La proporción de succinato:acetato debe ser de 2:1 para mantener el balance redox. La reducción de fumarato a succinato, catalizada por la fumarato reductasa (que forma parte de una cadena de transporte de electrones), está asociada a la síntesis de ATP. Para poder reducir fumarato a succinato, estos organismos cuentan además con una quinona (diferente a la ubiquinona de la cadena de transporte de electrones "convencional") denominada rodoquinona. Algunos platelmintos parásitos metabolizan el succinato obtenido por esta vía hasta propionato, siguiendo el camino inverso al que se produce en otros organismos para formar succinil-CoA a partir de propionil-CoA, por ejemplo en la degradación de ácidos grasos con número impar de carbonos. Este no parece ser el caso para

*Echinococcus*, el cual se ha reportado que excreta succinato y acetato, aparte de lactato, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Maule & Marks, 2006; Smyth & McManus, 2007). La degradación anaeróbica de la glucosa hasta propionato y acetato, mediante la vía de dismutación del malato que se da en algunos platelmintos parásitos, genera unas 5 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Este rendimiento energético es mayor que el alcanzado mediante la glucólisis anaeróbica hasta lactato, que genera 2 ATP por molécula de glucosa. Algunos estudios han demostrado que el estadio larval de *E. granulosus* posee la vía de las pentosas y que alrededor de un 20% de la glucosa utilizada *in vitro* por este organismo sería a través de esta vía (Smyth & McManus, 2007).

Como se ha dicho antes, los platelmintos parásitos dependerían exclusivamente de los hidratos de carbono como sustratos para obtención de energía. Si bien los estadios de vida libre, en teoría, tendrían capacidad aeróbica y la posibilidad de oxidar ácidos grasos, esto no ha podido ser demostrado. Por otra parte, los aminoácidos no parecen hacer una contribución importante a la obtención de energía por parte de estos organismos, aunque sí son necesarios para la síntesis de sus proteínas (Maule & Marks, 2006).

Respecto a los nucleótidos, se ha observado que algunos cestodos son capaces de sintetizar pirimidinas *de novo*, aunque los nucleótidos purínicos deberían ser incorporados a partir del hospedador. Las purinas libres pueden incorporarse por vías de salvataje (Smyth & McManus, 2007).

En cuanto a los lípidos, la mayoría de estos compuestos no pueden ser sintetizados *de novo* por los cestodos, por lo que dependen de los hospedadores para adquirir estos nutrientes fundamentales.

Recientemente, con la publicación de los genomas de *E. granulosus* y *E. multilocularis*, se ha obtenido mayor información que respalda lo observado previamente. Entre otras, las vías de síntesis y degradación de muchos lípidos estarían ausentes en estos organismos, así como muchas de las vías de síntesis de aminoácidos y nucleótidos (Tsai et al., 2013; H. Zheng et al., 2013).

A continuación se presenta una descripción un poco más detallada del conocimiento actual sobre el metabolismo lipídico de los cestodos.

#### **1.4.2. Metabolismo de lípidos**

Desde el punto de vista energético, como se ha dicho, los lípidos no serían un sustrato importante en los platelmintos parásitos. No obstante, dadas las múltiples funciones que poseen los lípidos en las células, se hará una breve descripción de la información disponible respecto al metabolismo de estos compuestos.



Tal vez la función más evidente de los lípidos sea la de formar las membranas biológicas que delimitan a las células y sus compartimentos intracelulares, siendo el colesterol y los fosfolípidos los principales componentes lipídicos de las mismas. Estos compuestos no son sintetizados *de novo* por los platelmintos parásitos, sino que son obtenidos directamente a partir del hospedador (colesterol) o formados a partir de precursores más simples obtenidos también del hospedador (ácidos grasos y grupos polares para la síntesis de fosfolípidos).

Estudios en *E. granulosus* han revelado que, si bien este parásito posee algunas enzimas de la vía del mevalonato, el mismo es incapaz de sintetizar colesterol. Se supone que los platelmintos parásitos utilizarían dicha vía para la síntesis de quinonas (como la rodoquinona) e isoprenoides para prenilación de proteínas, o bien con funciones hormonales (Digenis et al., 1970; Frayha, 1974; Maule & Marks, 2006; Smyth & McManus, 2007). Se ha observado también actividad esterasa en protoescólices de *E. granulosus* (Digenis et al., 1970), y se ha demostrado que el mismo es capaz de captar colesterol radiactivo a partir del hospedador en infecciones secundarias (Frayha, 1968). Se cree, por lo tanto, que dicho nutriente podría incorporarse en forma de ésteres de colesterol y luego ser liberado dentro de los tejidos parasitarios (Digenis et al., 1970).

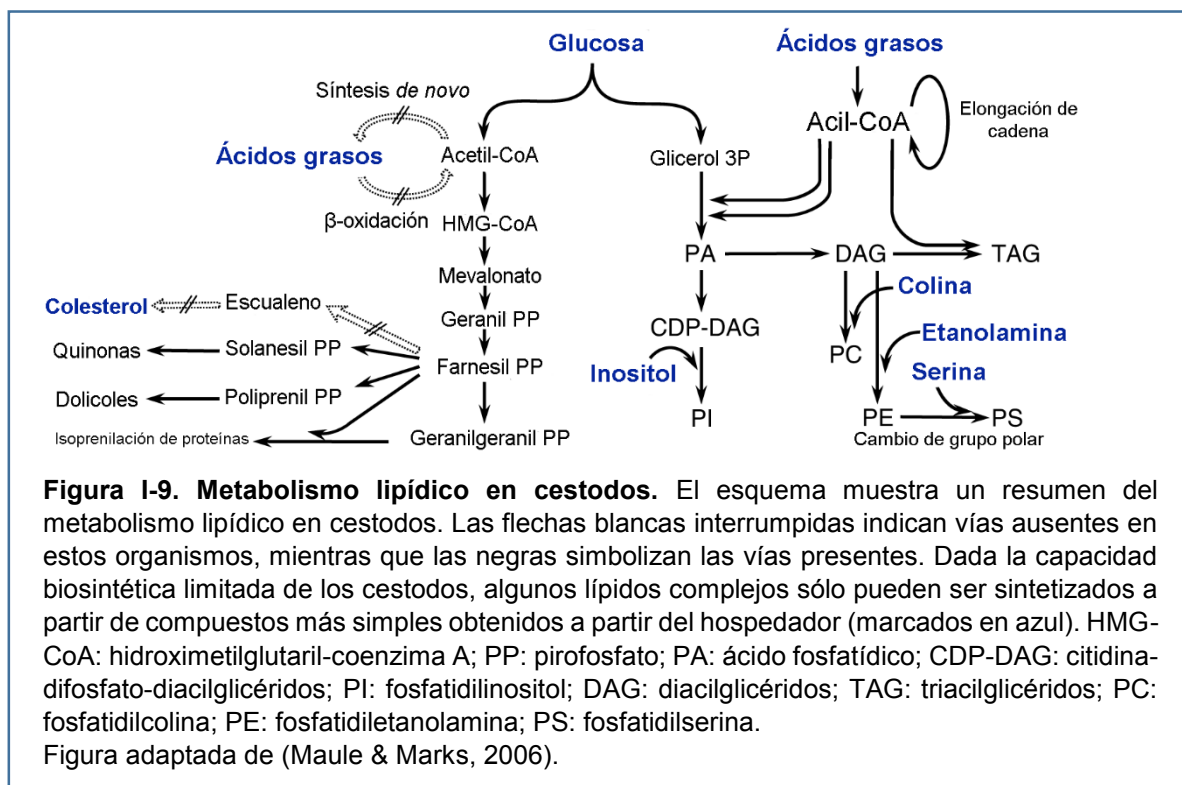
En algunos cestodos se han observado gotas lipídicas en las células del tegumento. Se cree que las mismas contendrían depósitos de lípidos para síntesis de membrana, ya que, como se dijo previamente, los lípidos no serían un sustrato para obtención de energía en estos organismos (Smyth & McManus, 2007).

En lo que respecta a los ácidos grasos, los cestodos son incapaces de sintetizarlos *de novo* a partir de acetil-CoA. Sólo pueden elongar ácidos grasos obtenidos a partir del hospedador. Si bien la elongación de los ácidos grasos ocurriría por adición secuencial de moléculas de acetil-CoA, se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre. En algunas especies de cestodos se ha detectado síntesis de prostaglandinas. Estos lípidos inmunomoduladores derivan de ácidos grasos insaturados de cadena larga, y podrían estar involucrados en la defensa de estos parásitos frente al ataque del sistema inmune del hospedador (Smyth & McManus, 2007).

Los fosfolípidos, como se mencionó previamente, parecen ser sintetizados en cestodos a partir de ácidos grasos y grupos polares obtenidos a partir del hospedador. Por lo demás, la síntesis de fosfolípidos en cestodos no parece tener particularidades que los diferencien en gran medida de otros organismos (Maule & Marks, 2006; Smyth & McManus, 2007). En *E. granulosus*, los fosfolípidos principales son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (Frayha et al., 1980). En la *Figura 1-9* se muestra un esquema de las vías descritas.

Frente a este panorama, y teniendo en cuenta su estilo de vida parasitario, resulta natural pensar en que los cestodos, y *Echinococcus* spp. en particular, deben haber desarrollado

mecanismos para la obtención de los compuestos hidrofóbicos que toman de sus hospedadores. Asimismo, dada la insolubilidad en agua de los lípidos, *Echinococcus* spp., al igual que otros organismos, debe depender de proteínas de unión a lípidos que le permitan transportarlos y distribuirlos entre sus tejidos o dentro de sus células. En relación a este aspecto, en cestodos se han descrito dos familias de proteínas de unión a lípidos: las FABPs, y las proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBPs, por sus siglas en inglés). De estas



dos familias de proteínas, la de las HLBPs es exclusiva de cestodos, mientras que la de las FABPs se encuentra ampliamente representada en el reino animal. A continuación se hará una descripción de las características principales de las mismas.

### 1.5 Proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBPs)

La familia de las HLBPs está compuesta por un conjunto de proteínas específicas de cestodos dentro de las cuales se pueden considerar dos clases, las HLBPs intracelulares y las HLBPs secretadas al medio extracelular. Dentro del primer grupo se pueden mencionar MeHLBP descrita en *Moniezia expansa* y H-HLBP, de *Hymenolepis diminuta*; mientras que

TsHLBP de *Taenia solium* y el Antígeno B (EgAgB) de *E. granulosus* pertenecen a las HLBP que poseen secuencias señales de secreción (Alvite & Esteves, 2012).

Las HLBP son lipoproteínas de alto peso molecular cuya fracción proteica está compuesta por subunidades monoméricas ricas en  $\alpha$ -hélices de entre 7 y 11kDa aproximadamente. Estas lipoproteínas son muy abundantes en cestodos y son altamente inmunogénicas, razón por la cual han sido ampliamente estudiadas como posibles elementos de diagnóstico de infecciones causadas por dichos organismos. No obstante, su rol como lipoproteínas participantes del metabolismo lipídico de los cestodos o su posible función en la relación parásito-hospedador ha sido menos explorado.

En el caso particular de EgAgB, esta lipoproteína fue encontrada en el líquido hidático de *E. granulosus* (siendo uno de los componentes mayoritarios de dicho líquido), aunque está presente también en protoescólices y capa germinativa. EgAgB es uno de los antígenos que se usan hoy en día para el diagnóstico serológico de la hidatidosis. El hecho de que genere respuesta inmune en el hospedador hace pensar que esta lipoproteína podría salir del quiste y estar en contacto con tejidos del hospedador. No obstante, aún no hay evidencia clara de que esto sea así (Silva-Álvarez et al., 2015a).

Tal como se mencionó, EgAgB es una lipoproteína, y como tal, está compuesta por varias subunidades proteicas y por una amplia variedad de lípidos. El componente proteico del EgAgB consiste en varias subunidades codificadas por una familia de genes altamente polimórficos. Esta familia incluye al menos cinco grupos de genes denominados EgAgB1-EgAgB5. El número de genes codificantes para las subunidades del EgAgB ha sido motivo de debate, pero en base a los datos obtenidos a partir del análisis genómico de *E. granulosus* se ha propuesto la existencia de 7 genes, 3 de los cuales serían copias, con pequeñas diferencias entre sí, de EgAgB3. Datos similares se han obtenido a partir del genoma de *E. multilocularis* (Tsai et al., 2013). Todos los genes poseen estructuras similares con dos exones, el primero de los cuales codifica para un péptido señal de secreción, mientras que el segundo codifica la subunidad madura de 8kDa, tradicionalmente denominadas EgAgB8/1-EgAgB8/5. Cuando se comparan las secuencias aminoacídicas de las subunidades de EgAgB, se encuentra que los miembros de EgAgB1, EgAgB3 y EgAgB5 se parecen más entre sí que a los miembros de EgAgB2 y EgAgB4, y viceversa (Silva-Álvarez et al., 2015a, 2015b). Tal como se ha mencionado, la estructura secundaria de las subunidades de EgAgB es predominantemente  $\alpha$ -helicoidal. Mediante modelado molecular se ha encontrado que la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos generaría sitios de unión a ligandos hidrofóbicos. Asimismo, la distribución de cargas sería compatible con la agregación de las subunidades (Silva-Álvarez et al., 2015a).

El componente lipídico de EgAgB ha sido bastante menos estudiado que la parte proteica de dicha lipoproteína. Inicialmente, los estudios se habían enfocado en tratar de determinar,

principalmente mediante el empleo de sondas fluorescentes, qué clase de lípidos eran capaces de unir las subunidades de EgAgB. De esta manera, se encontró que los ácidos grasos eran candidatos a ser unidos por las apolipoproteínas que componían el EgAgB. No obstante, estudios posteriores en donde se analizaron los lípidos extraídos de las partículas de EgAgB purificado a partir de líquido hidático demostraron que la mezcla de ligandos de la lipoproteína era mucho más compleja. Esos análisis permitieron determinar que dentro de la fracción lipídica del EgAgB podían encontrarse tanto lípidos muy poco polares, como triglicéridos y ésteres de colesterol, como una amplia variedad de fosfolípidos, siendo la fosfatidilcolina el más abundante. Asimismo, el análisis de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos complejos demostró que los ácidos palmítico, esteárico y oleico son los más abundantes dentro del EgAgB. En conjunto, los resultados obtenidos hacen pensar en que la disposición de los lípidos y proteínas que componen el EgAgB podría ser similar a la que se encuentra en las lipoproteínas plasmáticas de los vertebrados o de la hemolinfa de invertebrados, es decir, un núcleo hidrofóbico compuesto de triglicéridos y ésteres de colesterol, rodeado de fosfolípidos, colesterol no esterificado y proteínas (Silva-Álvarez et al., 2015a).

Dada la limitadísima capacidad biosintética de *Echinococcus* y su necesidad de adquirir los lípidos a partir de su hospedador, es sumamente lógico pensar que de allí provienen los componentes lipídicos del EgAgB. Esto apoya las hipótesis que plantean que el EgAgB estaría relacionado con la adquisición de nutrientes. Lo que se desconoce es cuáles serían los mecanismos mediante los cuales el EgAgB adquiere dichos lípidos, no obstante, algunas posibilidades han sido planteadas. Una posibilidad es que el EgAgB pueda interactuar con las lipoproteínas plasmáticas del hospedador y así cargarse de lípidos, de manera análoga a lo que ocurre entre diferentes lipoproteínas plasmáticas de vertebrados. Esto podría ocurrir alrededor de los tejidos del hospedador, o bien dentro del líquido hidático, ya que se ha encontrado apolipoproteína A-I formando parte de dicho líquido, señalando que las HDL (lipoproteínas de alta densidad) del hospedador podrían estar ingresando al quiste por algún mecanismo que aún se desconoce. Otra posibilidad es que el EgAgB adquiriera lípidos a partir de las células del hospedador. En este sentido, se ha demostrado que EgAgB es capaz de unirse *in vitro* a monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, aunque todavía no se conoce que receptores estarían involucrados ni que destinos tendría el EgAgB en esos casos. Por otra parte, en cualquier caso, el EgAgB tendría que interactuar con receptores en células del parásito para poder entregar los lípidos adquiridos a los tejidos del cestodo. En ese sentido, se ha visto en los genomas de *E. granulosus* y *E. multilocularis* que flanqueando a los genes de EgAgB se encuentran genes que codificarían para proteínas con dominios homólogos a los receptores de LDL (lipoproteínas de baja densidad). Dado este panorama, la primera opción parecería más viable, es decir, la interacción entre lipoproteínas del

hospedador y el parásito dentro del quiste y la posterior distribución de los lípidos por parte del EgAgB hacia diversos tejidos del parásito por interacción con receptores del mismo (Silva-Álvarez et al., 2015a). No obstante, cabe mencionar que ensayos *in vitro* realizados con TsHLBP de *Taenia solium* han demostrado que esa lipoproteína tendría capacidad de unir ácidos grasos y transportarlos a través de la pared de la larva (Lee et al., 2007).

Sumado a su posible rol en la adquisición y distribución de lípidos, existen evidencias que atribuyen al EgAgB un rol de modulador en la respuesta inmune del hospedador. Por ejemplo, se ha visto que el EgAgB purificado a partir de líquido hidático inhibiría, *in vitro*, la quimiotaxis de monocitos (Silva-Álvarez et al., 2015a). Otros estudios han atribuido al EgAgB la capacidad de interferir en la diferenciación y activación de células dendríticas, las cuales son claves tanto para el desarrollo de reacciones inflamatorias locales en respuesta a una señal de peligro como para la activación de linfocitos T específicos (Rigano et al., 2007).

## 1.6 Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs)

En primer lugar, se describirán brevemente las características de las FABPs de mamíferos, que han sido las primeras en ser descubiertas y por ende las más estudiadas. Posteriormente, se analizarán los datos disponibles sobre las FABPs de invertebrados, en particular de platelmintos parásitos.

Las FABPs son un conjunto de proteínas citosólicas de alrededor de 15kDa expresadas en la mayoría de las células de los mamíferos, en muchas de ellas a niveles muy altos, sobre todo en aquellas que poseen un metabolismo de ácidos grasos muy importante, como los hepatocitos, enterocitos, adipocitos y miocitos. La familia de las FABPs de mamíferos incluye a 9 FABPs y a las proteínas celulares que unen retinoides, aunque recientemente se ha descubierto una décima FABP (Smathers & Petersen, 2011; Storch & Córscico, 2008).

Históricamente, las FABPs han sido designadas de acuerdo al tejido en el que fueron descubiertas, aunque luego se encontró que podían expresarse en diferentes tejidos, y que una misma célula podía expresar más de una FABP. No obstante esto, y a pesar de que se ha buscado instalar una nomenclatura empleando números para designar a los genes de las FABP, los nombres más tradicionales siguen siendo los más usados. En la Tabla I-2 se detalla la nomenclatura y distribución tisular de dichas proteínas.

Todos los genes de las FABPs humanas poseen una organización similar que consiste en cuatro exones y tres intrones, cuyas posiciones también se conservan. El largo de los intrones, sin embargo, es muy variable. El intrón 1 por ejemplo, posee 3,4; 2,3 y 1,2kb en los genes *fabp3*, *fabp8* y *fabp2*, respectivamente. Los exones, por su parte, normalmente codifican secuencias de aminoácidos relativamente cortas: 23-24 aminoácidos en el exón 1, 57-58 en el 2, 34-36 en el 3, y 16-17 en el 4. La estructura general de los genes se conserva también

en otros miembros de la familia de las FABPs, como las proteínas celulares que unen ácido retinoico (CRABPs) y las proteínas celulares que unen retinol (CRBPs), aunque en esos casos la longitud promedio de los intrones resulta ser significativamente mayor (Smathers & Petersen, 2011; Storch & Córscico, 2008). Asimismo, se han identificado en los genes de las FABPs secuencias consenso de inicio de la transcripción (caja TATA) así como elementos potenciadores (o *enhancers*) que dirigen la expresión de las FABPs en los diversos tejidos. Se ha determinado también que la expresión de algunas FABPs se encuentra regulada por sus propios ligandos. Por otra parte, cabe destacar que algunos genes de la familia se encuentran agrupados en determinadas regiones del genoma. Este es el caso para los genes *fabp4*, *fabp5*, *fabp8* y *fabp9*, los cuales se ubican en el locus 8q21. El gen *fabp12*, del cual no se posee tanta información, pero ya ha sido clonado, corresponde también a esta región. Se han identificado también algunos pseudogenes para *fabp3* y *fabp5* (Smathers & Petersen, 2011).

Desde el punto de vista proteico, tal como se dijo antes, las FABPs son proteínas relativamente pequeñas, con alrededor de 130 aminoácidos, cuyas estructuras primarias presentan un nivel de similitud moderado (entre 20 y 70%). Por otra parte, la estructura terciaria de las proteínas de esta familia sí se encuentra altamente conservada. Se caracteriza por la presencia de 10 hebras  $\beta$  antiparalelas que, agrupadas en dos hojas  $\beta$  de 5 hebras cada una y dispuestas de forma prácticamente ortogonal, forman un barril  $\beta$ . Este barril se encuentra coronado, en uno de sus lados, por dos pequeñas hélices  $\alpha$  que forman parte de lo que se denomina región portal (Ver Figura 1-10). Dichas hélices se ubican entre las dos primeras hebras  $\beta$  del barril y están separadas entre sí por un giro. El motivo hélice-giro-hélice posee interacciones de largo alcance con el giro entre las hebras  $\beta$ C y  $\beta$ D ( $3^\circ$  y  $4^\circ$ , respectivamente) y sería lo que determina el ingreso y egreso del ligando, de allí la denominación de región portal que se mencionó previamente (Furuhashi & Hotamisligil, 2008; Smathers & Petersen, 2011; Storch & Córscico, 2008; Storch & McDermott, 2009). Por otra parte, las FABPs comparten también ciertas secuencias de tipo “huella digital”, o *fingerprints*, compuesta por tres elementos, o motivos, denominados FATTYACIDBP1-3 (patrón PRINTS FATTYACIDBP; PR00178) (Furuhashi & Hotamisligil, 2008; Smathers & Petersen, 2011). El motivo 1 incluye un triplete G-x-W (donde x puede ser cualquier aminoácido) que forma parte de la primera hoja  $\beta$  ( $\beta$ A) de la estructura del barril. Este primer motivo es muy similar al que se encuentra en la familia de las lipocalinas, las cuales son parte, junto a las FABPs y las avidinas, de la superfamilia de las calicinas (Flower, 1996). El motivo 2 abarca el extremo C terminal de la cuarta hebra ( $\beta$ D) e incluye la quinta hebra ( $\beta$ E). Finalmente, el motivo 3 codifica las hebras 9 y 10, es decir,  $\beta$ I y  $\beta$ J (Furuhashi & Hotamisligil, 2008; Smathers & Petersen, 2011).

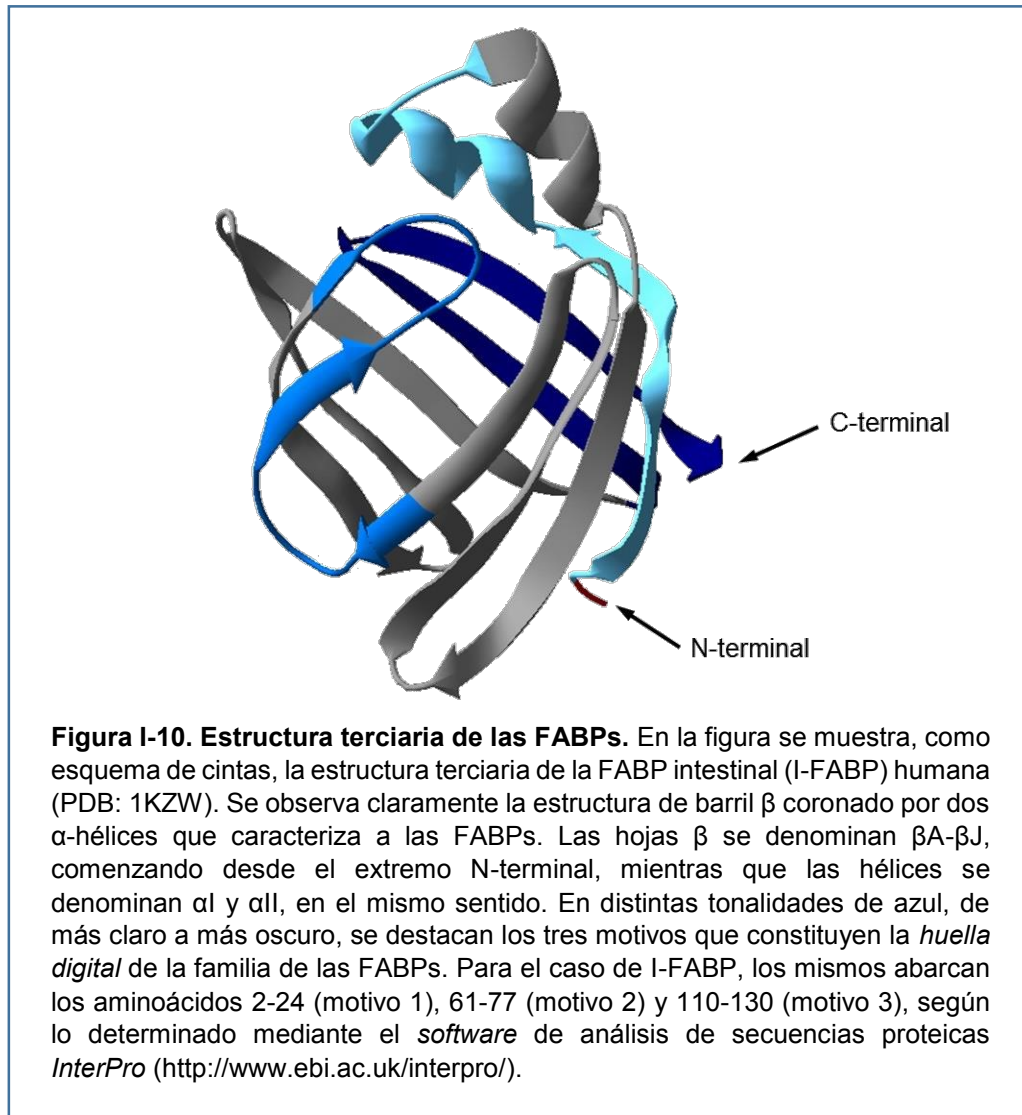
La cavidad del barril  $\beta$  es unas dos a tres veces mayor al volumen de los ácidos grasos que se unen a las proteínas y posee en su interior moléculas de agua ordenadas, unidas por puente hidrógeno a residuos polares (Storch & Córscico, 2008). Dichas moléculas de agua, junto con residuos no polares del interior del barril, dirigen la posición de las colas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Los extremos carboxilato, por su parte, suelen interactuar con residuos de arginina u otros aminoácidos polares (Furuhashi & Hotamisligil, 2008; Storch & McDermott, 2009).

<b>Gen</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Localización en humanos</b>
<i>fabp1</i>	L-FABP, FABP hepática	Hígado, intestino delgado, páncreas, pulmón, riñón, estómago
<i>fabp2</i>	I-FABP, FABP intestinal	Intestino delgado, hígado
<i>fabp3</i>	H-FABP, FABP cardíaca, FABP muscular	Músculo cardíaco y esquelético, cerebro, riñón, pulmón, estómago, testículo, glándulas adrenales, glándulas mamarias, placenta, ovario, tejido adiposo marrón
<i>fabp4</i>	A-FABP, FABP de adipocito, aP2	Adipocitos, macrófagos, células dendríticas, músculo esquelético
<i>fabp5</i>	E-FABP, K-FABP, FABP epidermal, FABP de keratinocito	Piel, lengua, adipocitos, macrófagos, células dendríticas, glándulas mamarias, cerebro, estómago, intestino, riñón, hígado, pulmón, corazón, músculo esquelético, testículos, retina, bazo, placenta, cristalino
<i>fabp6</i>	II-FABP, FABP ileal, I-BABP (Proteína intestinal que une ácidos biliares)	Íleon, ovarios, glándulas adrenales, estómago
<i>fabp7</i>	B-FABP, FABP cerebral	Cerebro, sistema nervioso central, células de la glia, retina, glándulas mamarias
<i>fabp8</i>	M-FABP, FABP de mielina, mP2	Sistema nervioso periférico, células de Schwann
<i>fabp9</i>	T-FABP, FABP de testículo	Testículos, glándulas salivales, glándulas mamarias
<i>fabp12</i>	-	Células de retinoblastoma

**Tabla I-2. Nomenclatura y localización de las FABPs de humanos.** La tabla muestra la denominación de los genes que codifican para las diferentes FABPs de humanos, así como los nombres más comunes con los que se conoce a estas proteínas. Se detallan también los tejidos/células en los que se ha encontrado expresión de estas proteínas. La información de esta tabla ha sido adaptada a partir de (Furuhashi & Hotamisligil, 2008; Smathers & Petersen, 2011; Storch & Córscico, 2008)

Un aspecto interesante vinculado a la región portal de las FABPs se deriva de los experimentos *in vitro* de transferencias de ácidos grasos fluorescentes a membranas fosfolipídicas artificiales. A partir de dichos experimentos, se ha dividido a las FABPs en dos grupos de acuerdo a los mecanismos empleados por las mismas para transferir los ácidos grasos a membranas fosfolipídicas. Por un lado se encuentran las FABPs que emplean un mecanismo de tipo “colisional” en el que el paso limitante de la velocidad está dado por la

interacción directa de la proteína con las membranas, y por otra parte se encuentran las que emplean un mecanismo de tipo “difusional” en donde el paso limitante implica la disociación del ácido graso de la proteína. La mayoría de las FABPs, incluyendo I-FABP, A-FABP, H-FABP, M-FABP y E-FABP, pertenecen al primer grupo, mientras que sólo L-FABP y la proteína



celular de unión a retinol II pertenecen al grupo de las FABPs “difusionales”. El análisis de los factores estructurales que definen estos comportamientos determinó que la región portal y en particular el motivo hélice-giro-hélice eran en gran parte responsables de las diferencias encontradas entre los dos grupos de FABPs. La interacción proteína-membrana necesaria para la transferencia de ligandos en las FABPs “colisionales” estaría conducida principalmente por el potencial electrostático positivo de la región portal de estas proteínas y por el carácter anfipático de la hélice  $\alpha I$  (Storch & Córscico, 2008; Storch & McDermott, 2009).

Estudios estructurales, por otra parte, han revelado que las formas libres de ligandos de las FABPs (formas *apo*-FABP) y aquellas que poseen ligandos (*holo*-FABP) difieren en ciertos



aspectos de su conformación. Se ha visto que en las formas *apo*, tanto el giro entre las hebras  $\beta$ C y  $\beta$ D como ciertas regiones de la hélice  $\alpha$ II poseen mayor movilidad que en las formas *holo*, lo que hace pensar en que pueden existir cambios conformacionales en la región portal vinculados al ingreso o egreso de ligandos, los cuales pueden ser inducidos por la interacción de las FABPs con membranas u otras proteínas. De este modo, la interacción de las FABPs colisionales con membranas desplazaría los equilibrios hacia conformaciones en donde se facilite la liberación o captación del ligando, mientras que en el citoplasma se favorecerían más las estructuras conteniendo el ligando, de modo que las FABPs puedan actuar como transportadores citoplasmáticos de ligandos hidrofóbicos (Hodsdon & Cistola, 1997; Storch & Córscico, 2008; Storch & McDermott, 2009). Por otra parte, en A-FABP, se ha visto que por unión a determinados ligandos se estabilizan ciertas conformaciones que favorecen la exposición, en las regiones correspondientes a las hélices  $\alpha$ , de aminoácidos básicos que constituyen una señal de localización nuclear no evidente en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Se ha postulado que la activación de dicha señal por acción de algunos ligandos específicos estaría relacionada con la capacidad de A-FABP de transportar al núcleo ligandos de los receptores activados por proliferador de peroxisoma, o PPAR según sus siglas en inglés (Gillilan et al., 2007).

En cuanto a la capacidad de unión a ligandos, la mayoría de las FABPs son capaces de unir un único ácido graso en su interior, orientando el extremo carboxilo hacia el interior del barril. No obstante, L-FABP se destaca por tener la capacidad de unir dos ácidos grasos al mismo tiempo, uno de los cuales ubica su carboxilato hacia adentro del barril, mientras que el carboxilato del otro ácido graso queda cerca de la superficie de la proteína, expuesto al solvente. Asimismo, L-FABP tiene la capacidad de unir una variedad más o menos amplia de ligandos como lisofosfolípidos, grupo hemo y derivados de ácidos grasos unidos a coenzima A (acil-CoA). II-FABP, por su parte, une principalmente ácidos biliares, aunque posee capacidad de unir ácidos grasos con menor afinidad (Smathers & Petersen, 2011; Storch & Córscico, 2008).

Cabe destacar que a pesar de la vasta información disponible en relación a la estructura, la capacidad de unión a ligandos, la caracterización de los mecanismos de transferencia de los mismos y la localización tisular de las FABPs, la función específica de estas proteínas y los mecanismos por los cuales ejercen dichas funciones aún no se encuentran del todo aclarados. No obstante, se han podido asignar algunos roles a algunas de las FABPs a partir de experimentos con células y animales *knocked out* para sus genes. De ese modo, se ha propuesto, por ejemplo, que L-FABP estaría involucrada en el transporte intracelular de ácidos grasos y otros ligandos hidrofóbicos, como puede ser el transporte de ligandos de PPAR al núcleo. Se ha propuesto también que tendría algún rol en la proliferación celular y el direccionamiento de los ácidos grasos a diferentes vías metabólicas. Por otra parte, L-FABP

intervendría en la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), mientras que en intestino sería esencial para la formación de los quilomicrones. Asimismo, se ha sugerido que A-FABP tendría un papel importante en el almacenamiento y liberación de triglicéridos en adipocitos, en la regulación de la producción de citoquinas en macrófagos, y en la regulación de la acción de factores de transcripción, mediante su ingreso al núcleo y transporte de ligandos a dicho compartimiento celular. Para H-FABP se han propuesto roles en la regulación de la incorporación y oxidación de ácidos grasos en corazón y músculo esquelético, así como funciones relacionadas al control de la proliferación celular (Storch & Córscico, 2008).

Como se puede apreciar por lo anteriormente descrito, es mucho lo que aún resta comprender sobre la función de las proteínas de la familia de las FABPs, tanto a nivel general, como para cada una de ellas.

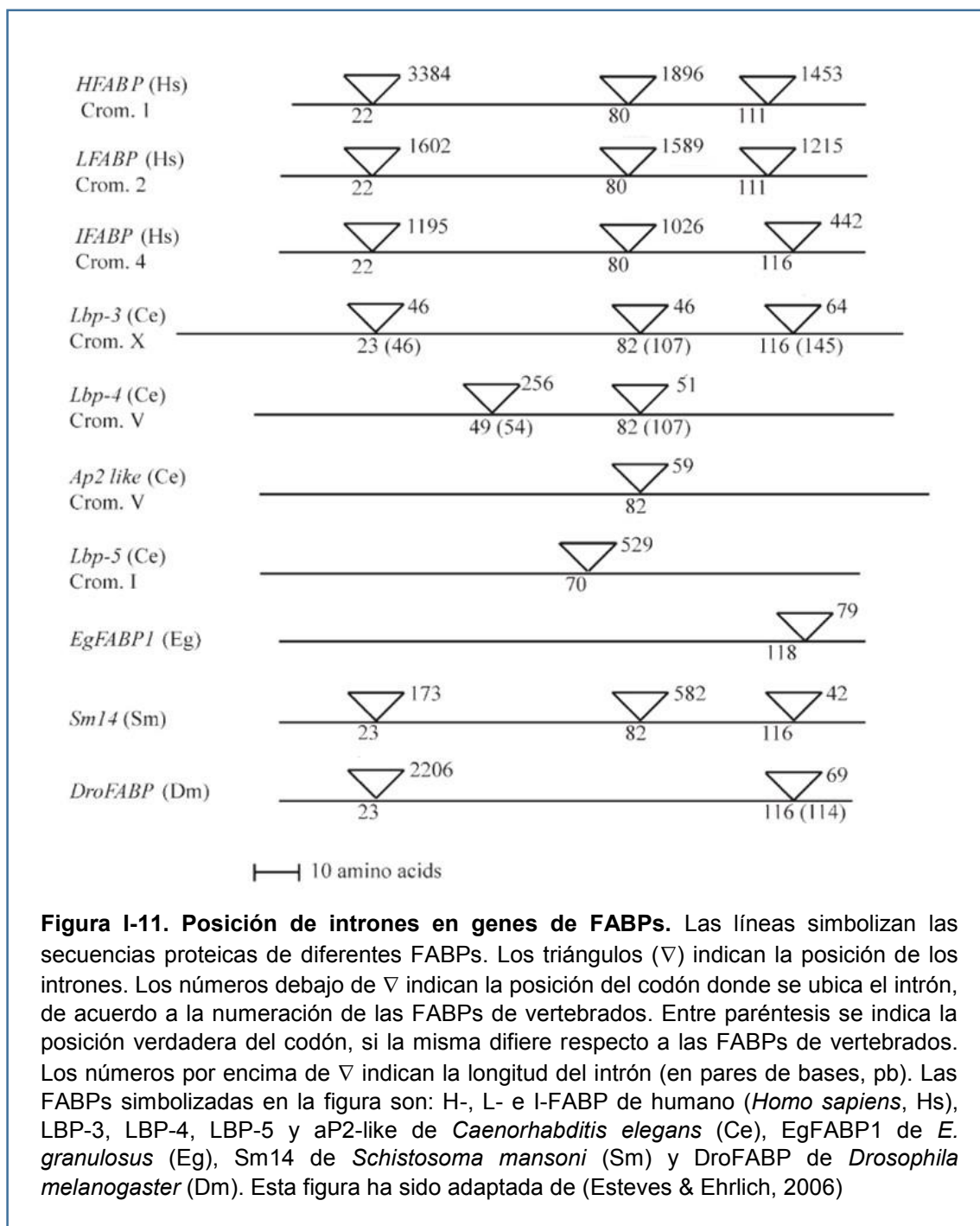
### 1.6.1. FABPs en invertebrados

El estudio de las FABPs de invertebrados comenzó en 1990 (unos 20 años después de haberse descrito la primera FABP), cuando se describió una FABP en *Schistocerca gregaria*, o langosta del desierto (Haunerland and Chisholm, 1990). A partir de allí, se han descrito varias FABPs de organismos tales como nematodos (parásitos y de vida libre), moluscos, insectos y platelmintos.

Dentro de las FABPs de platelmintos, la primera en ser descrita fue la proteína Sm14 del parásito *Schistosoma mansoni* (Moser et al., 1991). Luego se aislaron análogos de *S. japonicum* (SjFABPc), *Fasciola hepatica* (Fh15) y *F. gigantica* (FgFABP) (Becker et al., 1994; Estuningsih et al., 1997; Rodríguez-Pérez et al., 1992). En todos esos casos, lo más llamativo de estas proteínas era que resultaban ser inmunogénicas, y que extractos en los que ellas estaban presentes generaban protección frente a infecciones experimentales. Asimismo, el hecho de que los platelmintos no puedan sintetizar la mayoría de sus lípidos *de novo*, contribuyó a que el estudio de las FABPs en estos organismos fuera creciendo con el tiempo. Fue en esos años también cuando se detectó la primera FABP de *E. granulosus*, EgFABP1 (Esteves et al., 1993). Los detalles sobre las FABPs de *E. granulosus* se darán más adelante, en esta sección.

Tal como ocurre con las FABPs de mamíferos, las FABPs de invertebrados guardan un porcentaje de identidad de secuencia muy variable. Al compararlas con las FABPs de vertebrados se encontró que la mayor similitud se daba con las de corazón o H-FABP, aunque los porcentajes de similitud con las FABPs de vertebrados en general son bajos. No obstante la baja homología de secuencia, la estructura terciaria se conserva, tal como ocurre con las demás FABPs. Cabe destacar que se observa mayor conservación de algunos aminoácidos

en los giros entre hebras  $\beta$  del barril, en la hélice  $\alpha I$  y en el final de la  $\alpha II$ , así como de los involucrados en la unión del carboxilato de los ácidos grasos que actúan como ligandos (Esteves & Ehrlich, 2006).



Desde el punto de vista de la estructura génica de las FABPs, cabe destacar que en invertebrados parecen conservarse las posiciones de los intrones descritos en las FABPs de vertebrados, aunque el número y el tamaño de los mismos son variables (Ver Figura I-11). En FABPs de *C. elegans* se han encontrado intrones en posiciones no conservadas, y se ha visto

que el número, posición y tamaño de los mismos varía entre las diferentes FABPs de dicho organismo (Esteves & Ehrlich, 2006; Plenefisch et al., 2000). Es importante tener en cuenta, no obstante, que algunas de las FABPs de *C. elegans* corresponden a un grupo de FABPs específicas de nematodos, denominadas nemFABPs, que se caracterizan por poseer secuencias señales de secreción y ciertas variaciones estructurales, principalmente en ciertos giros del barril (Esteves & Ehrlich, 2006; Franchini et al., 2015; Plenefisch et al., 2000).

#### **1.6.1.1. FABPs en *Echinococcus* spp.**

La primera FABP descubierta en *E. granulosus* fue EgFABP1. Esta proteína se identificó a partir de una biblioteca de expresión de cDNAs (ADN complementario al ARN mensajero) obtenidos a partir de protoescolices de *E. granulosus*. La biblioteca fue analizada utilizando sueros generados contra extractos de protoescolices y capa germinativa ( $\alpha$ -PE y  $\alpha$ -CG, respectivamente). Se aislaron clones que reaccionaran específicamente con el suero  $\alpha$ -PE y no con  $\alpha$ -CG, con el objetivo de identificar genes que se expresaran diferencialmente en distintos estadios del parásito (Esteves et al., 1993).

Al secuenciar el clon obtenido, se encontró un marco de lectura abierto correspondiente a 133 aminoácidos, con homología de secuencia a las proteínas de la familia de las FABPs. Inicialmente se denominó a dicha proteína EgDf1 (*E. granulosus* differential factor 1, es decir, factor diferencial 1 de *E. granulosus*) por la manera en la que fue identificada, pero luego fue renombrada EgFABP1, reflejando así su naturaleza de FABP. Por análisis de *Western Blot*, se identificó a la proteína solo en extractos de protoescolices, y no en capa germinativa. Ensayos de inmunolocalización determinaron que la expresión de EgFABP1 se encontraba más localizada en el tegumento de los protoescolices (Esteves et al., 1993).

Posteriormente, se llevó a cabo la expresión recombinante y purificación de EgFABP1 en *Escherichia coli*, y se analizó su capacidad de unión a ligandos. Dicho análisis se llevó a cabo empleando los ácidos grasos fluorescentes ácido *cis*-parinámico y ácido *trans*-parinámico. En primer lugar se estudió la capacidad de EgFABP1 de unir sendos ácidos grasos, y luego se probó la capacidad de otros ligandos de desplazarlos del sitio de unión de la proteína. Los ensayos de desplazamiento, que emplearon numerosos ligandos para el análisis, indicaron la preferencia de EgFABP1 por ácidos grasos de cadena larga, principalmente insaturados. Los ácidos grasos que mayor desplazamiento produjeron fueron los ácidos araquidónico, oleico, linoleico, linolénico, palmítico (saturado), palmitoleico y esteárico (saturado). Estos ensayos sugirieron también la existencia de más de un sitio de unión para los ácidos grasos en esta FABP (Alvite et al., 2001).

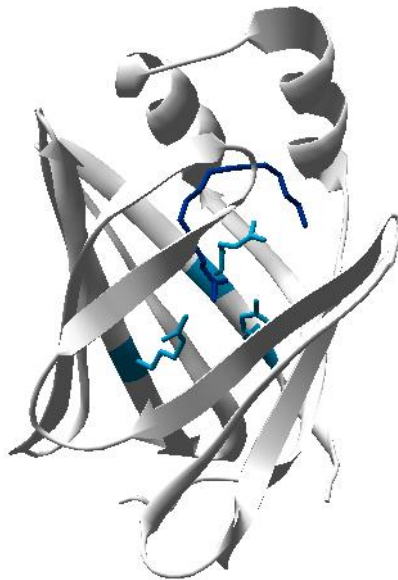
La estructura cristalográfica de EgFABP1 ha sido resuelta (Ver Figura I-12), y confirmó la estructura de barril  $\beta$  formado por 10 hebras antiparalelas, coronado por dos hélices  $\alpha$ , típica

de las FABPs (Jakobsson et al., 2003). De este modo, se confirmó lo que había sido propuesto por modelado molecular, aunque con algunas variaciones (Paulino et al., 1998). La comparación de la estructura de EgFABP1 con las estructuras de otras FABPs de las que se disponía en ese momento confirmó que la misma se parecía más al grupo de H-FABP, que incluye, entre otros a mP2, A-FABP, B-FABP y E-FABP (Jakobsson et al., 2003).

Los estudios estructurales revelaron la existencia de una molécula de ácido graso unido a la proteína, a pesar de que la misma había sido sometida a un proceso de deslipidización mediante tratamiento, en *batch*, con una resina hidrofóbica. La densidad electrónica encontrada se interpretó como perteneciente al ácido palmítico. La disposición del ligando en el sitio de unión de EgFABP1 reveló que el ácido graso se encuentra plegado, en forma de U, disponiéndose prácticamente en un único plano. El extremo carboxilato del ácido graso interactúa con la proteína a través de una tríada Arg...Arg-X-Tyr, que forman el *motivo P2*, presente también en mP2, A-FABP y otras FABPs del mismo grupo. La primera Arg de dicho motivo se encuentra sobre el final de la hebra  $\beta$ H, mientras que el fragmento Arg-x-Tyr se localiza en la hebra  $\beta$ J. En EgFABP1, un oxígeno del ácido graso interactúa con el grupo -OH de la Tyr<sup>129</sup> y el N $\epsilon$  de la Arg<sup>127</sup>, mientras que el otro interactúa con el N $\eta^2$  de la Arg<sup>107</sup> y con dos moléculas de agua. Por otra parte, tanto para H-FABP como para A-FABP se ha propuesto que otros aminoácidos serían cruciales para la interacción de estas proteínas con la cola hidrocarbonada del ácido graso. En EgFABP1 esos aminoácidos serían Phe<sup>16</sup>, Pro<sup>76</sup> y Asp<sup>77</sup>. Si bien solo Phe y Asp están conservados respecto a lo propuesto para H- y A-FABP, el C $\beta$  de Pro<sup>76</sup> se encuentra aproximadamente en la misma posición que el C $\beta$  de Ala<sup>76</sup> de las otras proteínas, por lo que podría ser igualmente importante para la unión del ligando. El análisis de la estructura de EgFABP1 desestimó la posibilidad de un segundo sitio de unión a ligandos en el interior del barril. Por otra parte, los autores revelaron la presencia de S-hidroxisteína en la posición Cys<sup>63</sup>. Se desconoce si esto ocurre naturalmente en EgFABP1 o si es un artefacto de la expresión recombinante en *E. coli* (Jakobsson et al., 2003).

Una segunda FABP, EgFABP2, fue encontrada en *E. granulosus* tras analizar una biblioteca genómica de dicho organismo usando una sonda construida a partir de la secuencia de cDNA de EgFABP1 (Esteves et al., 2003). Tras el clonado del gen y el análisis de su secuencia, se reveló que EgFABP2 tiene un único intrón de 80pb en la posición correspondiente al tercer intrón descrito en otras FABPs, del mismo modo que EgFABP1, cuyo único intrón es de 79pb (Esteves et al., 2003). En el mismo trabajo se estableció que existen mensajeros para ambas FABPs en los protoescólices de *E. granulosus*. Por otra parte, se pudo determinar que el inicio de la transcripción del gen de EgFABP2 ocurre en una A que se encuentra a 13 bases, río arriba, del codón de inicio de la traducción (ATG). El análisis de la región promotora del gen *egfabp2* reveló la existencia de posibles regiones consenso encontradas en otros genes eucariotas tales como la caja TATA y la caja CAAT. Asimismo,

existirían sitios de respuesta a proliferadores de peroxisomas y otros elementos regulatorios similares encontrados en otros genes de FABPs (Esteves et al., 2003). Tal como ocurre con otras FABPs, las funciones específicas de EgFABP1 y EgFABP2 siguen sin ser elucidadas a pesar de la información que se ha ido obteniendo con el pasar de los años.



**Figura I-12. Estructura terciaria de EgFABP1.** En la figura se muestra, como esquema de cintas, la estructura terciaria de EgFABP1 (PDB: 1O8V). Se observa claramente la estructura de barril  $\beta$  coronado por dos  $\alpha$ -hélices que caracteriza a las FABPs. Con color celeste, se muestran los residuos Arg<sup>107</sup>, Arg<sup>127</sup> y Tyr<sup>129</sup>, que forman el motivo P2 de unión al ligando. Con color azul se muestra la molécula de ácido palmítico que se encontró unida a EgFABP1 al determinar su estructura. Se puede observar claramente la disposición en forma de U que adopta dicho ligando.

Recientemente, a partir de la publicación de los genomas de *E. multilocularis* y *E. granulosus* (Tsai et al., 2013; H. Zheng et al., 2013) han surgido publicaciones en donde se propone la existencia de otras FABPs además de EgFABP1 y EgFABP2 en *E. granulosus*, así como la presencia de sus ortólogos en *E. multilocularis* (Alvite & Esteves, 2012; Zheng et al., 2013). Esta información será discutida con mayor detalle a lo largo del presente trabajo.

## 1.7 Hipótesis y objetivos

### 1.7.1. Hipótesis general

Tal como se comentó previamente, las FABPs son una familia de proteínas ampliamente distribuidas en el Reino Animalia, capaces de unir ácidos grasos y algunos otros ligandos hidrofóbicos, cuyas funciones específicas están lejos de ser comprendidas en su totalidad. Tradicionalmente se ha atribuido a estas proteínas funciones de transporte de ácidos grasos en el citoplasma celular. Se ha sugerido que al unir ácidos grasos de cadena larga, las FABPs no sólo aumentarían la disponibilidad de ácidos grasos solubles para diferentes usos dentro de la célula, sino que la protegerían de los efectos tensioactivos que dichos compuestos tienen, en especial cuando se encuentran en concentraciones algo elevadas. Con el pasar de los años y la acumulación de datos relativos a las FABPs, las mismas pasaron a considerarse partícipes más activos en lo relativo al metabolismo lipídico celular, asignándoseles roles en la regulación de la expresión de genes relacionados a dicho metabolismo, en la regulación de la captación y utilización por parte de las células de ácidos grasos y otros nutrientes, y hasta en procesos de señalización a niveles sistémicos, actuando como adipoquinas (Kralisch & Fasshauer, 2012; Kralisch et al., 2014).

En el caso de organismos parásitos como *Echinococcus* spp. que, según la información disponible, tienen una capacidad biosintética limitada y no utilizan los lípidos como fuente de energía, el estudio de las FABPs se torna quizás más importante desde el punto de vista de la comprensión de la biología de estos organismos.

En *Echinococcus* spp., las FABPs podrían dirigir los ácidos grasos a las vías de síntesis de fosfolípidos de membrana, necesarios para mantener el crecimiento continuo del parásito en su estadio de metacestodo; podrían dirigir ácidos grasos a vías de síntesis de moléculas de señalización como eicosanoides y prostaglandinas, que permitan modular la respuesta inmune del hospedador; e incluso podrían transportar ligandos que tengan un papel importante en la regulación de la increíble plasticidad fenotípica que tienen estos organismos. En este sentido, cabe destacar que existe evidencia de localización nuclear de EgFABP1 (Dra. Adriana Esteves, *comunicación personal*).

### 1.7.2. Objetivo general

La hipótesis general planteada es claramente un problema muy complejo de resolver, máxime teniendo en cuenta que la bioquímica de *Echinococcus* spp., y en particular el metabolismo lipídico, es un campo aún muy poco explorado. Es por esto, que en el presente

trabajo nos hemos propuesto profundizar en los conocimientos relacionados a EgFABP1, en particular en lo referido a su interacción con ligandos y con membranas fosfolipídicas. Si bien esta información no es suficiente para evaluar una hipótesis tan compleja como la propuesta, se espera que sirva para encausar futuras investigaciones al respecto, de modo similar a lo que ha ocurrido con otras FABPs. Asimismo, nos hemos propuesto ampliar el panorama en lo que respecta a la familia de las FABPs en *Echinococcus spp.*, a partir del análisis de los recientemente obtenidos genomas de *E. granulosus* y *E. multilocularis*.

### **1.7.3. Objetivos específicos**

#### **1.7.3.1. Subclonado y purificación de EgFABP1**

El primer objetivo planteado para el presente trabajo fue el subclonado del cDNA de EgFABP1 a un plásmido con un mejor control de la expresión de la proteína recombinante. Asimismo, debieron ajustarse algunos parámetros del proceso de deslipidización de la proteína para que la misma estuviera en condiciones de ser usada para posteriores ensayos biofísicos. La proteína recombinante obtenida fue analizada por dicroísmo circular para chequear que su plegamiento fuera el adecuado.

#### **1.7.3.2. Análisis de la interacción de EgFABP1 con ligandos**

Con el objetivo de analizar la interacción de EgFABP1 con ligandos se llevaron a cabo varios ensayos. Por un lado, se extrajeron los lípidos unidos a la proteína recombinante purificada a partir de *E. coli* y se caracterizaron por cromatografía en capa fina y cromatografía gas-líquido. Otro enfoque, consistió en evaluar la interacción de EgFABP1 con ácidos grasos empleando un ensayo de proteólisis parcial que permite distinguir si la proteína se encuentra en un estado más o menos flexible. De esta manera se puede evaluar si la unión a diferentes ligandos estabiliza una misma conformación de la proteína o no. Un análisis similar se realizó empleando la técnica de dicroísmo circular. Finalmente, se evaluó también la interacción de EgFABP1 con derivados fluorescentes de ácidos grasos, de utilidad para los ensayos sucesivos.

#### **1.7.3.3. Análisis de la interacción de EgFABP1 con membranas**

El análisis de la interacción de EgFABP1 se llevó a cabo empleando un ensayo de transferencia de ligandos fluorescentes a membranas fosfolipídicas artificiales basado en el



principio de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Estos ensayos han sido aplicados a otras FABPs y han sido el puntapié inicial para el avance en la comprensión de los roles de muchas de ellas. Se empleó también un ensayo de interacción con membranas por competición con citocromo c.

#### **1.7.3.4. Identificación y análisis de FABPs de *E. multilocularis***

Para llevar a cabo este objetivo, se realizó una estadía de trabajo en el laboratorio del Dr. Klaus Brehm, en la Universidad de Wurzburg (Alemania). Allí se hicieron búsquedas bioinformáticas en versiones preliminares del genoma de *E. multilocularis*, disponibles en dicho laboratorio, tendientes a identificar genes ortólogos a EgFABP1 y EgFABP2. Empleando las técnicas de cultivo de células primarias de *E. multilocularis* puestas a punto en dicho laboratorio, se buscó disminuir la expresión de dichas FABPs empleando ácidos ribonucleicos de interferencia pequeños (siRNAs, *small interference Ribonucleic Acids*). A partir de cDNA de células primarias se clonaron las secuencias codificantes de las FABPs de *E. multilocularis*.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Subclonado y purificación de EgFABP1

#### 2.1.1. Subclonado de EgFABP1

##### 2.1.1.1 Extracción y purificación de ADN plasmídico (miniprep)

Durante el desarrollo de este trabajo, la extracción del ADN se realizó empleando los kits comerciales *QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)* o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)*, según las indicaciones de los fabricantes. Brevemente, la técnica consiste en hacer un cultivo *overnight* (aproximadamente 16hs) a 37°C y con agitación (250rpm) de las bacterias de interés en un medio apropiado (normalmente, LB o *Luria-Bertani*: 10g/l Triptona; 10g/l NaCl; 5g/l Extracto de Levadura). Al día siguiente, se cosechan 5ml de cultivo por centrifugaciones sucesivas de 2min a 6800 x g en un tubo tipo *eppendorf* de 1,5ml. Una vez colectadas las bacterias, debe resuspenderse el *pellet* obtenido en 250µl del *buffer* de resuspensión provisto por el kit. A continuación debe aplicarse igual volumen de la solución de lisis, y mezclar el contenido del tubo por inversión unas 4 a 6 veces, hasta que se torne más claro y con aspecto viscoso. Posteriormente, dentro de los 5min posteriores al agregado del *buffer* de lisis, se deben incorporar 350µl de la solución de neutralización y mezclar nuevamente por inversión unas 6 veces. Luego, se centrifuga a velocidad máxima durante 5min para precipitar el ADN cromosomal y los restos de bacterias; y se transfiere el sobrenadante a una columna de purificación provista en el kit. Luego de centrifugar 1min a velocidad máxima, se descarta el filtrado y se lava la columna agregándole 500µl de solución de lavado, seguido de una centrifugación de 30-60seg a velocidad máxima. Se hacen dos lavados y luego de la segunda centrifugación se realiza una centrifugación extra para eliminar cualquier resto de solución de lavado que pudiera quedar retenida en la columna. Para finalizar, se hacen dos eluciones con 30µl de *buffer* de elución (10mM Tris-HCl, pH 8.5; provisto con el kit) cada una, que se colectan en un tubo nuevo por centrifugación a velocidad máxima. El ADN purificado se conserva a -20°C.

##### 2.1.1.2 Diseño de los *primers* específicos para EgFABP1

Los *primers* específicos para la secuencia codificante del gen de EgFABP1 resultaron de una modificación de los que se emplearon oportunamente en el laboratorio de la Dra. Esteves (Alvite et al., 2001). A dichos *primers* se les adicionó un sitio de corte para la enzima de

restricción *BamHI*, así como algunos nucleótidos extra con la finalidad de mejorar la eficiencia de las digestiones con enzimas de restricción. El diseño de los *primers* se llevó a cabo empleando las herramientas bioinformáticas brindadas por el sitio web del *SDSC Biology Workbench* (<http://workbench.sdsc.edu>). Las secuencias correspondientes a los *primers* se muestran en el *Apéndice 7.1.1*.

### **2.1.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la secuencia codificante del gen *egfabp1***

Para la PCR se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Platinum® Pfx DNA polymerase (Invitrogen)* según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron 5µl del buffer de amplificación e igual volumen de la solución potenciadora, provistos con la enzima. Se agregó MgSO<sub>4</sub> a una concentración final de 1,5mM y los desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a una concentración final de 0,3mM cada uno. Asimismo, se usaron 0,32µM de cada uno de los primers (EgFABP1-Fw y EgFABP1-Rv), 1,25 unidades de la polimerasa y aproximadamente 0,5-1nM del ADN molde (pET-5a-*egfabp1*, generado en el laboratorio de la Dra. Esteves, Universidad de la República, Uruguay). Todo se llevó a 50µl finales con agua bidestilada estéril. Las condiciones utilizadas para la amplificación del inserto de interés fueron las siguientes: 2min de incubación a 94°C para activar la polimerasa y desnaturalizar por completo el ADN molde; 35 ciclos de 30seg a 94°C (desnaturalización), 30seg a 58°C (hibridización) y 1min a 68°C (elongación); y finalmente, 5min adicionales a 68°C.

### **2.1.1.4 Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Tanto el producto de PCR como el plásmido pET-11b (*Novagen*), en el cual se subclonó dicho gen, se digirieron con las enzimas *NdeI* y *BamHI* (*Promega*). El *buffer* empleado para la reacción fue el *Buffer D* (provisto con las enzimas). Dado que el porcentaje de actividad de la enzima *BamHI* en el *Buffer D* es de entre 50 y 75%, se usó el doble de esta enzima que de *NdeI*. Las mezclas de reacción se hicieron de la siguiente manera: 2µl de *Buffer D 10x*; 4µg de seroalbúmina bovina (BSA) acetilada (provista con las enzimas); 6 unidades de *NdeI*; 12 unidades de *BamHI*; 100-500ng de ADN; y agua bidestilada estéril hasta completar los 20µl. Las muestras se incubaron 3 horas a 37°C y luego se conservaron a -20°C.

### 2.1.1.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El análisis de los fragmentos de ADN se realizó empleando geles de 0,75-1,5% de agarosa (*Invitrogen*) preparados en *buffer* TBE (90mM Tris-Borato, 2mM EDTA, pH 8) y conteniendo *SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen)* para visualizar el ADN. Las muestras para la electroforesis se prepararon mezclando las soluciones de ADN con *buffer* de siembra 6x (40% Sacarosa, 0,25% Azul de Bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo en *buffer* TBE, a 100V durante aproximadamente 50min, dependiendo del avance del frente de corrida. Como marcador de peso molecular se utilizó el *100bp DNA Ladder (Invitrogen)* para fragmentos pequeños y productos de PCR; el *1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)* para fragmentos grandes; y los marcadores *Low DNA Mass Ladder* y *High DNA Mass Ladder (Invitrogen)* para las cuantificaciones de ADN. Las imágenes fueron colectadas empleando un equipo *ImageQuant 350 (GE Healthcare Life Sciences)* con iluminación ultravioleta, y analizadas con el *software* provisto con dicho equipo.

### 2.1.1.6 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se realizó empleando filtros *Ultrafree®-DA (Millipore)*. Para ello, se cortaron del gel las bandas de interés bajo iluminación con luz UV (reduciendo al mínimo el tiempo de exposición para evitar la inducción de mutaciones en los fragmentos de ADN) y luego se picó dicha fracción sobre una superficie lisa y limpia, empleando un bisturí. Se colocó el gel triturado en un filtro de los mencionados previamente, y se centrifugó durante 15 min a velocidad máxima. Luego se agregaron 100µl de *buffer* TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8), se dejó reposar 10 min, y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 10 min. A continuación, se llevó a cabo una precipitación del ADN con etanol. Para ello, luego de estimar el volumen del filtrado, se agregó un 10% de dicho volumen de una solución 3M Acetato de Sodio, seguido de dos volúmenes de Etanol frío, y se lo incubó *overnight* a -20°C. Posteriormente, se centrifugó la muestra durante 20 min a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. Se procedió a realizar un lavado empleando 500µl de Etanol al 70%, seguido de una centrifugación de 10 min a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar la muestra cerca del mechero durante aproximadamente 10 min (hasta eliminar los restos de alcohol). Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 25µl de *buffer* 10mM Tris-HCl, pH 8; y se conservó la muestra a -20°C.

### 2.1.1.7 Desfosforilación de los extremos 5'

Con la finalidad de evitar la recircularización del vector digerido, se procedió a desfosforilar sus extremos 5'. Para ello, se empleó la enzima *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (*Promega*), o CIAP por sus iniciales en inglés. El procedimiento consistió en incubar el vector digerido con la CIAP a una concentración de 0,01 unidades de enzima/pmol de extremos libres de ADN en el *buffer* de reacción (provisto con la enzima) durante 15 min a 37°C seguido de 15 min a 56°C. Posteriormente, se repitió el agregado de enzima y las incubaciones, según recomendación del fabricante. Para frenar la reacción se agregaron 200µl de *CIAP Stop Buffer* (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; 200mM NaCl; 0,5% SDS; pH 7,5). A continuación se agregó un volumen de Fenol/Cloroformo, se emulsionó la mezcla, y se centrifugó 5 min a máxima velocidad. Se tomó la fase acuosa y se procedió a realizarle una precipitación con etanol, tal como se describió en el ítem 2.1.1.6.

### 2.1.1.8 Ligación

La ligación del inserto *egfabp1* con el vector pET-11b desfosforilado se llevó a cabo empleando la enzima *T4 DNA ligase* (*Invitrogen*) según las recomendaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en presencia de exceso de inserto. La mezcla de enzima, vector e inserto se incubó *overnight* a 4°C en el *buffer* provisto por el fabricante. La muestra se congeló a -20°C hasta el momento de su uso.

### 2.1.1.9 Preparación de bacterias competentes

Para la preparación de bacterias competentes se cultivaron las bacterias ON (del inglés *overnight*, es decir, durante la noche) a 37°C con agitación fuerte, en medio LB. Para las cepas *E. coli JM109* y *E. coli BL21(DE3)* (Novagen) no se utilizó ningún antibiótico durante el cultivo, mientras que para la cepa *E. coli XL-1 Blue* (gentilmente donadas por la Dra. Casalongué, Universidad Nacional de Mar del Plata) se utilizó Tetraciclina (*Sigma Aldrich*) a una concentración final de 12,5µg/ml. Al otro día se inocularon 100ml de medio LB fresco con 5ml del cultivo bacteriano, y se incubaron a 37°C con agitación, hasta que la densidad óptica (DO) a 600nm alcance las 0,5 unidades. Una vez alcanzadas las condiciones mencionadas, se incubó el cultivo a 4°C durante 10-15min. Seguidamente, se centrifugó el cultivo a 2000rpm durante 15min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* proveniente de 100ml de cultivo se resuspendió en un total de 30ml de *Buffer TFB1* (100mM RbCl; 50mM MnCl<sub>2</sub>; 30mM Acetato de Potasio; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glicerol; pH 5,8; esterilizado por filtración) y se incubó

durante 90min en hielo. Pasado dicho tiempo, se centrifugó, en frío, la suspensión de bacterias durante 15min a 2000rpm. El sobrenadante fue descartado, y se resuspendió el *pellet* en 4ml de *Buffer TFB2* (10mM MOPS; 10mM RbCl; 75mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glicerol; pH 8; esterilizado en autoclave). Las bacterias competentes se alicuotaron y se congelaron de inmediato a -80°C.

#### **2.1.1.10 Transformación de bacterias competentes por *shock* térmico**

Para las transformaciones se utilizaron 100-200µl de bacterias competentes y se les adicionó aproximadamente 50ng de ADN plasmídico en un volumen inferior a 10µl. Se mezcló suavemente con el *tip* y se incubó la mezcla durante 30min en hielo. Pasado dicho tiempo, se incubaron las células durante 50 seg a 42°C, para luego regresarlas de inmediato al hielo. Seguidamente, se les agregaron 900µl de medio LB fresco, y se realizó un cultivo de 1 hora a 37°C con agitación. Para llevar a cabo la selección de las bacterias transformadas con el plásmido pET-11b-*egfabp1*, se realizaron cultivos en placas de LB/Agar/Ampicilina (medio LB conteniendo 15g/l de agar-agar y 100µg/ml de Ampicilina). Para ello, se sembraron placas con 100µl del cultivo y otras con el *pellet* de bacterias obtenido por centrifugación. Las placas se incubaron unos minutos a temperatura ambiente para que el líquido se absorbiera y, finalmente, invertidas a 37°C hasta el día siguiente. Una vez seleccionadas algunas colonias bien aisladas, se cultivaron las mismas en medio LB a 37°C. Para analizar la presencia del inserto *egfabp1* se procedió a realizar PCR con los *primers* específicos (tal como se describió en el ítem 2.1.1.3). Para obtener el ADN molde, se tomó una alícuota del cultivo (200µl), se centrifugó 5min a velocidad máxima y se resuspendió el *pellet* en 100µl de agua bidestilada estéril. Las muestras se hirvieron durante 3min para producir la lisis de las bacterias, y se utilizaron 5µl de dicha mezcla como molde para la reacción de PCR. De las colonias positivas se extrajo el ADN plasmídico (empleando el método descrito en 2.1.1.1) y se verificó la presencia del inserto por digestión con enzimas de restricción (según lo descrito en 2.1.1.4). Asimismo, las colonias positivas se corroboraron por secuenciación del inserto usando los *primers* específicos EgFABP1-Fw y EgFABP1-Rv, a través del servicio de *Macrogen Inc* (Corea del Sur). Para conservar los cultivos bacterianos de interés, se realizaron *stocks* de glicerol mezclando partes iguales del cultivo y de medio LB conteniendo 20% de glicerol. Dichos *stocks* se conservaron a -80°C. Para la conservación y amplificación del plásmido se emplearon bacterias de las cepas *E. coli XL-1 Blue* y *E. coli JM109*; y para la expresión de la proteína EgFABP1 recombinante se utilizó la cepa *E. coli BL21(DE3)*.

## 2.1.2. Purificación de EgFABP1

### 2.1.2.1. *Screening* de expresión de proteínas recombinantes

Para evaluar los niveles de expresión de EgFABP1 en bacterias *E. coli BL21(DE3)* se utilizó un protocolo de *screening* de expresión. Para ello, se realizó un cultivo *ON* a 37°C de las colonias de interés (previamente chequeadas según lo descrito en el ítem 2.1.1.10) en medio LB con Ampicilina (100µg/ml). Luego se inocularon 5ml de medio LB con ampicilina (LB/Amp) fresco con 0,5ml del cultivo, y se cultivaron las bacterias hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600}=0,5$ ). La expresión de la proteína recombinante se indujo empleando una concentración final de 400µM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, *Promega*) e incubando el cultivo durante dos horas más en las condiciones ya descritas. Se incluyó también, como control, un cultivo sin inducir. Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 7000rpm durante 5min en centrífuga refrigerada *Sorvall Legend Mach 1.6R*, empleando el rotor *TTH-400 Swinging Bucket Rotor (Thermo)* con los adaptadores adecuados para tubos tipo *Falcon*. Los *pellets* se resuspendieron en 200µl de *Buffer TEK* (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; 100mM KCl; pH 7,4), y se analizaron por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida, tal como se describirá a continuación.

### 2.1.2.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis de muestras proteicas se llevó a cabo empleando geles de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) en condiciones reductoras, según lo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Para ello, se prepararon geles separadores de 15% acrilamida, con zona concentradora de gel de 4% acrilamida; empleando el equipo *MiniProtean Tetracell (BioRad)*. Los geles empleados fueron de 1mm de espesor. Las muestras se prepararon para la electroforesis hirviéndolas durante 5min en un *buffer* de siembra cuya composición fue la siguiente: 70mM Tris-HCl; 2% SDS; 10% Glicerol; 2,5% β-mercaptoetanol; 20µg/ml azul de bromofenol; pH 6,8. La electroforesis se llevó a cabo en dos etapas: inicialmente a 100V durante 20min y luego a 200V durante aproximadamente 50min (dependiendo del avance del frente de corrida). El *buffer* de electroforesis empleado consistió en una solución con 25mM Tris-HCl; 192mM Glicina; 0,1% SDS; pH 8.3. Como marcador de peso molecular se utilizó el *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS (GE Healthcare Life Sciences)*. La tinción de los geles se llevó a cabo empleando una solución 0,1% de *Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad)* en H<sub>2</sub>O:Metanol:Ácido acético (5:5:2); y la decoloración, con una solución acuosa con



10% ácido acético y 30% etanol. Las imágenes se colectaron empleando un transiluminador de luz blanca del equipo *ImageQuant 350* (*GE Healthcare Life Sciences*).

### 2.1.2.3. Expresión y Purificación de EgFABP1

Para la expresión de la proteína EgFABP1 recombinante se realizó un cultivo *ON* de bacterias *E. coli BL21(DE3)* portadoras del plásmido pET-11b-*egfabp1* en medio LB/Amp. Al día siguiente, se inocularon las bacterias en medio LB/Amp fresco, realizando una dilución 1/50. Las bacterias se cultivaron nuevamente a 37°C con agitación, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ( $0,5 \leq DO_{600} \leq 1$ ). La expresión de la proteína se indujo con IPTG a una concentración final de 400µM durante 3 horas. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7000rpm durante 10min a 4°C en botellas de 250ml, empleando la centrífuga *Avanti JE* (*Beckman Coulter*) con el rotor *JLA-16.250*. El *pellet* proveniente de 1 litro de cultivo se resuspendió en 10ml de *buffer* TEK + 1mM ditioneitol (DTT). A continuación, las bacterias se lisaron por aplicación de ultrasonido empleando un sonicador de punta *S-450* (*Branson*) con punta chata. Se utilizaron ciclos de trabajo de 50%, con potencia de entre 4 y 6, por períodos de 30 segundos, seguidos de 30 segundos de incubación de la muestra en hielo. La cantidad de intervalos de sonicación dependió de la clarificación observada en el cultivo. El material lisado se centrifugó a 30000rpm durante 25min a 4°C en una ultracentrífuga *Optima LE-80K* (*Beckman Coulter*), empleando el rotor *70.1 Ti*. El sobrenadante de dicha centrifugación fue sometido a un proceso de *salting out* por incubación del mismo con medio volumen de  $(NH_4)_2SO_4$  saturado durante 2 horas con agitación a 4°C. A continuación, se centrifugaron las muestras a 4°C durante 30min a 10000rpm empleando la centrífuga *Avanti JE* con el rotor de ángulo fijo *JA-25.50*. Previo a su paso por la columna de exclusión molecular, se concentró el sobrenadante del *salting out* empleando un concentrador de presión positiva (*Amicon*), y se le agregaron aproximadamente 120000cpm de  $[1-^{14}C]$ -Palmitato. Luego de una incubación de 15min, se sembró la muestra en una columna de exclusión molecular con resina *Sephadex G-50* (*Pharmacia Biotech Inc.*) a un flujo de alrededor de 1,5ml/min utilizando una bomba peristáltica *P-1* (*Pharmacia Biotech Inc.*). Para la cromatografía se utilizó un *buffer* de fosfatos de pH 7,4 (6mM  $K_2HPO_4$ ; 4 mM  $KH_2PO_4$ ; 150mM KCl). El seguimiento de la cromatografía se realizó por medición espectrofotométrica a 280nm, SDS-PAGE, y medición de la radiactividad empleando un contador de centelleo *Wallac 1214 Rackbeta*. Los pasos siguientes de la purificación consisten en la realización de una cromatografía de intercambio iónico (para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes) y una cromatografía de interacción hidrofóbica (para remover los ligandos lipídicos que puedan estar unidos a la proteína). Para proceder a la deslipidización de la proteína, se colectaron las fracciones que contenían EgFABP1, se concentraron en el concentrador *Amicon* de presión positiva y luego empleando un

concentrador *Vivaspin* (*Sartorius*). Durante este último procedimiento, se cambió también el *buffer* de la solución por uno de fosfatos adicionado con KCl, a una concentración final de 1M. Por otro lado, se equilibró la columna de cromatografía de interacción hidrofóbica, termostaticada a 37°C, en el mismo *buffer*. La columna empleada fue una *XK 16/40* (*GE Healthcare Life Sciences*) con resina *Lipidex 1000* (*Sigma Aldrich*), y equipada con una camisa termostática *Thermostatic JC 26/40 Jacket* (*GE Healthcare Life Sciences*) adosada a un equipo *Äkta Purifier* (*GE Healthcare Life Sciences*). La cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 0,5ml/min. Se midió la radiactividad de las fracciones que contenían a la proteína, antes y después de la cromatografía de interacción hidrofóbica. En caso de que la remoción de marca radiactiva no se considerara suficiente, se repitió la operación. Posteriormente, una vez colectadas todas las fracciones que contenían proteína, se les cambió el *buffer* (empleando un filtro *Vivaspin*) nuevamente hacia el *buffer* de fosfatos original. La muestra se sometió a una cromatografía de intercambio iónico empleando una columna *MonoQ* (*Pharmacia Biotech Inc.*) adosada a un equipo *Äkta Purifier* (*GE Healthcare Life Sciences*). La columna de intercambio iónico se estabilizó en el mismo *buffer* de fosfatos. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 1ml/min, y luego se lavó la columna con el *buffer* de fosfatos suplementado con KCl a una concentración final de 1M para liberar los ácidos nucleicos unidos a la columna. Al finalizar la purificación, la proteína EgFABP1 purificada se concentró, se le midió un espectro para confirmar que estuviera libre de ácidos nucleicos y se verificó su pureza por SDS-PAGE. Las alícuotas de EgFABP1 purificada se conservaron a -80°C para su posterior uso.

#### **2.1.2.4. Cuantificación de EgFABP1 purificada**

La medida de la concentración de EgFABP1 purificada se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 280nm de la muestra y empleando el coeficiente de absorción molar calculado mediante las herramientas bioinformáticas provistas por el *SDSC Biology Workbench* ( $\epsilon_{\text{EgFABP1}}=9530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Para la determinación se tomó el espectro de absorción de la muestra entre 240nm y 340nm con el objetivo de advertir posibles contaminaciones con ADN (absorbancia a 260nm) y/o la presencia de agregados proteicos (dispersión de luz a 340nm). La absorbancia se midió empleando un espectrofotómetro *T70+ UV/Vis* (*PG Instruments*) y cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico (*Hellma*).

### **2.1.3. Control de la integridad estructural de EgFABP1**

#### **2.1.3.1. Análisis por cromatografía de exclusión molecular**

Con la finalidad de determinar el estado de agregación de EgFABP1 se realizó una cromatografía empleando una columna de exclusión molecular *Superdex 75 (Pharmacia Biotech Inc)* adosada al equipo *Äkta Purifier*. Como proteínas patrón se utilizaron Albúmina Sérica Bovina (BSA, por sus siglas en inglés), Anhidrasa Carbónica (ambas de *Sigma Aldrich*), y una FABP recombinante purificada en nuestro laboratorio ya caracterizada (FABP intestinal, o I-FABP). Se sembraron en la columna aproximadamente 30µg de cada proteína en *buffer* 30mM Tris-HCl pH 7,4. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 0,5ml/min y se siguieron los perfiles de elución mediante absorbancia a 280nm. El cálculo del peso molecular aparente de EgFABP1 se llevó a cabo según lo descripto por Uversky (1993).

#### **2.1.3.2. Análisis por dicroísmo circular**

Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular de EgFABP1 purificada empleando un espectropolarímetro *Jasco J-810 (Jasco Corporation)* del Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (Universidad de Buenos Aires). Las medidas fueron llevadas a cabo con la asistencia de la Dra. Gisela R. Franchini (INIBIOLP, UNLP-CONICET). Los espectros en el UV cercano (250-320nm) o en el UV lejano (190-250nm) fueron medidos empleando cubetas rectangulares de cuarzo (*Starna*) de 1cm y 1mm de paso óptico, respectivamente. En el UV cercano se colectaron tres espectros, que fueron promediados, empleando una concentración de EgFABP1 de 43µM. Para el UV lejano se procedió de la misma manera, pero con la mitad de la concentración de proteína. Los espectros fueron colectados a una velocidad de 20nm/min, con un tiempo de respuesta de 1seg. Para los espectros en el UV cercano se utilizó sensibilidad alta, mientras que para el UV lejano se empleó sensibilidad estándar. Como control, se registró el espectro en el UV lejano de I-FABP empleando una concentración de proteína de 19µM. En todos los casos, las proteínas se encontraban en *buffer* 20mM Tris-HCl de pH 7,4. La elipticidad molar de las muestras se calculó según lo descripto por Schmid (Schmid, 1997).

## 2.2. Análisis de la interacción de EgFABP1 con ligandos

### 2.2.1. Análisis de lípidos de *Escherichia coli* unidos a EgFABP1 recombinante

#### 2.2.1.1. Extracción de los lípidos con solventes orgánicos

Para realizar la extracción de lípidos a partir de EgFABP1 recombinante, se purificó la proteína tal como se describió previamente (*ítem 2.1.2.3*) pero exceptuando el paso de deslipidización. La extracción se llevó a cabo aplicando el método descrito por Folch (Folch et al., 1957) con modificaciones. Brevemente, se tomaron 4ml de EgFABP1 purificada (conteniendo aproximadamente 2mg de proteína) y se separaron en 4 tubos de vidrio con tapa esmerilada. A cada fracción (de 1ml) se le agregaron 5ml de mezcla de Folch (cloroformo:metanol en proporción 2:1). Se agitó la mezcla en *vortex* durante 15min. Las muestras se filtraron, y cada filtrado se colectó en un tubo nuevo conteniendo 250µl de solución 0,5M de NaCl. Los tubos se centrifugaron durante 15min a 2000rpm en una centrifuga UV (*International Equipment Centrifuge*), empleando el rotor 279. Se descartó la fase superior por aspiración, y se transfirió la inferior a un balón de vidrio. Se evaporó el solvente en corriente de N<sub>2</sub>, y se resuspendieron los lípidos en 4ml de cloroformo. Las muestras se conservaron en viales color caramelo bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a -20°C hasta su posterior análisis.

#### 2.2.1.2. Cromatografía en capa fina

Para la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) se concentraron los lípidos extraídos según lo descrito en el *ítem 2.2.1.1*, secando los mismos en corriente de N<sub>2</sub> y resuspendiéndolos en 500µl de cloroformo. Las placas utilizadas fueron placas de 20 cm x 20 cm de *Silicagel 60* (*Merck*). La siembra de la muestra se llevó a cabo empleando una microjeringa de 10µl (*Hamilton*). Se sembraron 10µl de muestra a 1cm del borde inferior de la placa, y se desarrolló la TLC en una cuba cromatográfica saturada con los vapores de la fase móvil. La fase móvil empleada, para separación de lípidos neutros, consistió en la mezcla Hexano:Diethyléter:Ácido Acético en una proporción 80:20:1 (v:v:v). Se utilizó como estándar, una extracción de lípidos de hígado de rata. La placa se reveló mediante pulverización con una solución al 8% CuSO<sub>4</sub> en 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, seguida de incubación a 140°C hasta la aparición de color, según lo descrito en Obal et al., 2012. La imagen de la placa se digitalizó empleando un escáner convencional.

### 2.2.1.3. Cromatografía gas-líquido

Para llevar a cabo la cromatografía gas-líquido (GLC, por sus siglas en inglés), se derivatizaron los ácidos grasos empleando BF<sub>3</sub>-metanol según lo descrito en Morrison & Smith (1964), con modificaciones. El protocolo consistió en evaporar el solvente de las muestras de ácidos grasos extraídos de EgFABP1 empleando N<sub>2</sub>. Seguidamente, se agregaron 2ml de solución 10% BF<sub>3</sub> en metanol, se gasearon los tubos con N<sub>2</sub> y se colocó en un bloque termostático a 64°C durante 3 horas. Una vez fríos los tubos, se les agregaron 3ml de cloroformo y se agitó bien. Luego se agregaron 2ml de agua bidestilada y se agitó nuevamente. Se centrifugaron los tubos a baja velocidad para separar las fases (como se explicó en el ítem 2.2.1.1). Se descartó la fase superior y se lavó la fase clorofórmica dos veces con 2ml de agua bidestilada cada vez. Finalmente, se secó el extracto clorofórmico bajo corriente de N<sub>2</sub> y se resuspendieron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, por sus siglas en inglés) en *n*-hexano. Los FAMEs se analizaron por GLC empleando un equipo HP 6890 (Hewlett-Packard) según lo descrito en Maté et al. (2004).

## 2.2.2. Análisis de la interacción con ligandos por proteólisis parcial de EgFABP1

### 2.2.2.1. Digestión parcial de EgFABP1 empleando la proteasa ArgC

La proteasa ArgC (*Sigma Aldrich*) fue preincubada en *buffer* de fosfatos (descrito en el ítem 2.1.2.3) con 1mM DTT durante 2 horas a 30°C. Por otra parte, se preincubó EgFABP1 durante 30 min a 37°C con diferentes ácidos grasos: ácido mirístico (14:0); ácido palmítico (16:0); ácido esteárico (18:0) y ácido oleico (18:1 *n*-9), en una relación molar ligando:proteína de 4:1. Los diferentes ácidos grasos se disolvieron en etanol, por lo que se incluyó como control un tubo con EgFABP1 preincubada con etanol a la misma concentración final que en los tubos que contenían los ligandos. Una vez pasado el tiempo de incubación con los ácidos grasos, y previo al agregado de la proteasa, se incubaron los diferentes tubos conteniendo EgFABP1 con 1mM DTT durante 15 min más a 30°C. Se agregó la solución de proteasa a los tubos, en una relación EgFABP1:ArgC de 20:1 (en masa). Se incubaron las muestras a 30°C y se retiraron alícuotas a los 5min de iniciada la digestión, y luego de una incubación ON. Paralelamente, se trató una muestra de EgFABP1 de la misma manera, pero sin agregarle proteasa. Las alícuotas obtenidas se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis.

### 2.2.2.2. Análisis por electroforesis Tricina-SDS-PAGE

El análisis de las muestras digeridas con ArgC se realizó mediante electroforesis desnaturante empleando *buffers* de Tris-Tricina. Se emplearon geles discontinuos que consistieron en gel separador de 16,5%T 6%C, gel espaciador de 10%T 3%C y gel concentrador de 4%T 3%C, donde %T representa la concentración total de monómero (acrilamida + bisacrilamida) y %C representa la concentración de *crosslinker* (bisacrilamida) respecto de la concentración total de monómero. El *buffer* utilizado para la preparación de los geles contiene 3M Tris, 0,3%SDS, pH 8,45. Los geles, de 1mm de espesor, se prepararon empleando el equipo *MiniProtean Tetracell* (BioRad). Las muestras fueron preparadas hirviéndolas durante 5min en *buffer* de siembra. La composición de dicho *buffer* fue: 50mM Tris, 4% SDS, 12% (P/V) Glicerol, 2% (V/V)  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, pH 6,8. La electroforesis se llevó a cabo a 50V durante 30 min, seguido de 100V hasta que el frente de corrida hubiera avanzado lo suficiente (aproximadamente 2,5 horas). Como *buffer catódico* se empleó un *buffer* compuesto por 0,1M Tris, 0,1M Tricina y 0,1% SDS, y como *buffer anódico* uno compuesto por Tris 0,2M pH 8,9. La tinción de los geles y la colección de imágenes se llevaron a cabo tal como se describió en el ítem 2.1.2.2.

### 2.2.3. Análisis por dicroísmo circular de la interacción de EgFABP1 con ácidos grasos

De modo similar a lo descrito en el ítem 2.1.3.2, se obtuvieron espectros de dicroísmo circular de EgFABP1 purificada, en sus formas *apo*-EgFABP1 (libre de ligandos) y *holo*-EgFABP1 con ácido palmítico o ácido oleico. El equipo empleado fue el mismo espectropolarímetro *Jasco J-810* (*Jasco Corporation*) del Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (UBA) mencionado previamente. Estas medidas también se realizaron bajo la supervisión de la Dra. Gisela R. Franchini (INIBIOLP, UNLP-CONICET). Las cubetas utilizadas fueron las mismas cubetas ya descritas de cuarzo de 1cm y 0,1cm de paso óptico, para los espectros medidos en el UV cercano y lejano, respectivamente. Las mediciones consistieron en la colección de tres espectros, los cuáles fueron promediados. Se empleó una concentración de EgFABP1 de 31,6 $\mu$ M. Los espectros fueron colectados a una velocidad de 20nm/min, con un tiempo de respuesta de 1seg. Para los espectros en el UV cercano (250-320nm) se utilizó sensibilidad alta, mientras que para el UV lejano (200-250) se empleó sensibilidad estándar. Para obtener las formas *holo*-EgFABP1, se incubó a la proteína con los respectivos ácidos grasos (AG) en una relación molar EgFABP1:AG de 1:4 durante 40 minutos a 37°C. Los AG, se agregaron a partir de soluciones 10mM en Etanol. En todos los casos, las

proteínas se encontraban en *buffer* PBS (137mM NaCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1mM NaN<sub>3</sub>; pH 7,4). La elipticidad molar de las muestras se calculó según lo descrito por Schmid (Schmid, 1997).

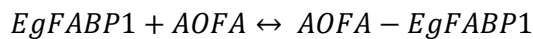
#### 2.2.4. Análisis de la interacción de EgFABP1 con análogos fluorescentes de ácidos grasos

La unión de análogos fluorescentes de ácidos grasos a EgFABP1 se llevó a cabo empleando un ensayo de titulación fluorimétrica, tal como se describió en Córscico et al. (2004). Brevemente, el ensayo consistió en incubar 0,5μM de un antroiloxi-ácido graso a 25°C durante 3min con concentraciones crecientes de EgFABP1. El *buffer* utilizado para la titulación fue el *buffer* TBS, cuya composición consiste en 40mM Tris (*Trizma, Sigma Aldrich*), 100mM NaCl, pH 7,4. Los antroiloxi-ácidos grasos (AOFA) empleados para los ensayos fueron el ácido 12-(9-antroiloxi)-esteárico y el ácido 16-(9-antroiloxi)-palmítico, 12AS y 16AP respectivamente. Los espectros de emisión fueron registrados entre 400nm y 500nm empleando un espectrofluorómetro *Fluorolog-3 (Horiba-Jobin Yvon)*. La longitud de onda de la luz empleada para la excitación,  $\lambda_{exc}$ , fue de 383nm. Para estos ensayos se emplearon cubetas de cuarzo para fluorescencia de 1cm de paso óptico (*Hellma*).

La constante de disociación se define como:

$$K_D = \frac{[EgFABP1][AOFA]}{[AOFA - EgFABP1]}$$

A partir del equilibrio:



En donde [EgFABP1] y [AOFA] representan las concentraciones en el equilibrio de proteína y ligando libres, y [AOFA-EgFABP1] la del complejo ligando-proteína.

Los datos fueron analizados empleando el *software Microcal ORIGIN*. Para el ajuste se empleó un modelo de equilibrio exacto de n-sitios de unión, tal como ha sido descrito previamente (McDermott et al., 2001). La ecuación utilizada para el ajuste es la siguiente:

$$F = F_1 + (F_2 - F_1) \left( \frac{(C_L + nC_P + K_D) - \sqrt{(C_L + nC_P + K_D)^2 - 4nC_P C_L}}{2C_L} \right)$$

En donde  $C_P$  representa la concentración de proteína,  $C_L$  representa la concentración total de ligando,  $n$  es el número de sitios de unión,  $K_D$  es la constante de disociación,  $F_1$  es la

fluorescencia del ligando en ausencia de proteína, y  $F_2$  la fluorescencia al alcanzar la saturación.

## 2.3. Análisis de la interacción de EgFABP1 con membranas

### 2.3.1. Preparación de vesículas unilamelares pequeñas

La preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) se llevó a cabo aplicando el protocolo descrito por Kleinfeld & Storch (1993). Brevemente, se mezclaron los fosfolípidos adecuados, de acuerdo a la composición de las vesículas de interés, en un balón de vidrio; se secaron bajo corriente de  $N_2$ , y se liofilizaron *ON* protegidos de la luz. Se resuspendieron los lípidos en *buffer* TBS, o TBS + 1mM EDTA en caso de SUVs que contienen cardiolipina (CL); se incubaron durante 15 min a  $37^\circ C$ , con agitación, y luego se sometió la mezcla a ultrasonido. Para ello, se utilizó un sonicador de punta *S-450 (Branson)* con punta chata. Se empleó un ciclo de trabajo de 70% a una potencia de entre 3 y 4 durante 45min. Durante dicho proceso, los lípidos (ubicados en un recipiente adecuado, con camisa termostatazada) se mantuvieron refrigerados por una corriente de agua/hielo, y bajo corriente de  $N_2$  para evitar su oxidación. Posteriormente, se centrifugó la muestra, a  $4^\circ C$ , durante 45 min a 45000rpm, empleando un rotor *70.1Ti* en una ultracentrífuga *Optima LE-80K (Beckman Coulter)*. El sobrenadante obtenido, conteniendo las SUVs, se conservó en tubos de vidrio color caramelo a  $4^\circ C$  bajo atmósfera de  $N_2$  para su posterior uso. La cuantificación de las vesículas (como concentración final de fosfolípidos) se llevó a cabo empleando la técnica descrita por Gomori (1942) para determinación de fósforo inorgánico. Para llevar a cabo dicha técnica, se mezclaron las muestras de trabajo, y muestras con distintas cantidades de una solución patrón 1mM  $NaH_2PO_4$  que se utilizaron para armar una curva de calibración, con 30 $\mu$ l de una solución al 10% de  $Mg(NO_3)_2$ , y se incubaron a  $140^\circ C$  *ON*. Posteriormente, se agregaron 400 $\mu$ l de 0,5M HCl a las muestras carbonizadas, se agitaron en *vortex* y se incubaron durante 30 min en un baño de agua hirviendo. Luego se agregaron 930 $\mu$ l de una mezcla 6:1 (v/v) de solución de ácido molibdato (0,42% molibdato de amonio tetrahidrato en 1N  $H_2SO_4$ ) y 10% ácido ascórbico; y se incubaron las muestras a  $37^\circ C$  durante 1 hora. La absorbancia a 820nm de cada muestra se midió en un espectrofotómetro *T70+ UV/Vis (PG Instruments)* empleando cubetas de vidrio de 1cm de paso óptico (*Hellma*). El cálculo de la concentración de fosfolípidos en la muestra se realizó mediante la curva de calibración preparada con cantidades conocidas de  $NaH_2PO_4$ . En el caso de las vesículas con CL en su composición, la concentración de fosfolípidos debe corregirse debido a la presencia de dos grupos fosfatos por cada molécula de CL. Se prepararon SUVs de diversas composiciones de acuerdo al experimento en que fueran a ser utilizadas. Las SUVs estándar para los ensayos de



transferencia de 12AS a membranas se prepararon mezclando 90 mol % de fosfatidilcolina de huevo (EPC, por sus siglas en inglés) y 10 mol % del fosfolípido fluorescente N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-fosfatidilcolina (NBD-PC), que actúa como *quencher* de la fluorescencia del grupo antroiloxi del 12AS. Para aumentar la densidad de carga negativa de las vesículas aceptoras, se reemplazó un 25 mol% de EPC por una cantidad equimolar de fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés) o CL. Para el ensayo de interacción con membranas por competencia con citocromo c (CitC) se prepararon SUVs conteniendo 64 mol % EPC, 10 mol % fosfatidiletanolamina de huevo (EPE), 25 mol % CL y 1 mol % dansil-fosfatidiletanolamina (DPE). DPE es un fosfolípido con un grupo dansilo fluorescente cuya fluorescencia es apagada por interacción con el grupo hemo del CitC.

### 2.3.2. Determinación del coeficiente de partición ( $K_P$ ) de 12AS entre EgFABP1 y SUVs

El coeficiente de partición del 12AS entre EgFABP1 y SUVs conteniendo NBD se determinó midiendo la fluorescencia del complejo 12AS-EgFABP1 para diferentes concentraciones de SUVs (preparadas según lo descrito en el ítem 2.3.1). Brevemente, se incubaron 10 $\mu$ M EgFABP1 y 1 $\mu$ M 12AS en *buffer* TBS a 25°C, se registró la emisión de fluorescencia del 12AS ( $\lambda_{em}$ =440nm;  $\lambda_{exc}$ =383nm) y luego se agregaron concentraciones crecientes de SUVs, incubando la mezcla durante 3min antes de coleccionar los espectros de emisión (Massey et al., 1997). El coeficiente de partición relativo ( $K_P$ ) se define como:

$$K_P = \frac{[12AS - EgFABP1]}{[EgFABP1]} \times \frac{[SUV]}{[12AS - SUV]}$$

Donde [12AS-EgFABP1] y [12AS-SUV] son las concentraciones de 12AS unido a la proteína o las vesículas, respectivamente; y [EgFABP1] y [SUV] son las concentraciones de proteína y vesículas. Tal como se mencionó en el ítem 2.3.1, la molécula de NBD presente en el fosfolípido NBD-PC de las vesículas es un *quencher* de la fluorescencia del 12AS, por lo que la emisión de fluorescencia de este último disminuye al ser transferido a las vesículas. La disminución de la fluorescencia del 12AS en función del aumento de la [SUV] se relaciona con el  $K_P$  según:

$$F_{rel} = \frac{a \times K_P}{K_P + \frac{[SUV]}{[EgFABP1]}} - b \times \frac{[SUV]}{[EgFABP1]}$$

Donde  $F_{rel}$ , [SUV], [EgFABP1],  $K_P$ ,  $a$  y  $b$  son la fluorescencia relativa, la concentración molar de SUV, la concentración molar de EgFABP1, el coeficiente de partición, y parámetros de ajuste, respectivamente (De Gerónimo et al., 2010). El coeficiente de partición se utilizó para establecer las condiciones para los ensayos de transferencia de 12AS de modo de asegurar una transferencia unidireccional.

### 2.3.3. Determinación de la velocidad de transferencia de 12AS desde EgFABP1 a SUVs

La determinación de la velocidad de transferencia de 12AS desde EgFABP1 a SUVs se realizó empleando un ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster, o FRET (del inglés, *Förster Resonance Energy Transfer*), como fue descrito para otras FABPs (Storch & Bass, 1990; Hsu & Storch, 1996; Córscico et al., 1998). Para este ensayo se utilizó un módulo de mezclado rápido *stopped-flow RX2000* (Applied Photophysics Ltd.) adosado al espectrofluorómetro *Fluorolog 3*. Este equipo permite mezclar casi instantáneamente dos soluciones, y simultáneamente activa el registro de la fluorescencia por parte del espectrofluorómetro al que está acoplado. De este modo, se mezcló el complejo EgFABP1-12AS (en relación molar 15:1, de modo que no quede más de un 1% de ligando libre) con SUVs conteniendo NBD-PC, a 25°C, empleando distintas relaciones molares SUV:EgFABP1 de modo de garantizar una transferencia unidireccional del ligando, teniendo en cuenta el valor de  $K_P$  obtenido como se describió en el ítem 2.3.2. Al mezclar, la transferencia del 12AS desde EgFABP1 a las SUVs se monitorea como una caída en función del tiempo de la fluorescencia del 12AS (debido a que su fluorescencia es inactivada por el NBD de las vesículas). Las diferentes proporciones SUV:EgFABP1 utilizadas fueron (en relación molar) 10:1, 20:1 y 40:1. En estos experimentos, se emplearon SUVs con diferentes composiciones (como se describió en el ítem 2.3.1), así como variantes del *buffer* TBS con concentraciones crecientes de NaCl. Se realizaron controles de fotoblanqueo (o *photobleaching*) previos a cada experimento, tal como se describió en Córscico et al. (1998). Los datos se analizaron empleando *SigmaPlot*. Para cada condición experimental dentro de un experimento, se realizaron al menos cinco réplicas.

### 2.3.4. Determinación de la unión de EgFABP1 a SUVs por competencia con citocromo c

Para analizar la posible asociación de EgFABP1 con membranas fosfolipídicas artificiales se empleó un ensayo basado en la capacidad del citocromo c (CitC) de unirse a membranas acídicas (Mustonen et al., 1987). La unión de CitC a membranas acídicas conteniendo DPE (Ver ítem 2.3.1) se monitoreó siguiendo la fluorescencia del grupo *dansilo* de dicha sonda. Una caída en su fluorescencia se corresponde con la unión del CitC a la membrana, ya que su grupo *hemo* es un *quencher* de la fluorescencia del grupo *dansilo*. La capacidad de EgFABP1 de interactuar con las membranas se evidenció como una disminución de la supresión de la fluorescencia del DPE inducido por el CitC. Inicialmente, se analizó la disminución de la fluorescencia del grupo *dansilo* en función de agregados crecientes de CitC con la finalidad de determinar la concentración mínima de CitC necesaria para causar la máxima disminución de la fluorescencia del DPE. Para ello, se incubaron 15µM de DPE-SUVs con concentraciones crecientes de CitC (*Sigma Aldrich*) y se registró, para cada condición, la fluorescencia del grupo *dansilo* ( $\lambda_{exc}=335nm$ ;  $450nm \leq \lambda_{em} \leq 600nm$ ). Una vez determinada la concentración de CitC a utilizar, se procedió a evaluar la interacción de EgFABP1 con las SUVs. Para ello, se mezclaron en una cubeta de 200µl (*Hellma*), 15µM SUV con EgFABP1. Luego de 2 min de incubación, se registró la fluorescencia a 520nm del DPE. Seguidamente, se incorporó a la mezcla 1µM de CitC, se incubó por 2 min más, y se midió nuevamente la fluorescencia a 520nm. El procedimiento se repitió para cada una de las concentraciones de EgFABP1 utilizadas. El *buffer* utilizado fue 20mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,4.

## 2.4. Identificación y análisis de FABPs de *E. multilocularis*

### 2.4.1. Análisis bioinformático del genoma de *E. multilocularis*

Para el análisis bioinformático del genoma de *E. multilocularis* se contó con la asistencia del Dr. Ferenc Kiss (Universidad de Wurzburg, Alemania). La búsqueda de las FABPs de *E. multilocularis* se llevó a cabo empleando el programa informático *BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y los programas incluidos en el mismo. Como punto de partida para el análisis se tomaron las secuencias de EgFABP1 y EgFABP2 publicadas por el grupo de la Dra. Esteves (Esteves et al. 1993, Esteves et al. 2003), disponibles en las bases de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) bajo los números de acceso AF321119.1 y AF321117.1, respectivamente. Se emplearon las herramientas *BLASTN*, *TBLASTN*, *BLASTX* y *BLASTP* para comparar las secuencias de

EgFABP1 y EgFABP2, tanto con el borrador del genoma de *E. multilocularis* disponible en el laboratorio del Dr. Brehm (antes de la publicación de dicho genoma por Tsai et al., 2013), como con datos de transcriptómica, tanto de dicho organismo como de cestodos relacionados, y con bases de datos de proteínas predichas *in silico*. La versión del genoma empleada para realizar las búsquedas fue la versión “emu.contigs\_171109” generada por Wellcome Trust Sanger Institute. Actualmente, dicha versión, así como otras posteriores, se encuentran disponibles en <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Echinococcus/multilocularis/genome/ARCHIVE/>.

#### 2.4.2. Diseño de siRNAs contra EmFABP1 y EmFABP2

El diseño de los siRNAs se llevó a cabo empleando el programa *BLOCK-iT RNAi* (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>). Se seleccionó un siRNA dirigido contra *emfabp1* y uno contra *emfabp2* (genes ortólogos a *egfabp1* y *egfabp2*, respectivamente), a los cuáles se les eliminaron dos bases de sus extremos 3', según lo descrito por Spiliotis et al. (2010). Se chequeó mediante *BLAST* que cada siRNA seleccionado tuviera como blanco exclusivamente al gen contra el cual se había diseñado. Como control, se utilizó el mismo siRNA empleado por Spiliotis et al. (2010), dirigido contra el ARN mensajero de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*, que no cuenta con genes ortólogos en *E. multilocularis*. Los siRNA se compraron a *Sigma Aldrich*. Las secuencias de los siRNAs correspondientes se detallan en el *Apéndice 7.1.2*.

#### 2.4.3. Obtención, aislamiento y cultivo de células de *E. multilocularis*

La obtención de células primarias de *E. multilocularis* para los ensayos de silenciamiento se realizó a partir de vesículas (metacestodos) obtenidas en co-cultivo con células Reuber RH- de hepatoma de rata (ATCC no. CRL-1600), gentilmente cedidas por el Dr. Uriel Koziol (Universidad de Wurzburg, Alemania). Las mismas tenían al menos tres meses de cultivo en las condiciones mencionadas y provenían de material parasitario extraído a partir de gerbos (organismo utilizado como hospedador de laboratorio de *E. multilocularis*). Se utilizó material correspondiente al aislamiento GH09 en un caso, y JAVA en otro. Para el aislamiento de las células primarias de *E. multilocularis* se empleó el protocolo descrito por Spiliotis et al., (2010). Brevemente, el mismo consistió en realizar inicialmente un cultivo *ON* de vesículas de metocestodo en atmósfera de N<sub>2</sub> y con condiciones reductoras para propiciar la eliminación de las células de hepatoma de rata que pudieran haber quedado en el cultivo luego de los reiterados lavados con PBS efectuados a las vesículas. Para dicho cultivo se empleó el medio

condicionado “cDMEM” (Dulbecco’s MEM (*Biochrom AG*) + 10% suero fetal bovino inactivado (*Biochrom AG*) + 200 unidades/ml PenStrep (*Gibco*), condicionado por una semana en presencia de células Reuber RH-) adicionado, luego de esterilizar, con 10 $\mu$ M batocuproína disulfonato, 1 $\mu$ l/ml  $\beta$ -mercaptoetanol y 100 $\mu$ M L-cisteína. Las botellas de cultivo se gasearon con N<sub>2</sub>. La incubación se realizó en una estufa gaseada a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se lavaron las vesículas exhaustivamente con PBS y se las escurrió con ayuda de un aro de metal con gasa, tal como se describe en Spiliotis & Brehm (2009), con la finalidad de retirar la mayor cantidad de PBS posible. Seguidamente, se rompieron las vesículas por pipeteo empleando una pipeta de 10ml. Se estimó el volumen de vesículas rotas empleando la graduación del tubo cónico en el cual fueron colectadas. Se llevó a cabo una centrifugación de 6 minutos a 600 x g en rotor de ángulo fijo. El sobrenadante resultante se retiró con pipeta. Se lavaron los *pellets* exhaustivamente con PBS, hasta que el sobrenadante se observara traslúcido. Se centrifugó nuevamente a 600 x g durante 6 minutos, y se descartó el sobrenadante, retirándolo con pipeta. Los *pellets* se resuspendieron en 4 volúmenes de tripsina/EDTA, se agitaron suavemente los tubos, y se incubaron a 37°C durante 25 minutos aproximadamente. A continuación, se realizó un filtrado empleando gasa de 30 $\mu$ m de poro adosada a un vaso de precipitados. Luego de pasar toda la suspensión por la gasa, se enjuagó la misma con PBS y se colectaron los restos retenidos en ella en un tubo cónico. A eso se le agregaron 5ml de tripsina/EDTA, se agitó más fuertemente que la vez anterior, y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Dicha operación se repitió 3 veces. El líquido filtrado, colectado en el vaso de precipitados, se volvió a filtrar a través de gasa nueva. El filtrado resultante se centrifugó durante 1 minuto a 100 x g en rotor oscilante, para eliminar los corpúsculos calcáreos. Los sobrenadantes colectados se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos en rotor oscilante. Se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets en PBS en un volumen tal que fuera la mitad del volumen estimado de vesículas rotas obtenidas. A continuación, se tomaron 12,5 $\mu$ l de muestra y se diluyeron con 1ml de PBS, para luego medirles la DO a 600nm. Una DO<sub>600</sub>=0,02 se define como 1 unidad (U). De este modo, teniendo en cuenta la medida realizada, se sembraron 500 U por pocillo en placas de 6 pocillos, cada uno conteniendo 4ml de medio cMEM suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol y L-cisteína como se describió previamente, pero sin batocuproína disulfato. Las células se resuspendieron suavemente con pipeta P1000, y se colocó la placa dentro de una bolsa tipo *Ziploc*. Se gaseó la bolsa 2 veces con N<sub>2</sub> y se cerró. Se realizó una incubación ON a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.4. Electroporación de células de *E. multilocularis*

El día posterior al aislamiento de las células primarias de *E. multilocularis*, y como paso previo a la electroporación de las mismas, se juntaron las células de dos pocillos de la placa en uno solo, y se incubaron durante 3 horas a 37°C en las mismas condiciones que antes. Pasado dicho tiempo, se colectaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 100 x g. El sobrenadante se retiró con pipeta y se descartó. Se resuspendió cada *pellet* en 2ml de *buffer de electroporación* (120mM Trehalosa, 20mM HEPES, 1mM Mioinositol, 1mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM Glutación; pH 6,9; conductividad <1,3mS), de modo de obtener una suspensión de 0,5 U/μl (*Ver ítem 2.4.3*). Por cada 50 U se aplicó 1μg de siRNA. La electroporación se llevó a cabo en cubetas de 2mm, aplicando 400V y 1μF mediante un electroporador *GenePulser (BioRad)*. Luego de la electroporación, se incubaron las células durante 10 minutos a 37°C, se centrifugaron a 100 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 200μl de medio cDMEM con L-cisteína y β-mercaptoetanol, y se sembraron en placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37°C en atmósfera de N<sub>2</sub>, tal como se describió en el *ítem 2.4.3*. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días aproximadamente.

#### 2.4.5. Monitoreo de los niveles de expresión de las FABPs de *E. multilocularis*

Para analizar los niveles de expresión de las FABPs de *E. multilocularis* se llevaron a cabo experimentos de *Western Blot* y RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa) semicuantitativa.

##### 2.4.5.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, se colectaron las muestras a partir de los pocillos de la placa en la que se realizaron los cultivos, se colocaron en tubos tipo *ependorf* de 1,5ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 100 x g. Se descartaron los sobrenadantes, y se resuspendieron los *pellets* en 100μl cada uno de *buffer de siembra* sin β-mercaptoetanol. Se hirvieron las muestras durante 10 minutos a 100°C y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 x g. Los sobrenadantes se conservaron a -20°C para su posterior análisis.

#### 2.4.5.2. SDS-PAGE/Western Blot

Para llevar a cabo el análisis por *Western Blot* de los niveles de expresión de las FABPs de *E. multilocularis* se realizó primeramente una electroforesis SDS-PAGE de las muestras de proteínas obtenidas según lo descrito en el ítem 2.4.5.1. Dichas muestras se cuantificaron empleando el kit *BCA Protein Assay Kit (Pierce)* según las indicaciones del fabricante, de modo de sembrar en el gel aproximadamente 2µg totales de proteína por muestra. El protocolo de SDS-PAGE empleado fue similar al descrito en el ítem 2.1.2.2. Las muestras se corrieron durante una hora a 150V. Seguidamente, se realizó la transferencia de las muestras a membranas de nitrocelulosa empleando un equipo de transferencia húmeda *Mini Trans-Blot (BioRad)*. La transferencia se llevó a cabo a 350mA durante una hora. Luego de la transferencia se bloquearon las membranas durante una hora a temperatura ambiente con una solución al 5% de leche en polvo descremada preparada en *buffer TBST* (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8). Posteriormente, se incubaron las membranas ON a 4°C, con agitación, con el anticuerpo monoclonal de ratón α-Elp diluido 1:1000 en *buffer TBST + 5% leche*. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con *buffer TBST*, y se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos α-inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa, diluidos en *buffer TBST + 5% leche* según indicaciones del fabricante. Luego de hacer 3 lavados de 10 minutos cada uno con *buffer TBST*, se revelaron los *Western Blots* empleando el reactivo *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)* y placas radiográficas. Una vez obtenidos los resultados, se lavaron las membranas durante 5 minutos en *buffer TBST* y se incubaron durante 3 horas a 50°C en *buffer de stripping* (20mM Tris, 2% SDS, 0,7% β-mercaptoetanol, pH 6,8) para remover los anticuerpos. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con *buffer TBST*, se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con 5% de leche en *buffer TBST*, y se repitió el protocolo descrito utilizando el anticuerpo α-EgFABP1 (Ver Apéndice 7.4) diluido 1:20000 en *buffer TBST + 5% leche*, como anticuerpo primario, y un anticuerpo α-inmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa, diluido 1:5000 en el mismo *buffer*. Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y analizadas utilizando el programa informático *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

#### 2.4.5.3. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, se cosecharon los agregados celulares de las placas de 96 pocillos y se transfirieron a microtubos de 1,5ml. Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 100 x g, y se descartaron los sobrenadantes. Los *pellets* se resuspendieron en 100µl del reactivo *Isol-RNA Lysis Reagent (5Prime)* y se conservaron a -80°C hasta su

posterior uso. Al momento de realizar la extracción de ARN, se descongelaron las muestras y se pipetearon para disgregar las células y homogeneizar la mezcla. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 4°C durante 10 minutos a 12000 x g. Los sobrenadantes se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se les agregó cloroformo respetando la proporción recomendada por el fabricante de 200µl de cloroformo por cada 1ml de reactivo *Isol-RNA Lysis Reagent* utilizado para la lisis. Los tubos se mezclaron por agitación intensa durante 15 segundos y luego se dejaron reposar unos minutos (2-3 minutos) a temperatura ambiente. Luego de centrifugar durante 15 minutos a 12000 x g (a 4°C), se separaron las fases acuosas y se transfirieron a nuevos tubos. A ello se añadió isopropanol (0,5ml de isopropanol por cada ml de *Isol-RNA Lysis Reagent* empleado) y se mezcló exhaustivamente con *vortex*. Luego de incubar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente, las mismas se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos, a 4°C. Una vez descartados los sobrenadantes, se agregó etanol 75% a las muestras (al menos 1ml por cada ml del reactivo de lisis empleado). Se centrifugaron las muestras nuevamente, a 7500 x g durante 5 min, a 4°C. Una vez eliminados los sobrenadantes, se secaron los *pellets* de ARN incubándolos 5 minutos a 37°C, y se los resuspendió en 20µl de agua libre de ribonucleasas (una breve incubación a 65°C durante 10 minutos favoreció la disolución).

#### 2.4.5.4. Síntesis de cDNA

Como paso previo a la síntesis de cDNA, se realizó un paso de digestión del ADN. Para ello, se utilizaron 2 U de DNAsa libre de RNAsas (*RQ1 RNase-Free DNase, Promega*) por µg de ARN. Las mezclas de reacción se incubaron durante 1 hora a 37°C. Pasado dicho tiempo, la reacción se detuvo mediante el agregado de *solución de stop* (provista por el fabricante) e incubación a 65°C por 10 minutos. Para la síntesis de cDNA se preparó inicialmente una mezcla conteniendo 50pmol de *primer* oligo-dT, mezcla de dNTPs a concentración final de 1mM y el ARN molde (no más de 5µg), todo en un volumen de 10µl. Dicha mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos, y se enfrió inmediatamente en hielo. Seguidamente, se preparó la mezcla de reacción combinando, en un volumen de 20µl, la premezcla de molde y *primer*, 100 unidades de la enzima *PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa)*, el *buffer* y el inhibidor de RNAsas provistos por el fabricante, y agua libre de RNAsas. La reacción se llevó a cabo incubando la mezcla durante 1 hora a 42°C, seguido de una incubación de 15 minutos a 70°C y su inmediato pasaje a hielo.



#### 2.4.5.5. RT-PCR semicuantitativa

Para los ensayos de RT-PCR semicuantitativa, se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 del cDNA molde; y los ciclos de la PCR se limitaron a 30. Para las mezclas de reacción se emplearon dNTPs a una concentración final de 200 $\mu$ M de cada uno de ellos, 1 unidad de Taq polimerasa (*New England Biolabs*), *buffer* provisto por el fabricante, y 0,8 $\mu$ M de *primers* directo e inverso (variando para cada reacción el par de *primers* de acuerdo a la secuencia que se deseara amplificar) en un volumen final de 25 $\mu$ l. Se empleó el gen constitutivo *elp* (Brehm et al., 2003) a los fines de normalizar los resultados. Los ciclos de temperatura empleados consistieron en una incubación de 2 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de incubaciones de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C (o 45°C, dependiendo de los *primers*) y 1 min a 72°C, para finalizar con una incubación de 10 minutos a 72°C. Las secuencias de los *primers* empleados para la amplificación de los genes de las EmFABPs se encuentran en el *Apéndice 7.1.1*. Los resultados de las PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% tal como se describió en el *ítem 2.1.1.5*, aunque utilizando *buffer TAE* (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8) en lugar de *TBE*. Las electroforesis se llevaron a cabo a 100V durante 30 minutos, y los geles fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de ADN.

#### 2.4.6. Clonado y caracterización *in silico* de FABPs de *E. multilocularis*

##### 2.4.6.1. Clonado de las secuencias codificantes de las diferentes EmFABPs

Para el clonado de las secuencias codificantes de las EmFABPs se partió de cDNA obtenido a partir de agregados de células primarias de *E. multilocularis* cultivados por dos días en condiciones axénicas en el laboratorio del Dr. Brehm. Dichas células correspondían al aislamiento JAVA. Para la amplificación por PCR de las secuencias buscadas se empleó la polimerasa de alta fidelidad *Platinum® Pfx DNA polymerase* (Invitrogen), empleando el protocolo descrito en el *ítem 2.1.1.3*. En los ciclos de amplificación se utilizó la misma configuración descrita en dicho ítem, salvo la temperatura de hibridación que varió de acuerdo a los *primers* usados en cada caso. La temperatura de hibridación (o *annealing*) utilizada fue de 45°C para las PCR de *emfabp4* y de 50°C para las demás secuencias. Los productos de PCR se chequearon por electroforesis en geles de agarosa (*Ver ítem 2.1.1.5*). Para la purificación de los fragmentos amplificados, se sembró la totalidad de las PCR obtenidas en geles de agarosa de 1,2% y se procedió según lo descrito en el *ítem 2.1.1.6*. Una vez purificados los fragmentos de PCR, se debió aplicar un protocolo para agregar una

adenina en el extremo 3' de los mismos (protocolo de *A-tailing*) para poder clonarlos en el plásmido *pGEM-T Easy* (*Promega*), ya que la polimerasa empleada para la amplificación deja los extremos romos. Para ello, se emplearon 5 unidades de *Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*), 0,2mM dATP, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 5-8µl de producto de PCR purificado, el *buffer* provisto por el fabricante de la enzima, y agua bidestilada estéril, en un volumen final de 10µl. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 minutos a 70°C. Seguidamente, se realizaron las reacciones de ligación en el vector *pGEM-T Easy*, el cual se encuentra predigerido y cuenta con nucleótidos de timidina protruyentes capaces de aparearse con las adeninas agregadas a los insertos. Las mezclas de reacción realizadas constaron de 1µl de vector *pGEM-T Easy*, 5µl de producto de PCR, 1µl de *T4 DNA Ligase* y el *buffer* adecuado, provistos por el fabricante del vector. Los tubos con las mezclas de reacción se incubaron a 4°C durante toda la noche. Seguidamente, se transformaron bacterias de la cepa *E. coli XL-1 Blue* siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.1.1.10. La selección de las bacterias transformadas se llevó a cabo empleando placas de medio LB/Agar/Ampicilina (tal como se describió en el ítem 2.1.1.10) a las cuales se les agregó 10µl de IPTG (400mM) y 10µl de una solución 50mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranósido, o X-gal (*Promega*), para el monitoreo blanco/azul de los clones que contenían inserto ligado al vector. Dicho *screening* explora la habilidad de las colonias de hidrolizar el compuesto X-gal. Brevemente, en el plásmido *pGEM-T Easy* el sitio múltiple de clonado se encuentra en medio de una secuencia que codifica un fragmento de la enzima β-galactosidasa, capaz de complementar al fragmento que es codificado en el genoma de bacterias mutantes, como es el caso de *E. coli XL-1 Blue*. Si se inserta un fragmento de ADN en el vector, tal que interrumpa dicha secuencia, no puede llevarse a cabo la complementación. De este modo, fenotípicamente, la bacteria carecerá de actividad β-galactosidasa. Al cultivar las bacterias en placas conteniendo el compuesto X-gal (hidrolizable por la acción de la β-galactosidasa), se revelan como colonias azules las que tienen actividad β-galactosidasa (sin inserto en el vector) y como blancas aquellas que tienen un vector recombinante (Sambrook & Russell, 2001). Se seleccionaron, por lo tanto, colonias blancas, las cuales fueron cultivadas en medio LB líquido para realizar extracciones de ADN plasmídico (Ver ítem 2.1.1.1). Los plásmidos obtenidos se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* (Ver ítem 2.1.1.4) para luego analizar por electroforesis en geles de agarosa (Ver ítem 2.1.1.5) la presencia de insertos de tamaños correspondientes a lo esperado. Los plásmidos recombinantes se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Se empleó el *primer* universal del promotor SP6. Las secuencias experimentales obtenidas se alinearon con las secuencias predichas empleando la herramienta *CLUSTALW* del programa bioinformático *BioEdit* (Ver ítem 7.3.2).

#### **2.4.6.2. Caracterización bioinformática de las secuencias proteicas de las FABPs de *E. multilocularis***

Para la caracterización de las secuencias de las FABPs de *E. multilocularis* se emplearon diversas herramientas bioinformáticas. La búsqueda de dominios característicos de FABPs se llevó a cabo empleando la herramienta bioinformática *InterPro* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Los gráficos que representan los resultados obtenidos se realizaron mediante el programa *UGENE*, disponible en <http://ugene.unipro.ru/>. La predicción de estructuras secundarias se realizó mediante el programa *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Los alineamientos de secuencia se realizaron empleando la herramienta *CLUSTALW*, mientras que los porcentajes de similitud de secuencia se calcularon comparando de a pares las secuencias utilizando una herramienta desarrollada para tal fin, ambas del programa *BioEdit*. La comparación de las EmFABPs con proteínas de otros organismos se realizó empleando la herramienta *BLASTP* del sitio del NCBI, *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **2.4.6.3. Caracterización bioinformática de los genes de las FABPs de *E. multilocularis***

El análisis de la posición de los intrones en los genes de las EmFABPs se llevó a cabo por comparación de las secuencias codificantes, o CDS (*coding DNA sequences*), de los distintos genes, con las secuencias genómicas correspondientes empleando la herramienta *Splign* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign>). Las coordenadas de los genes en el genoma de *E. multilocularis* se obtuvieron mediante la herramienta *BLASTN* del programa *BioEdit*. La visualización de los genes en el genoma se realizó empleando el programa informático *UGENE*. Para ello, se contó con la colaboración del Lic. Lucas Maldonado (IMPAM, UBA-CONICET).

#### **2.4.6.4. Predicción de FABPs en *E. granulosus* y comparación con las FABPs de *E. multilocularis***

La búsqueda de los genes ortólogos a las EmFABPs en el genoma de *E. granulosus* se llevó a cabo empleando las herramientas *BLAST*, tanto de la base de datos *GeneDB* del Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.genedb.org/Homepage>) como las del programa *BioEdit*, comparando con la versión "Egranulosus\_genome\_v3" del genoma de *E. granulosus* disponible en <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Echinococcus/granulosus/genome>.

Los alineamientos se realizaron también con la herramienta *CLUSTALW* del programa *BioEdit*.

#### **2.4.6.5. Análisis de la expresión de FABPs en *E. multilocularis***

Para realizar estos experimentos se utilizó el protocolo de RT-PCR semicuantitativa descrito en el *ítem 2.4.5.5* de la presente sección. Los cDNA utilizados como molde fueron gentilmente cedidos por el Dr. Uriel Koziol (Universidad de Wurzburg, Alemania).



### 3. RESULTADOS

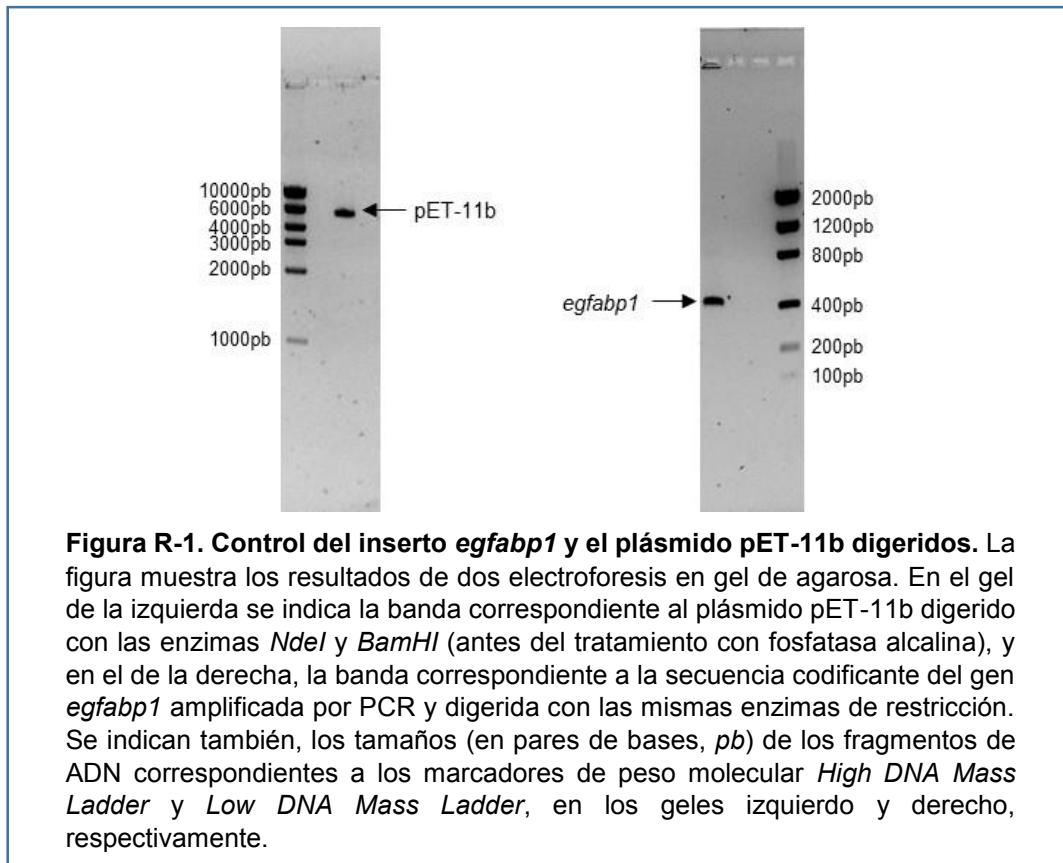
#### 3.1. Subclonado y purificación de EgFABP1

##### 3.1.1. Subclonado de EgFABP1

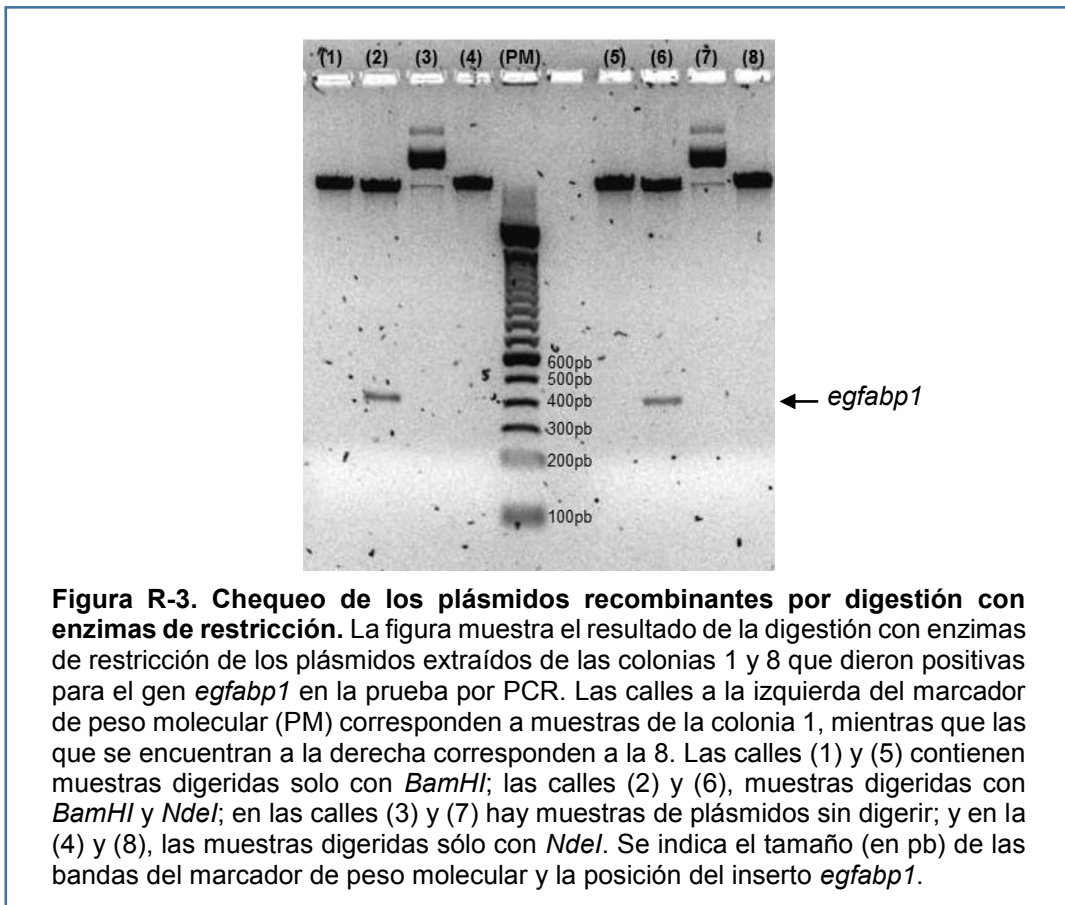
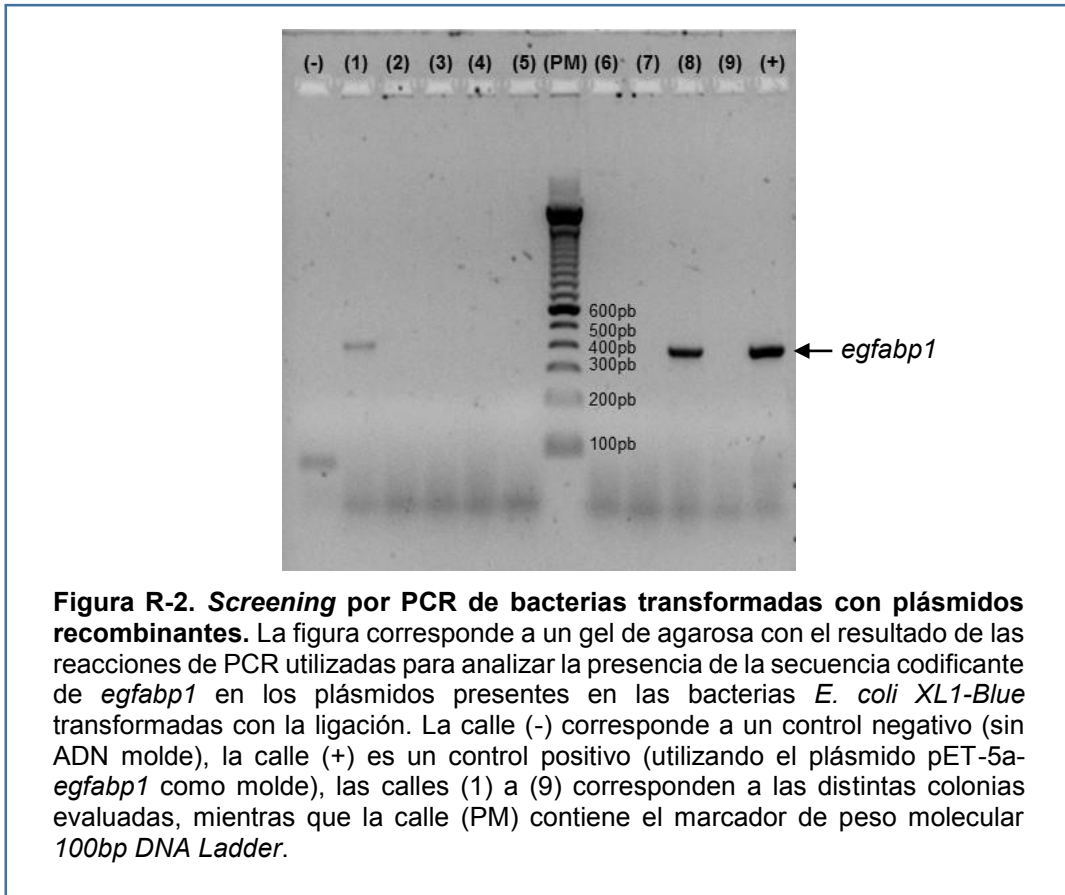
Durante ensayos de purificación de EgFABP1 recombinante previos a este trabajo, se detectó la presencia de una proteína de aproximadamente 30kDa que resultaba difícil de separar de EgFABP1. Asimismo, se notó que el nivel de expresión de dicha proteína era bastante alto y que respondía a la inducción con IPTG, por lo que se concluyó que podía ser la  $\beta$ -lactamasa codificada por el vector pET-5a en el que se encontraba clonada la región codificante del gen de EgFABP1 (Ver Apéndice 7.2).

Con la finalidad de intentar subsanar dichos inconvenientes, se decidió subclonar la región codificante para EgFABP1 en el vector de expresión pET-11b. Dicho vector cuenta con un terminador de la transcripción proveniente del fago T7 (río abajo del sitio de clonado) que evita que la RNA polimerasa genere transcritos que incluyan, junto al mensajero de interés, la secuencia codificante de la  $\beta$ -lactamasa. Por otro lado, el vector pET-11b también codifica para el represor LacI, y cuenta con un *operador lac* entre el promotor del fago T7 y el sitio de clonado (Ver Apéndice 7.2). De este modo, se puede obtener una expresión más regulada de la proteína recombinante clonada en dicho vector, ya que en ausencia de IPTG el represor LacI se encuentra unido al operador lac y evita la transcripción del gen de interés. Esto es importante para reducir las posibilidades de que la expresión basal de la proteína recombinante pueda dificultar el crecimiento del cultivo bacteriano.

Para llevar a cabo el subclonado de la región codificante del gen *egfabp1*, se realizó una PCR con *primers* específicos para dicha secuencia (Ver ítem 2.1.1.3 de la sección *Materiales y Métodos*) utilizando como molde el plásmido pET-5a-*egfabp1* generado en el laboratorio de la Dra. Esteves (UdelaR, Montevideo, Uruguay). Por otra parte, se transformaron bacterias de la cepa *E. coli XL1-Blue* con el plásmido pET-11b (Ver ítem 2.1.1.10 de *Materiales y Métodos*) para amplificarlo y luego extraerlo siguiendo los protocolos descriptos en el ítem 2.1.1.1 de la sección *Materiales y Métodos*. Ambas moléculas de ADN (fragmento amplificado por PCR y vector) fueron digeridas con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, tal como se describió previamente. Las muestras digeridas con las enzimas de restricción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (*Figura R-1*) y se purificaron los fragmentos de interés siguiendo los protocolos descriptos en la sección de *Materiales y Métodos*.



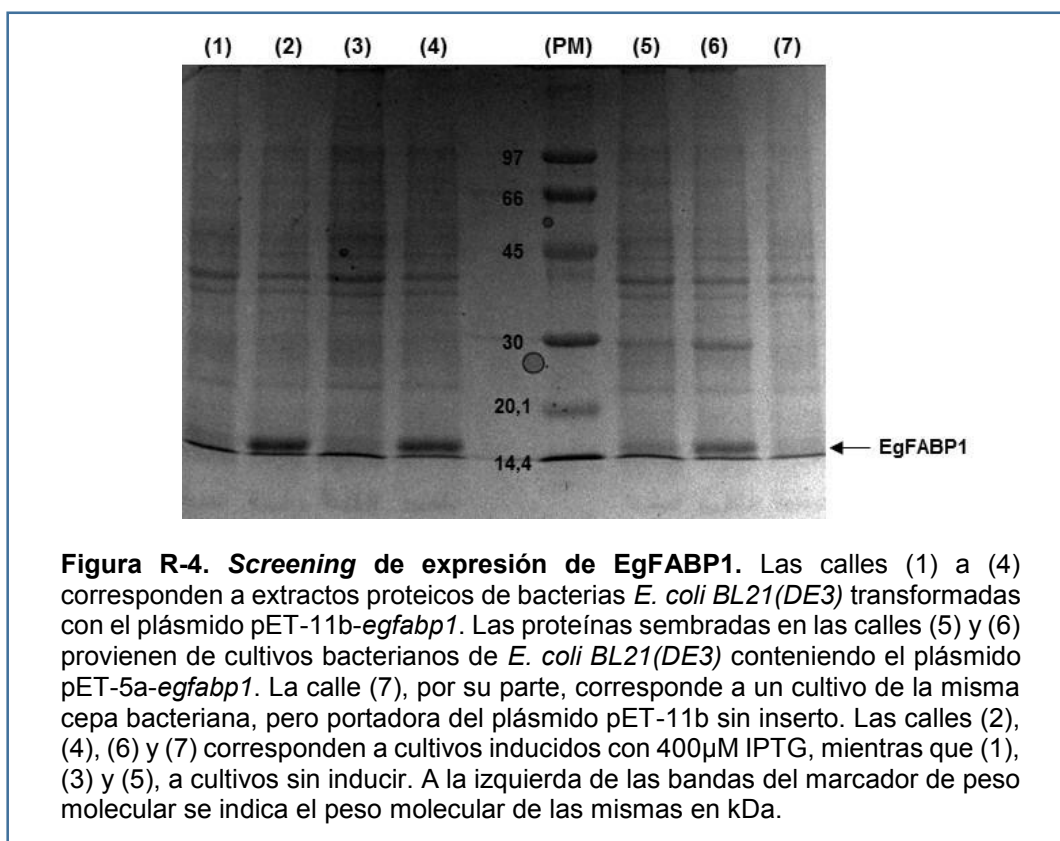
El vector pET-11b digerido fue desfosforilado, mediante tratamiento con fosfatasa alcalina, para evitar la religación del mismo. Las ligaciones se realizaron en presencia de un exceso de inserto. Posteriormente, se transformaron bacterias competentes de la cepa *E. coli XL1-Blue* con la mezcla de ligación y se cultivaron en placas de LB/Agar/Ampicilina. Para determinar las colonias transformadas con el vector conteniendo el inserto se aplicó la técnica de PCR según lo descrito en el ítem 2.1.1.10 de la sección *Materiales y Métodos*. Se encontraron dos colonias que dieron resultados positivos por PCR (*Figura R-2*), las cuales se cultivaron en mayor escala para aislar el plásmido y para generar *stocks* de glicerol que fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una muestra de cada uno de los plásmidos obtenidos a partir de las colonias positivas se digirió con *NdeI* y *BamHI*, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa para rechequear que el tamaño del inserto clonado fuera el adecuado, es decir, 402pb (*Figura R-3*). Finalmente, los plásmidos obtenidos se secuenciaron mediante el servicio de secuenciado de la empresa *Macrogen Inc.*, empleando para ello los *primers* específicos EgFABP1-Fw y EgFABP1-Rv (*Ver Apéndice 7.1.1*). Los resultados del secuenciado se encuentran en el *Apéndice 7.3.1*.





### 3.1.2. Purificación de EgFABP1

Una vez confirmada la secuencia del inserto *egfabp1* en el plásmido pET-11b, se procedió a transformar bacterias de la cepa *E. coli BL21(DE3)* con la construcción obtenida, empleando los protocolos descritos previamente. Una vez seleccionadas las bacterias transformadas, se procedió a realizar un ensayo de *screening* de expresión de proteínas siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.1.2.1 de la sección *Materiales y Métodos*. En dicho experimento se analizaron tanto cultivos bacterianos conteniendo el plásmido pET-11b-*egfabp1*, como cultivos de *E. coli BL21(DE3)* conteniendo el plásmido original pET-5a-*egfabp1*. En ambos casos, se comparó la expresión de proteínas antes y después de la inducción con 400 $\mu$ M IPTG mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida, o SDS-PAGE (Ver figura R-4).

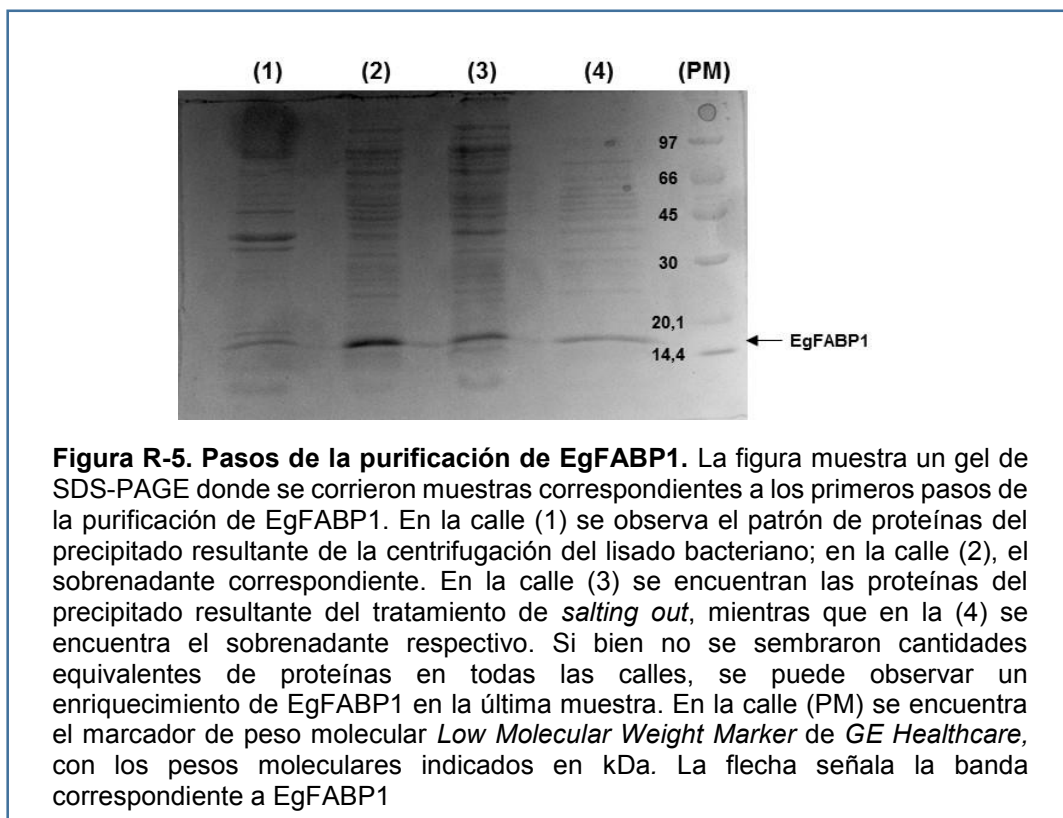


Tal como se puede apreciar en la *Figura R-4*, las bacterias *E. coli BL21(DE3)* transformadas con el plásmido pET-11b-*egfabp1* fueron capaces de expresar EgFABP1 luego de la inducción con IPTG. Al analizar los patrones de expresión proteica producidos por las bacterias empleadas en el ensayo, se puede observar que en aquellas que portan el plásmido pET-11b-*egfabp1* existen niveles menores de expresión de una proteína de alrededor de 30kDa, si se lo compara con los extractos provenientes de bacterias que llevan el plásmido pET-5a-

*egfabp1*. Dicha proteína, tal como se mencionó previamente, resultaba ser un contaminante difícil de remover en los ensayos previos de purificación de EgFABP1.

Una vez determinada la capacidad de las bacterias de producir la proteína EgFABP1 recombinante, se procedió con su expresión a mayor escala y con su purificación. A continuación se presentan, a modo de ejemplo, los pasos de una purificación de EgFABP1.

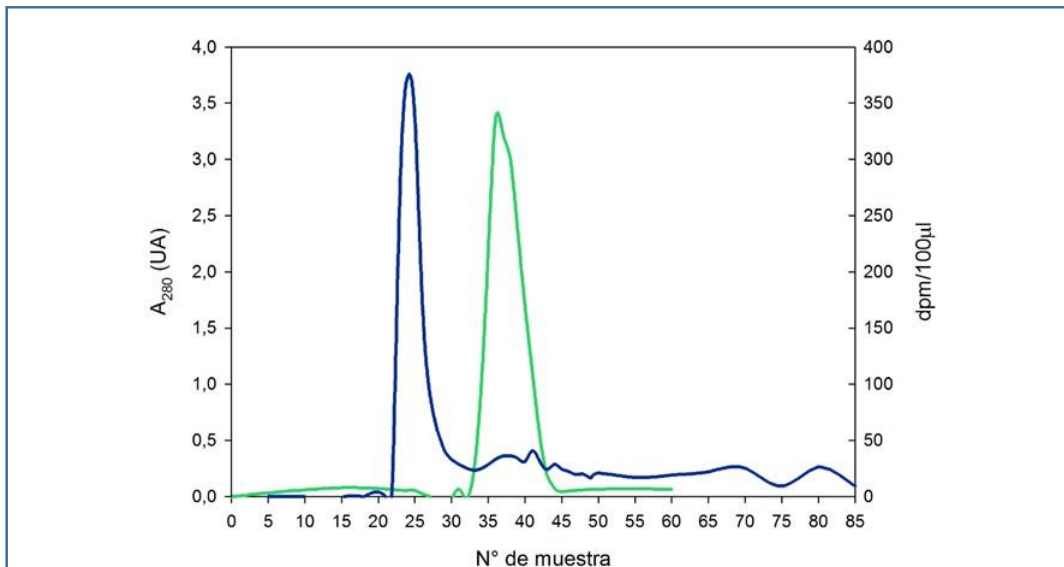
Luego del cultivo, inducción y lisado de las bacterias, se ultracentrifugaron las muestras y se conservó el sobrenadante. A dicha muestra se le realizó un proceso de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , o *Salting Out*, que permitió remover parte de las proteínas contaminantes (Ver *Figura R-5*).



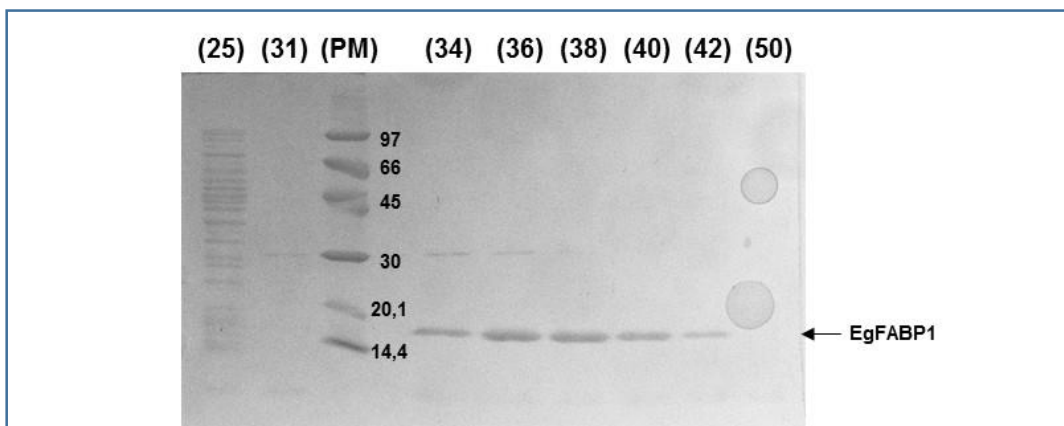
**Figura R-5. Pasos de la purificación de EgFABP1.** La figura muestra un gel de SDS-PAGE donde se corrieron muestras correspondientes a los primeros pasos de la purificación de EgFABP1. En la calle (1) se observa el patrón de proteínas del precipitado resultante de la centrifugación del lisado bacteriano; en la calle (2), el sobrenadante correspondiente. En la calle (3) se encuentran las proteínas del precipitado resultante del tratamiento de *salting out*, mientras que en la (4) se encuentra el sobrenadante respectivo. Si bien no se sembraron cantidades equivalentes de proteínas en todas las calles, se puede observar un enriquecimiento de EgFABP1 en la última muestra. En la calle (PM) se encuentra el marcador de peso molecular *Low Molecular Weight Marker* de *GE Healthcare*, con los pesos moleculares indicados en kDa. La flecha señala la banda correspondiente a EgFABP1

Seguidamente, se concentró la muestra, se incubó la mezcla de proteínas con ácido palmítico marcado con  $^{14}\text{C}$ , y se realizó una cromatografía de exclusión molecular. Las muestras eluidas de la columna de exclusión molecular se analizaron por medida de absorbancia a 280nm, medida de la radiactividad y por SDS-PAGE (Ver *Figuras R-6 y R-7*). Una vez identificados los tubos que contenían EgFABP1, se reunieron todas las muestras, se concentraron y se cambiaron de *buffer* para proceder a la deslipidización de la proteína (ver detalles en la sección *Materiales y Métodos*). La modificación del *buffer* empleado para la deslipidización, respecto al empleado en los protocolos tradicionales de purificación de las FABPs (Hsu & Storch, 1996) fue necesaria debido a que los mismos no resultaban satisfactorios para la remoción exhaustiva de los ácidos grasos que copurificaban unidos a

EgFABP1. Las nuevas condiciones de deslipidización se establecieron en base a datos bibliográficos que proponían la utilización de *buffers* de alta fuerza iónica durante los pasos de deslipidización de proteínas capaces de unir ligandos hidrofóbicos, con el objetivo de aumentar la interacción de los lípidos con las resinas hidrofóbicas empleadas para dichos fines (Velkov et al., 2008).



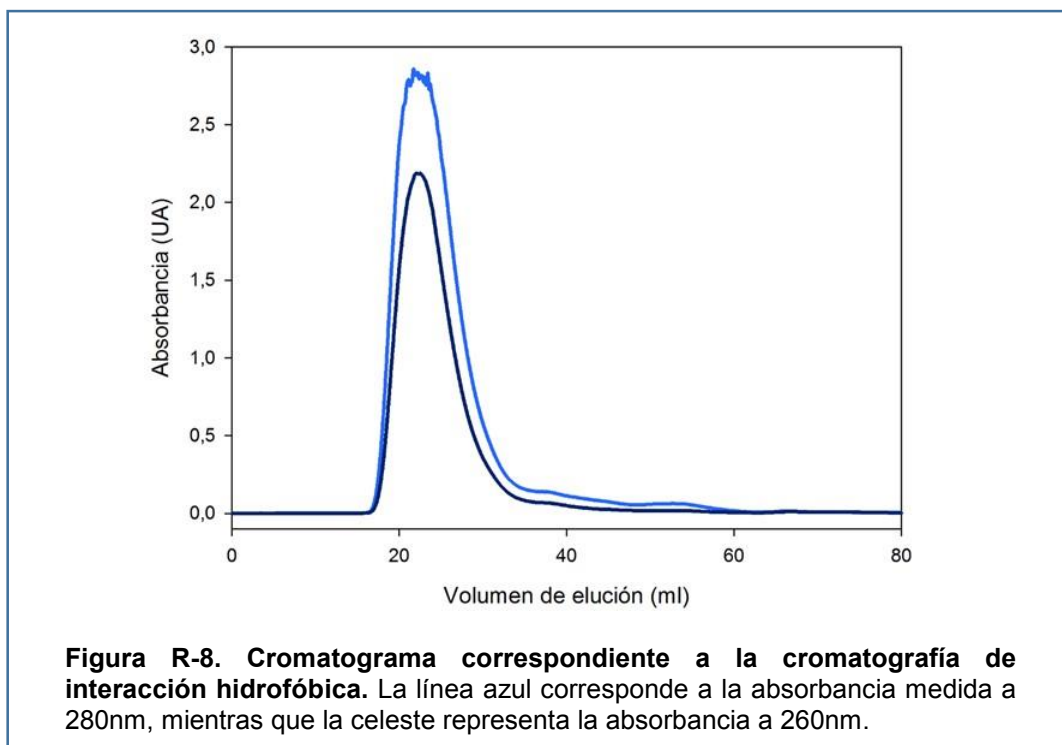
**Figura R-6. Cromatograma correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular.** La línea azul corresponde a la absorbancia medida a 280nm, mientras que la verde representa las dpm/100µl presentes en las muestras. La radioactividad correspondiente al [1-<sup>14</sup>C]-Palmitato se concentra en las muestras en las que eluye EgFABP1.



**Figura R-7. SDS-PAGE de las muestras colectadas de la cromatografía de exclusión molecular.** La figura muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie en donde se observan los perfiles de proteínas de las fracciones eluidas de la cromatografía de exclusión molecular. Los números que se encuentran por encima de las calles indican el número de tubo correspondiente a cada muestra. La flecha señala la banda correspondiente a EgFABP1.

Luego del cambio de *buffer*, se inyectó la muestra en una columna con resina *Lipidex 1000* termostaticada a 37°C y equilibrada en el mismo *buffer* con alta concentración de sales. La proteína eluyó como un único pico (*Figura R-8*) sin haber sido retenida en la columna.

Tal como se mencionó previamente, se tomaron muestras antes y después del tratamiento con *Lipidex 1000* para medirles la radiactividad.

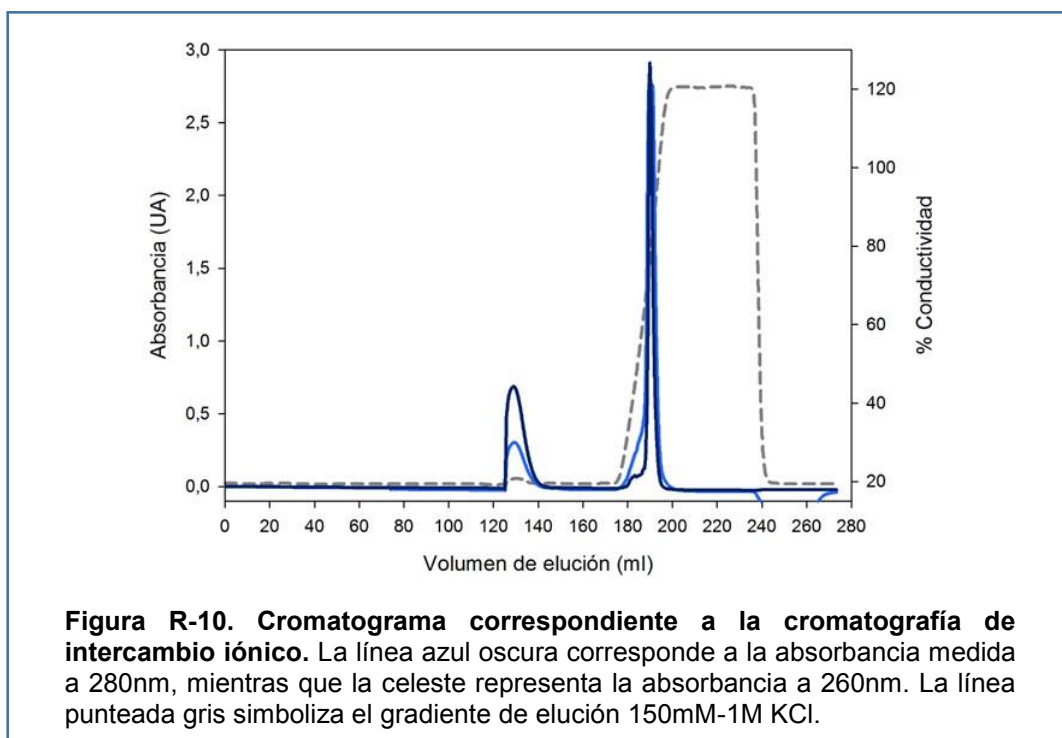
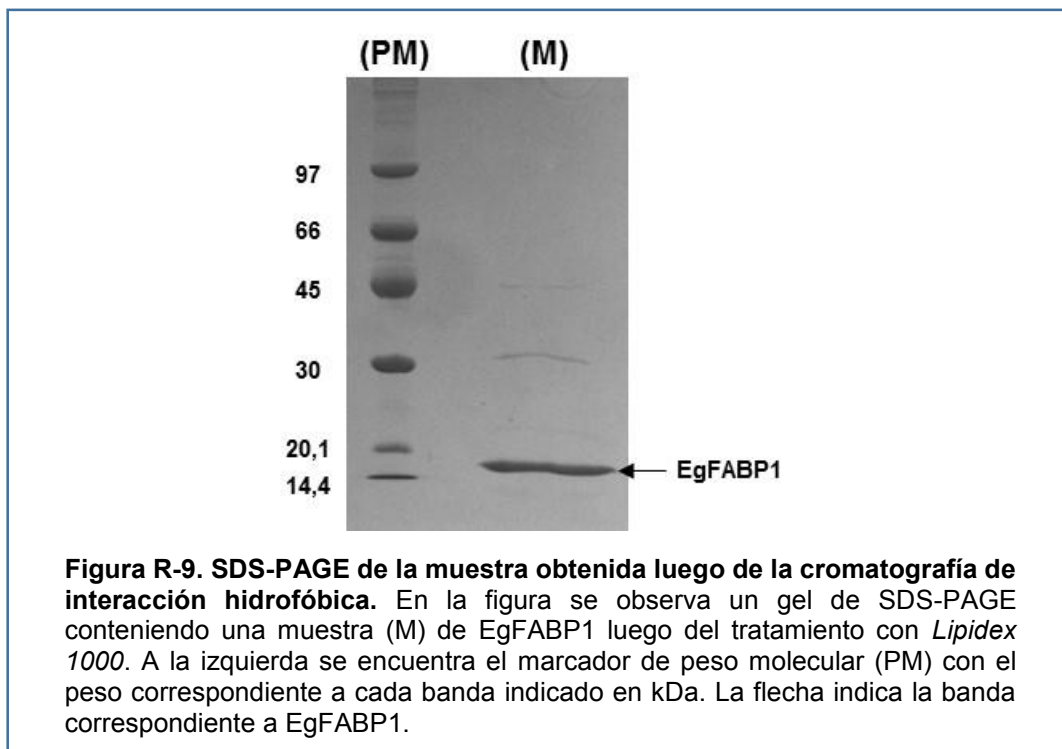


Dado que la contaminación con ácidos nucleicos imposibilitó la medición precisa de la concentración de EgFABP1 por absorbancia a 280nm, se asumió que toda la proteína que ingresó a la columna de interacción hidrofóbica fue la misma que se colectó luego de su pasaje por dicha resina. De este modo, luego de realizada la medida de radiactividad, se corrigieron las mismas por el valor obtenido para el blanco y se observó que la remoción de marca radiactiva había resultado eficiente (*Ver Tabla R-1*).

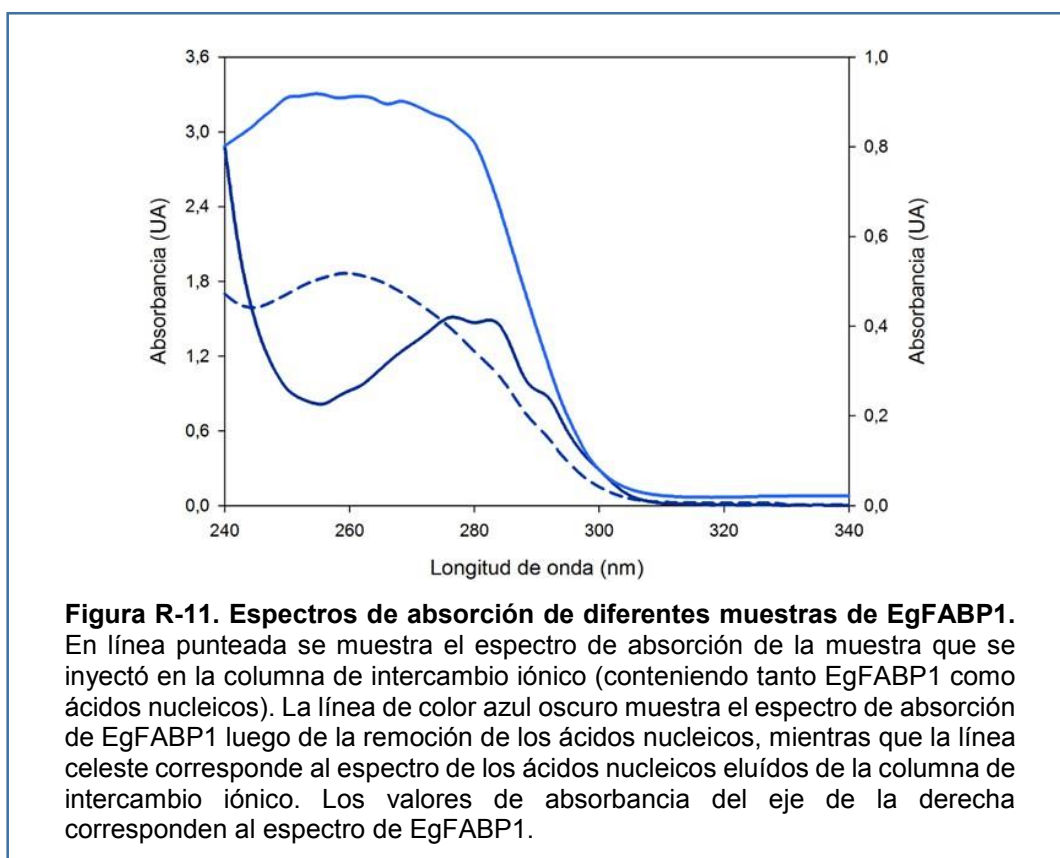
Muestra	Radiactividad total (dpm)
Antes del tratamiento con <i>Lipidex 1000</i>	241,11
Después del tratamiento con <i>Lipidex 1000</i>	0,44

**Tabla R-1. Deslipidización de EgFABP1.** La tabla muestra los valores obtenidos para la medida de radiactividad de las muestras antes y después del tratamiento con *Lipidex 1000*

Asimismo, una muestra de la proteína eluída de la columna de interacción hidrofóbica fue chequeada por SDS-PAGE. En la *Figura R-9* se puede observar el gel teñido con azul de *Coomassie* en donde la banda correspondiente a EgFABP1 es claramente la mayoritaria.



Debido a la presencia de ácidos nucleicos en la muestra de proteína, luego del proceso de deslipidización se concentró la proteína y se le cambió el *buffer*, para volverla al *buffer* original de menor fuerza iónica. Posteriormente, la proteína fue inyectada en una columna de intercambio aniónico (*MonoQ*) equilibrada en el mismo *buffer*. La resina había sido previamente lavada con el *buffer* de alta fuerza iónica. Dado que al pH de esa solución la proteína EgFABP1 tiene una carga ligeramente positiva, la misma no fue retenida por la resina. Sin embargo, los ácidos nucleicos contaminantes quedaron atrapados en la resina y fueron eluidos posteriormente aumentando la fuerza iónica del *buffer* de elución (Ver *Figura R-10*).



Las muestras conteniendo EgFABP1 obtenidas luego del pasaje por la columna de intercambio iónico fueron colectadas y concentradas empleando dispositivos tipo *Vivaspin*. Se tomaron espectros de absorción de la muestra que se tenía antes de la cromatografía de intercambio iónico, y de las fracciones de EgFABP1 y de ácidos nucleicos obtenidas luego. En la *Figura R-11* se puede observar claramente cómo cambia el espectro de absorción de la muestra luego del tratamiento. El espectro de absorción de la muestra de EgFABP1 libre de ácidos nucleicos presenta un espectro característico de una proteína, presentando un máximo a 280nm, con una caída de la absorbancia hacia los 260nm. Cabe mencionar que si bien las concentraciones de las diferentes muestras no son comparables, lo más destacable es la

variación a nivel cualitativo de los espectros. La proteína obtenida de este modo, fue alicuotada en microtubos y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

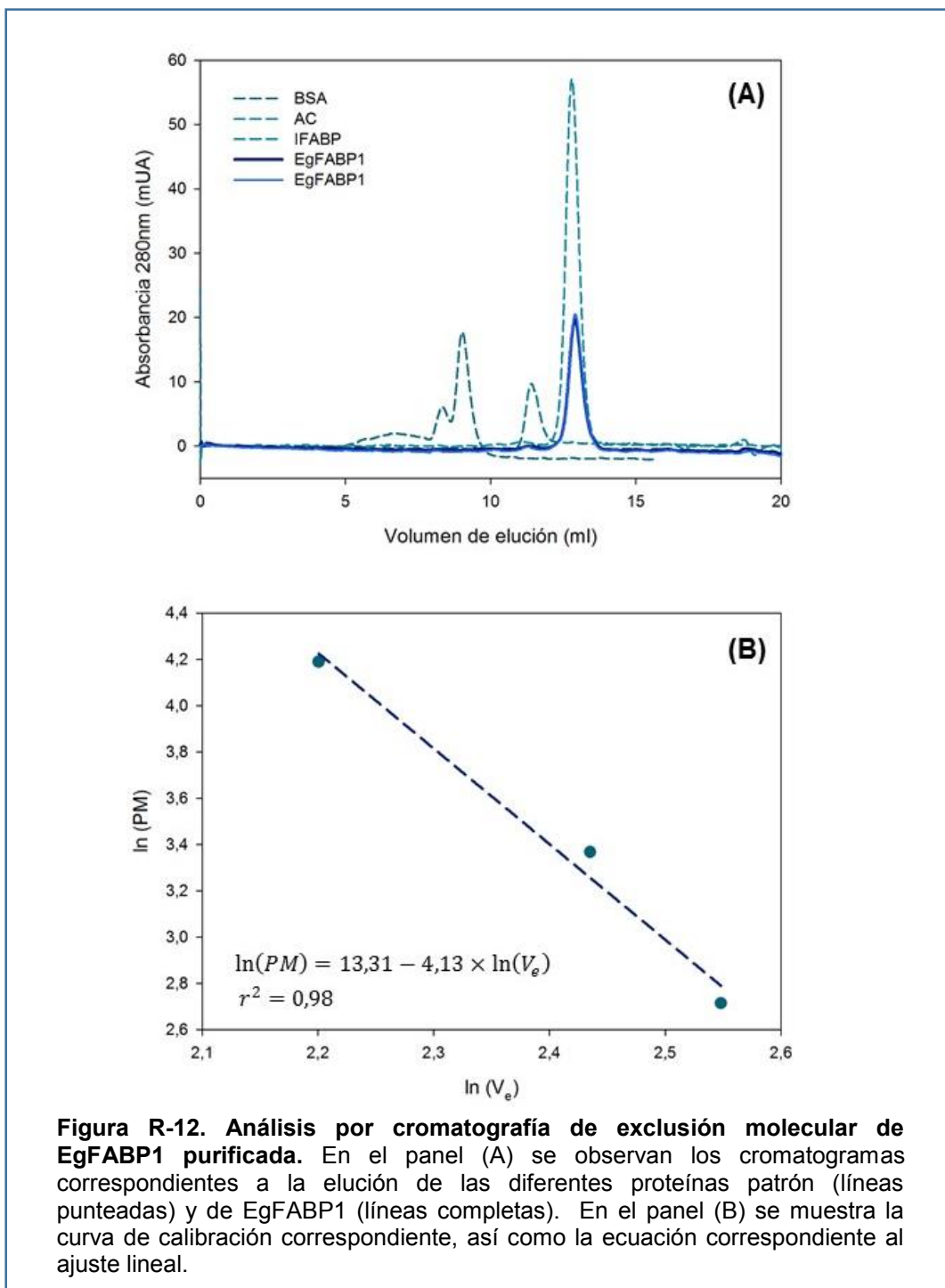
### 3.1.3. Control de la integridad estructural de EgFABP1

Una vez establecido el protocolo de purificación de EgFABP1, se realizaron una serie de pruebas con la finalidad de determinar el estado de agregación y el plegamiento de la proteína.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis por cromatografía de exclusión molecular, para lo cual se utilizaron tres proteínas de peso molecular conocido como estándares: BSA, cuyo peso molecular es de 66kDa; anhidrasa carbónica (AC), de 29kDa; e I-FABP, de 15,1kDa. Se realizaron dos inyecciones de EgFABP1. En ambos casos EgFABP1 eluyó como un único pico en el mismo volumen de elución, el cual prácticamente coincidió con el de IFABP. El peso molecular aparente calculado para EgFABP1 fue de 15,6kDa, lo cual es concordante con su peso molecular teórico de 15kDa; indicando, por lo tanto, que la proteína se encontraba en forma monomérica (*Ver Figura R-12*).

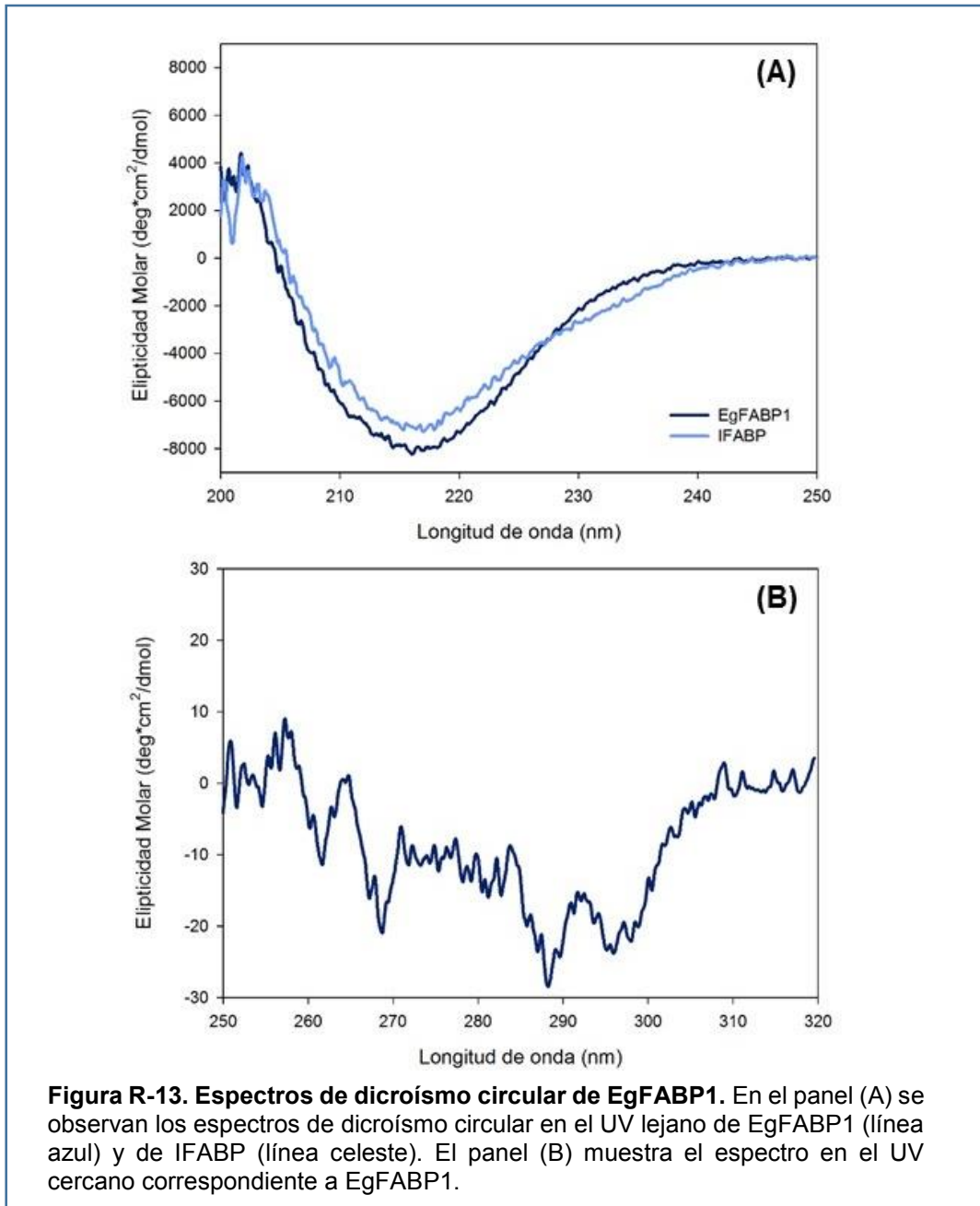
Por otra parte, se realizaron también medidas de dicroísmo circular para analizar el plegamiento de la proteína purificada. Esta técnica es capaz de brindar información sobre el contenido global de estructura secundaria de las proteínas, cuando se analizan sus espectros en el UV lejano; así como sobre la estructura terciaria de las mismas, cuando se analizan los espectros en el UV cercano (Córsico et al., 2013). Para EgFABP1 se realizaron medidas tanto en el UV lejano como en el UV cercano (*Ver detalles en la sección Materiales y métodos, ítem 2.1.3.2*), empleando la proteína I-FABP (purificada en nuestro laboratorio) como control para el caso de los espectros en el UV lejano. I-FABP es, al igual que EgFABP1, una proteína formada por un barril  $\beta$  coronado por dos hélices  $\alpha$ . Tal como se puede observar en el *Panel A* de la *Figura R-13*, el espectro de dicroísmo circular de EgFABP1 en el UV lejano presentó una importante similitud con el espectro de I-FABP, destacándose un único mínimo alrededor de los 215nm, lo cual es característico de proteínas con un alto contenido de hoja  $\beta$  (Córsico et al., 2013).

Por su parte, el espectro de dicroísmo circular de EgFABP1 en el UV cercano (*Figura R-13, Panel B*) presentó picos bien definidos, lo cual es indicativo de que la proteína poseía una estructura terciaria definida.



**Figura R-12. Análisis por cromatografía de exclusión molecular de EgFABP1 purificada.** En el panel (A) se observan los cromatogramas correspondientes a la elución de las diferentes proteínas patrón (líneas punteadas) y de EgFABP1 (líneas completas). En el panel (B) se muestra la curva de calibración correspondiente, así como la ecuación correspondiente al ajuste lineal.



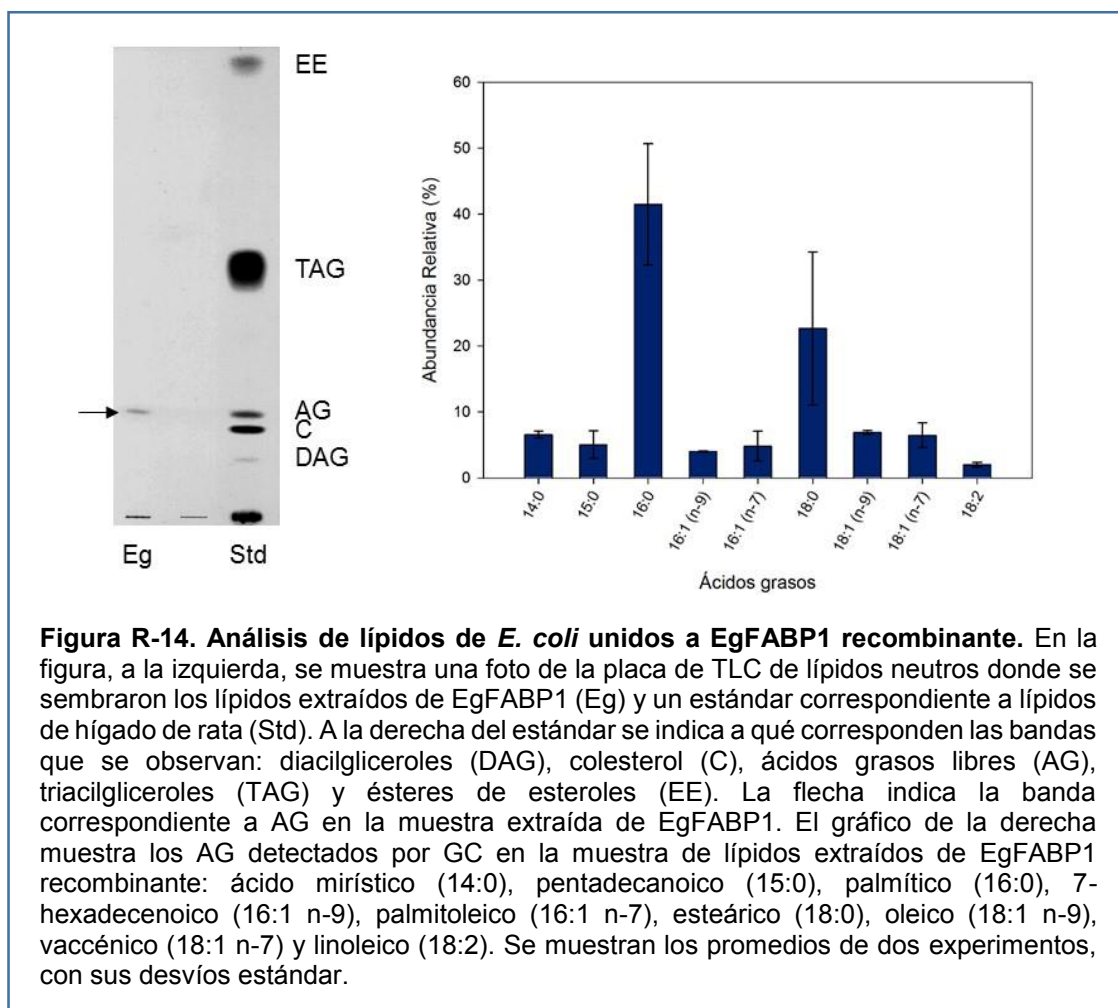


### 3.2. Análisis de la interacción de EgFABP1 con ligandos

#### 3.2.1. Análisis de lípidos de *Escherichia coli* unidos a EgFABP1 recombinante

Uno de los enfoques encarados en el estudio de la interacción de EgFABP1 con ligandos consistió en analizar cuáles eran los lípidos que copurificaban unidos a EgFABP1 cuando dicha proteína era purificada a partir de *E. coli*. Si bien el citoplasma de *E. coli* no es el entorno natural de la proteína, este enfoque podría contribuir a determinar qué tipo de compuestos

une preferentemente EgFABP1 dentro de una gama compleja de compuestos hidrofóbicos presentes en el citoplasma bacteriano. Para ello, se sobre-expresó EgFABP1 en *E. coli* y se purificó la proteína tal como se describió previamente, pero sin el paso de deslipidización. Posteriormente, se extrajeron los lípidos con solventes orgánicos y se analizó una muestra de lo extraído por TLC (Ver ítem 2.2.1 de la sección *Materiales y métodos*). Se observó que la muestra contenía únicamente ácidos grasos libres (Ver Figura R-14). Seguidamente, se identificaron dichos ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa (Ver *Materiales y Métodos*).



Tal como se observa en la *Figura R-14* (panel de la derecha), EgFABP1 es capaz de unir una variedad más o menos amplia de ácidos grasos presentes en el citoplasma de *E. coli*, siendo los mayoritarios el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0), aunque también se detectan otros ácidos grasos de diferente longitud de cadena y grado de insaturación. Cabe aclarar que el ácido linoleico (18:2) detectado debe provenir del medio de cultivo, ya que *E. coli* es incapaz de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (Cronan & Rock, 1994; Lowe et al., 1987). No es sorprendente que el ácido palmítico sea el principal ácido graso unido a EgFABP1 recombinante, ya que ha sido reportado como el posible ligando determinado en la

estructura cristalográfica de esta proteína (Jakobsson et al., 2003). Asimismo, varios de los ligandos detectados por esta metodología han sido propuestos como ligandos de EgFABP1 en estudios previos de unión *in vitro* (Alvite et al., 2001).

### 3.2.2. Análisis de la interacción con ligandos por proteólisis parcial de EgFABP1

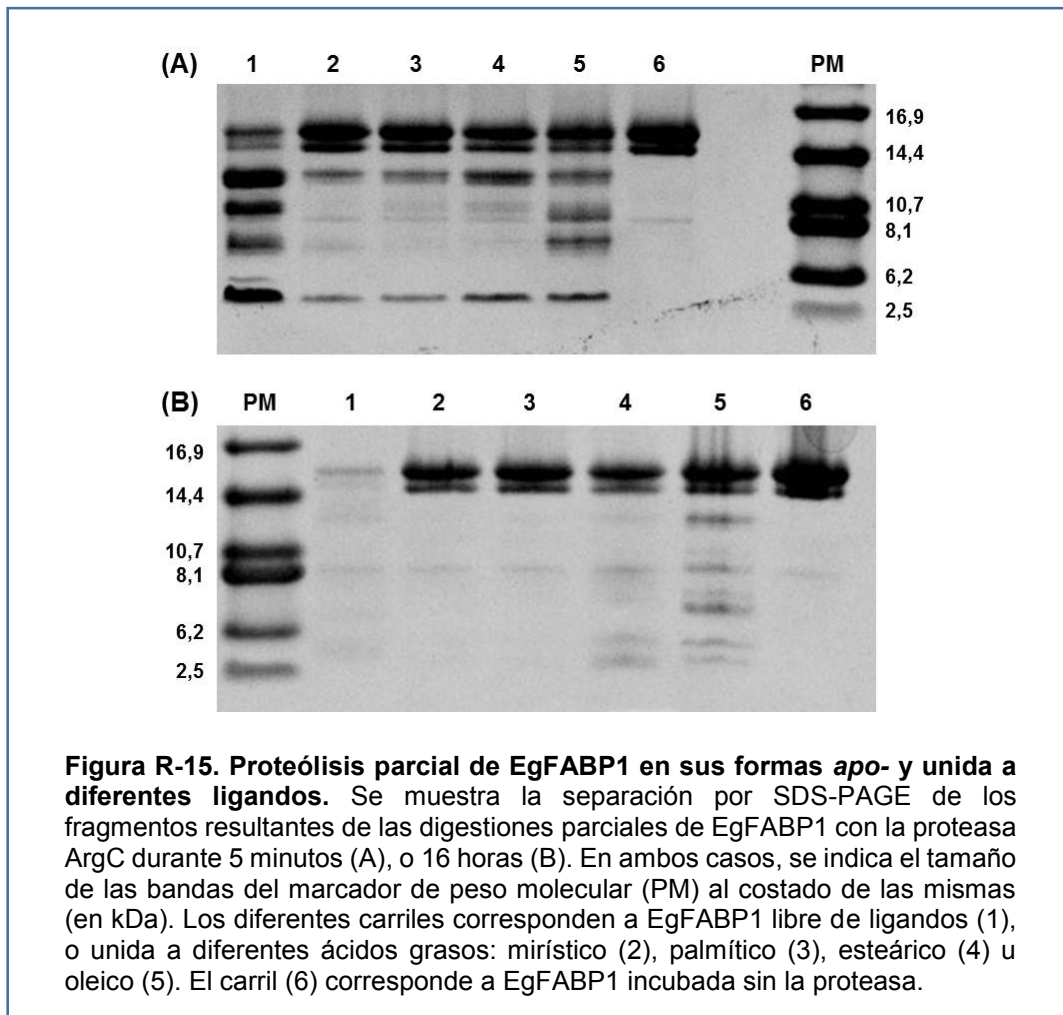
Con la finalidad de analizar la interacción de EgFABP1 con ácidos grasos desde otro punto de vista, se realizaron experimentos de proteólisis parcial de la proteína en su forma *apo*- y complejada con diferentes ligandos. Esta técnica brinda información en relación a cambios conformacionales producidos en proteínas ya que permite detectar regiones con alta flexibilidad, sitios más o menos expuestos a las proteasas, y cómo éstos se alteran al interactuar la proteína con un ligando (Arighi et al., 2003; Fontana et al., 2004; Hubbard, 1998).

Para llevar a cabo este análisis, se incubó la proteína EgFABP1 recombinante, en su forma libre de ligandos (*apo*) o unida a diferentes ácidos grasos, con la enzima proteolítica ArgC (también llamada Clostripaína), que es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos en los que esté involucrado el grupo carboxilo de residuos de Arginina. Las digestiones se llevaron a cabo a diferentes tiempos, y los productos resultantes se separaron por SDS-PAGE en geles de tricina (*Para más detalles, ver ítem 2.2.2 de la sección Materiales y Métodos*).

Tal como se observa en la *Figura R-15*, la unión de ligandos a EgFABP1 le brinda a la proteína una cierta “protección” frente al ataque proteolítico por ArgC. En el *panel A* de la *Figura R-15* se puede observar claramente que al incubar a EgFABP1 en su forma *apo* con ArgC durante 5 minutos se obtienen numerosos, y diversos, fragmentos proteolíticos; mientras que la EgFABP1 complejada con diversos ácidos grasos sufre una proteólisis mucho menor, siendo mayoritaria la banda correspondiente a la proteína entera. Asimismo, es posible notar que el complejo EgFABP1-ácido oleico genera un patrón de digestión ligeramente diferente a los demás (al menos en cuanto a la proporción relativa de los fragmentos generados). En el *panel B*, por su parte, se observa que EgFABP1 en su forma *apo*, es digerida casi por completo luego de 16 horas de incubación con la endoproteasa ArgC. Por otro lado, las muestras de EgFABP1 en presencia de ligandos mostraron una resistencia importante a la degradación, manteniendo una buena proporción de proteína sin digerir aún luego de 16 horas de incubación con la proteasa. La digestión de EgFABP1 unida a ácido oleico muestra la presencia de fragmentos diferentes a los presentes en los demás complejos proteína-ligando.

Esto puede ser interpretado de diferentes maneras: por un lado, se puede pensar que la unión de ácido oleico a EgFABP1 induciría cambios conformacionales sobre la proteína que generarían una mayor exposición de los sitios blancos de la acción de la proteasa (residuos de arginina en el caso de ArgC) y por ende, se cortaría un mayor número de enlaces que en los otros casos. Otra posible interpretación radica en el hecho de que EgFABP1 podría adoptar

una estructura menos rígida en presencia de ácido oleico, comparada a sus formas unidas a otros ácidos grasos, haciendo que determinadas regiones posean mayor movilidad y por lo tanto, puedan ser atacadas por la proteasa.

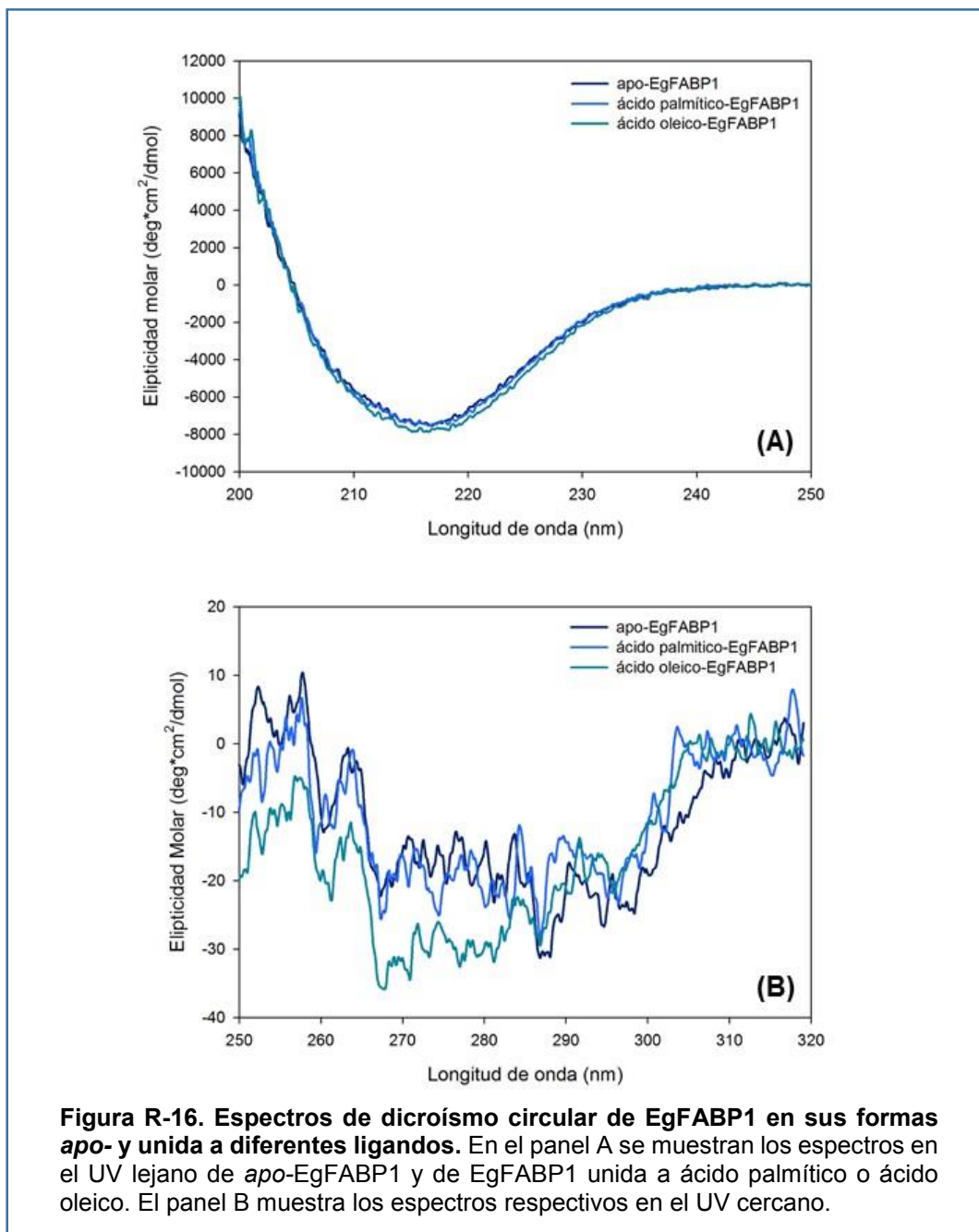


De un modo o de otro, resulta claro que la unión de diferentes ligandos es capaz de inducir cambios en la proteína que son dependientes del compuesto unido a la misma. Esto podría tener implicancias funcionales, tal como se ha descrito para otros miembros de la familia de las FABPs (Armstrong et al., 2014; Gillilan et al., 2007; Storch & McDermott, 2009), aunque se requerirían mayores investigaciones para poder concluir algo al respecto.

### 3.2.3. Análisis por dicroísmo circular de la interacción de EgFABP1 con ácidos grasos

Tal como se mencionó en el *ítem 3.1.3* de la sección *Resultados*, el dicroísmo circular es una técnica que permite analizar tanto la estructura secundaria como terciaria de las proteínas. Por este motivo, se la utilizó para evaluar si, efectivamente, era posible detectar cambios

conformacionales en EgFABP1 cuando la misma se encuentra unida a diferentes ligandos. Para ello, se incubó EgFABP1 con ácido palmítico u oleico, y se midieron los espectros tanto en el UV lejano como en el UV cercano para ambas formas de *holo*-EgFABP1, así como para *apo*-EgFABP1 (Ver detalles en el ítem 2.2.3 de la sección *Materiales y Métodos*).



**Figura R-16. Espectros de dicroísmo circular de EgFABP1 en sus formas *apo*- y unida a diferentes ligandos.** En el panel A se muestran los espectros en el UV lejano de *apo*-EgFABP1 y de EgFABP1 unida a ácido palmítico o ácido oleico. El panel B muestra los espectros respectivos en el UV cercano.

En la *Figura R-16* se puede observar que los espectros en el UV lejano correspondientes a EgFABP1 en su forma *apo* o unida a ácidos grasos no presenta diferencias. Esto puede ser interpretado como un indicio de que la unión de ligandos no genera una alteración apreciable a nivel de la estructura secundaria global de la proteína. Por su parte, en la región del UV

cercano, sí se observan diferencias en el espectro de EgFABP1, en especial en el caso de la proteína unida a ácido oleico.

Esto indicaría que la unión con ácidos grasos altera de algún modo el entorno de los aminoácidos aromáticos de la proteína, ya sea por cercanía con el ligando, o por cambios conformacionales inducidos sobre la estructura terciaria de EgFABP1.

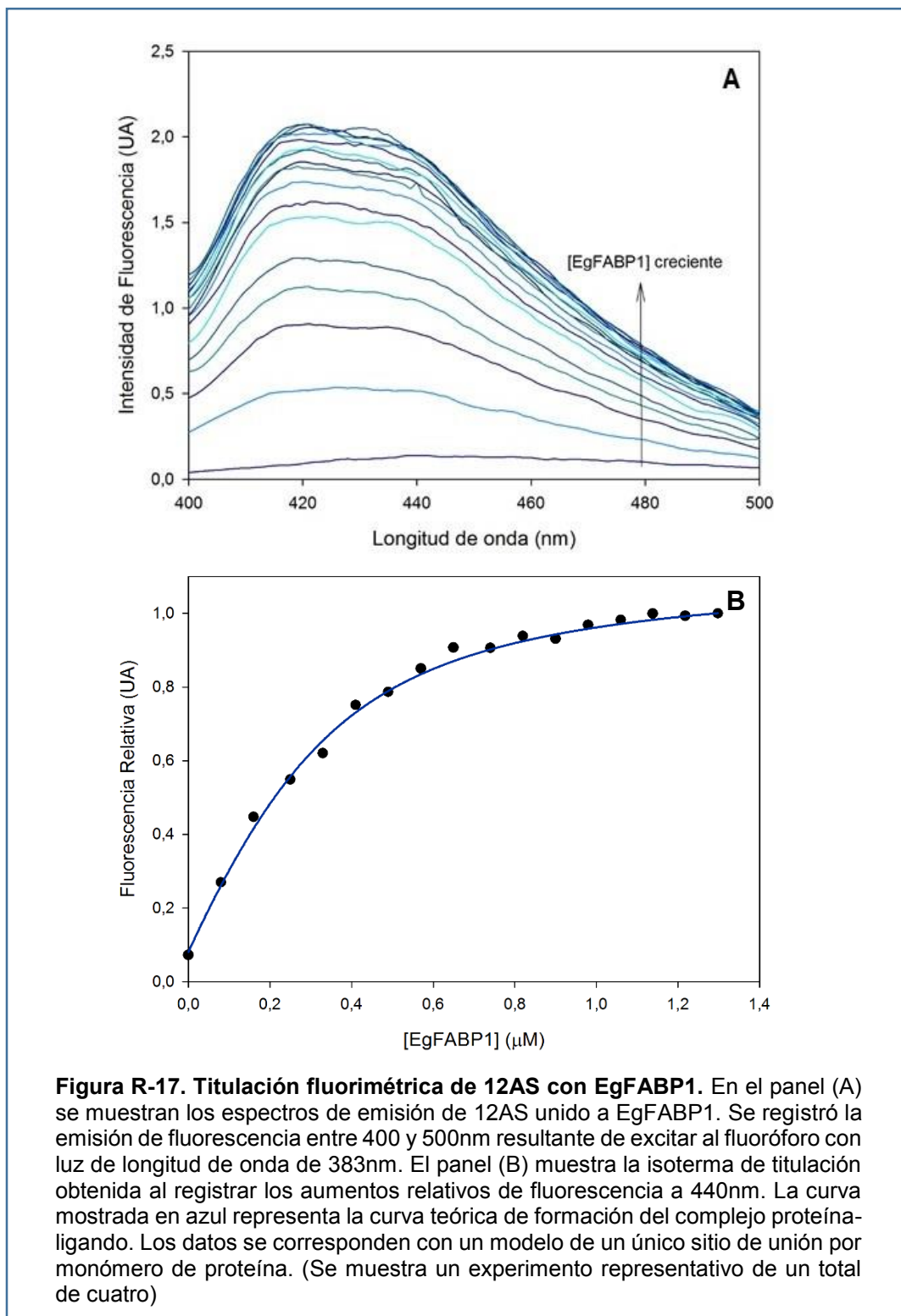
### **3.2.4. Análisis de la interacción de EgFABP1 con análogos fluorescentes de ácidos grasos**

Una alternativa adicional al estudio de la interacción de EgFABP1 con ligandos se llevó a cabo empleando derivados fluorescentes de ácidos grasos. Para ello, se emplearon antroiloxi-derivados de ácidos grasos, los cuales han sido muy utilizados para analizar las características de los sitios de unión de proteínas como las FABPs, debido a que sus propiedades espectrales son muy sensibles al entorno. Normalmente, estos compuestos tienen una intensidad de fluorescencia muy baja cuando se encuentran libres, en solución acuosa, y la misma aumenta notablemente cuando se une a una FABP (Storch et al., 1989). Por otra parte, como estos ligandos son también empleados para caracterizar las propiedades de transferencia de ácidos grasos desde proteínas a membranas fosfolípicas, la determinación de la constante de disociación proteína-ligando, es un dato necesario para establecer las condiciones del experimento de transferencia, como se discutirá más adelante. Los antroiloxi-ácidos grasos utilizados fueron 16AP y 12AS, análogos de los ácidos palmítico y esteárico.

Tal como se puede ver en la *Figura R-17*, la unión de 12AS a EgFABP1 estuvo acompañada de un marcado aumento de la fluorescencia, acompañado de un corrimiento hacia el azul. Un desplazamiento del máximo de emisión a longitudes de onda más cortas (corrimiento al azul) indica que el fluoróforo se sitúa en un ambiente apolar, como puede ser, en este caso, el sitio de unión de EgFABP1.

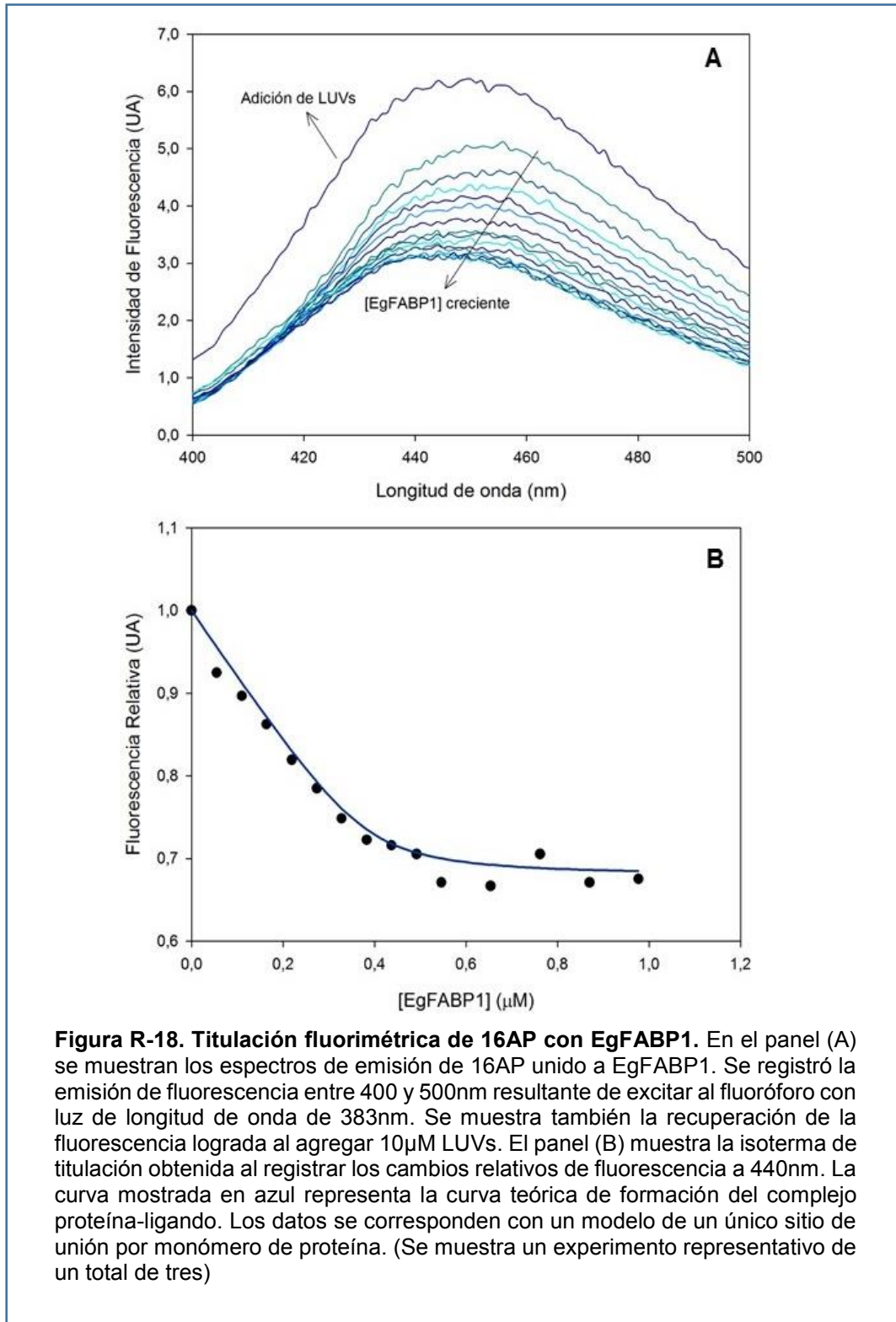
En el caso de 16AP (*Figura R-18*), se observó una llamativa caída de la fluorescencia que, sin embargo, estuvo acompañada de un corrimiento hacia el azul, lo que sugiere que el ligando se estaría uniendo al bolsillo hidrofóbico de EgFABP1, pero que a su vez podría estar sufriendo algún tipo de supresión de la fluorescencia (o *quenching*) por parte de algún residuo aminoacídico de la proteína. Para evaluar esta hipótesis, se agregaron 10 $\mu$ M LUVs de fosfatidilcolina a la cubeta donde se había llevado a cabo la titulación y se observó un marcado aumento de la fluorescencia. Esto indicó que la supresión de la fluorescencia del 16AP podía revertirse al pasar la sonda desde el sitio de unión de la proteína al ambiente hidrofóbico de las membranas fosfolípicas de las LUVs. En ambos casos, 12AS y 16AP, las curvas

obtenidas de la titulación de los ligandos con EgFABP1 alcanzaron la saturación, de acuerdo con modelos de unión proteína-ligando con estequiometría 1:1 (Ver ecuación del ajuste en la



sección Materiales y métodos, ítem 2.2.4). La  $K_D$  obtenida para el 12AS fue de  $0,12 \pm 0,02 \mu\text{M}$ , y para el 16AP,  $0,013 \pm 0,006 \mu\text{M}$ . Estos valores son del orden de los valores de  $K_D$  determinados para otras FABPs y otros antroiloxi-derivados de ácidos grasos. Por ejemplo,

se han reportado  $K_D$  de 0,2 y 0,6 $\mu$ M para la unión de 12AO (ácido 12-(9-antroiloxi)-oleico) a L-FABP e I-FABP de rata, respectivamente (Hsu & Storch, 1996) y de 0,11 $\mu$ M para la unión de 2AP (ácido 2-(9-antroiloxi)-palmítico) a Sj-FABPc, una FABP de *Schistosoma japonicum* (McDermott et al., 2002).



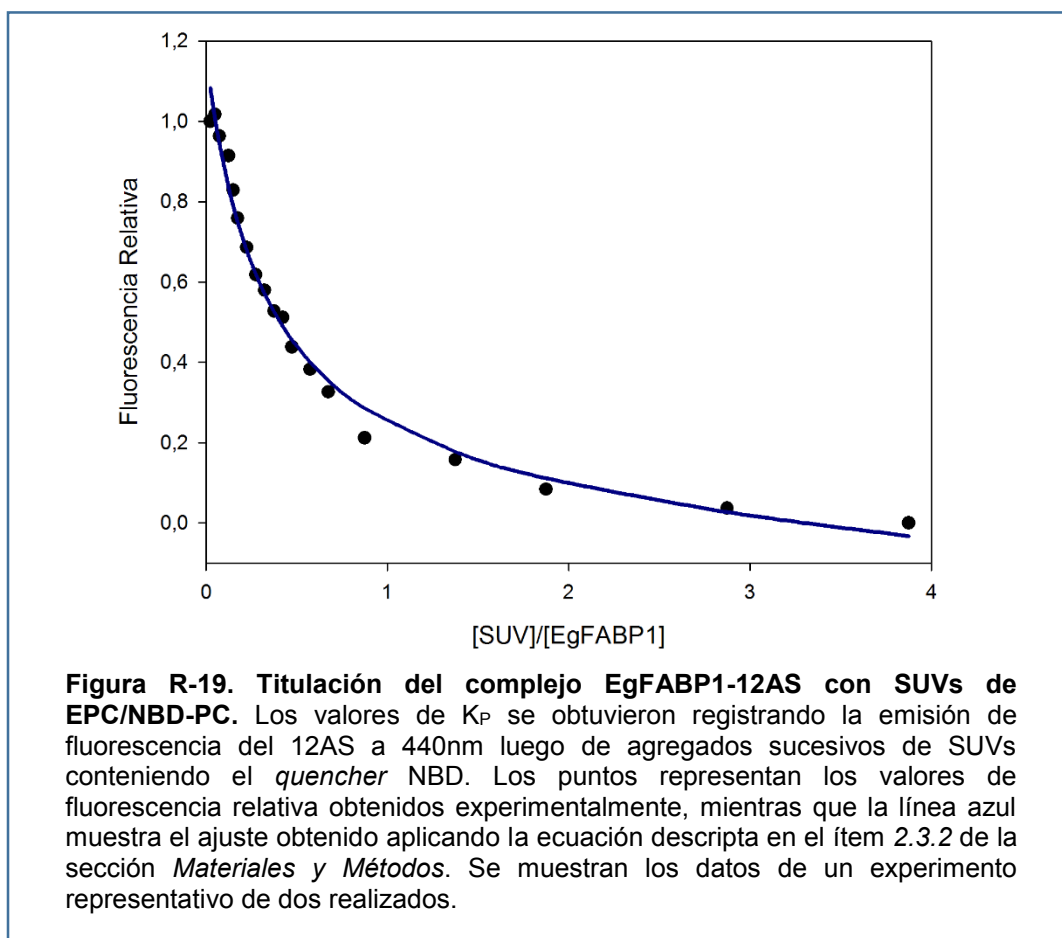


A pesar de que EgFABP1 presentó una mayor afinidad por el 16AP, para los estudios de transferencia de ligandos a vesículas fosfolipídicas artificiales se seleccionó el 12AS, ya que sus características de emisión de fluorescencia al unirse a EgFABP1 resultaron ser más similares a lo observado en estudios previos de transferencia de ligandos entre FABPs y vesículas (De Gerónimo et al., 2010; Falomir-Lockhart et al., 2006; Franchini et al., 2008).

### 3.3. Análisis de la interacción de EgFABP1 con membranas

#### 3.3.1. Determinación del coeficiente de partición ( $K_P$ ) de 12AS entre EgFABP1 y SUVs

El coeficiente de partición da una medida de la distribución relativa de un ligando (el ácido graso) entre dos fases (proteína y membrana fosfolipídica). Esta medida sirve, además, para ajustar las condiciones de los experimentos de transferencia de ligandos, ya que para ellos es necesario asegurar una transferencia unidireccional del ligando desde la proteína a las membranas.



Para determinar el valor de  $K_p$  se realizaron titulaciones del complejo EgFABP1-12AS con SUVs de EPC/NBD-PC (Ver Figura R-19). Como resultado, se obtuvo un valor de  $K_p = 0,48 \pm 0,23$ ; lo que indica una leve preferencia del ligando 12AS por las vesículas fosfolipídicas.

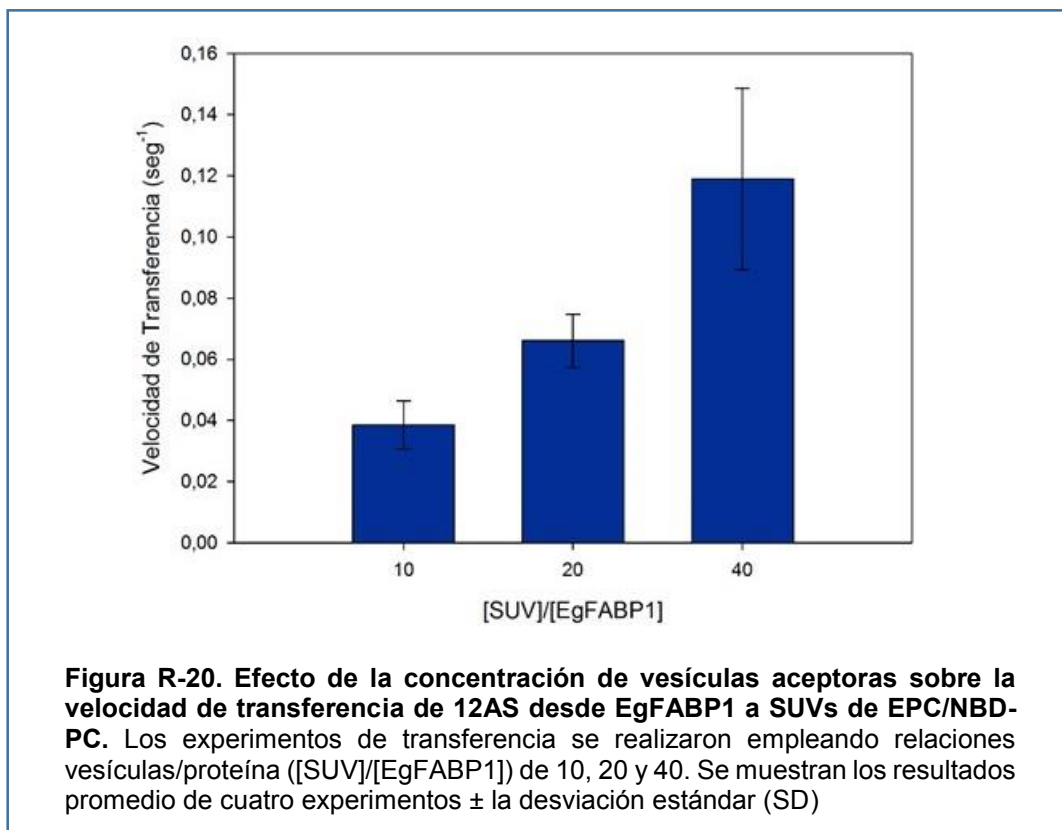
### **3.3.2. Transferencia de análogos fluorescentes de ácidos grasos desde EgFABP1 hacia vesículas unilamelares pequeñas.**

Uno de los enfoques mediante los cuales se exploró la capacidad de EgFABP1 de interactuar con membranas consistió en determinar el mecanismo de transferencia de ácidos grasos fluorescentes hacia membranas fosfolipídicas artificiales. Como se mencionó anteriormente, estos ensayos han permitido clasificar a las FABPs en dos grupos, de acuerdo al mecanismo empleado para transferir ácidos grasos. Por un lado se encuentran las FABPs de tipo “colisional”, en las que la transferencia del ligando a las membranas implica una interacción directa proteína-membrana, siendo dicha interacción el paso limitante de la velocidad. El otro grupo lo constituyen las FABPs de tipo “difusional”, en las que la transferencia de ligandos a membranas es independiente del contacto proteína-membrana, y el paso limitante de la velocidad de transferencia está dado por la disociación del complejo proteína-ligando (Hsu & Storch, 1996; Schroeder et al., 1998; Storch & Córscico, 2008; Storch & McDermott, 2009). Se ha sugerido que las FABPs cuyo mecanismo de transferencia de ligandos es de tipo difusional constituirían un reservorio citosólico de ácidos grasos (u otros ligandos), o bien podrían estar involucradas en el transporte de ligandos a otras proteínas; mientras que las que poseen un mecanismo colisional podrían estar implicadas en interacciones con dominios lipídicos o proteicos de membrana (Storch & Córscico, 2008). Cabe destacar que varios de los motivos estructurales propuestos como responsables de determinar el mecanismo por el cual las FABPs transfieren sus ligandos a vesículas artificiales han sido también propuestos como motivos determinantes de algunas de las funciones atribuidas a estas proteínas (Storch & McDermott, 2009).

Como se mencionó en el ítem 2.3.3 de la sección *Materiales y métodos*, estos experimentos consisten en el monitoreo de la fluorescencia de un análogo de ácido graso en función del tiempo cuando se mezclan (empleando un dispositivo de mezclado rápido) un complejo de EgFABP1 y ligando fluorescente con vesículas fosfolipídicas artificiales conteniendo un supresor (o *quencher*) de la fluorescencia de dicho ligando. Realizando dichas medidas para diferentes concentraciones o composiciones de las vesículas es posible determinar el mecanismo de transferencia de ligandos de la proteína.

La Figura R-20 muestra que cuando una cantidad fija del complejo EgFABP1-12AS se mezcla con concentraciones crecientes de SUVs zwitteriónicas, la velocidad de transferencia del ligando fluorescente aumenta proporcionalmente yendo desde  $0,04 \pm 0,01 \text{ seg}^{-1}$  hasta  $0,12$

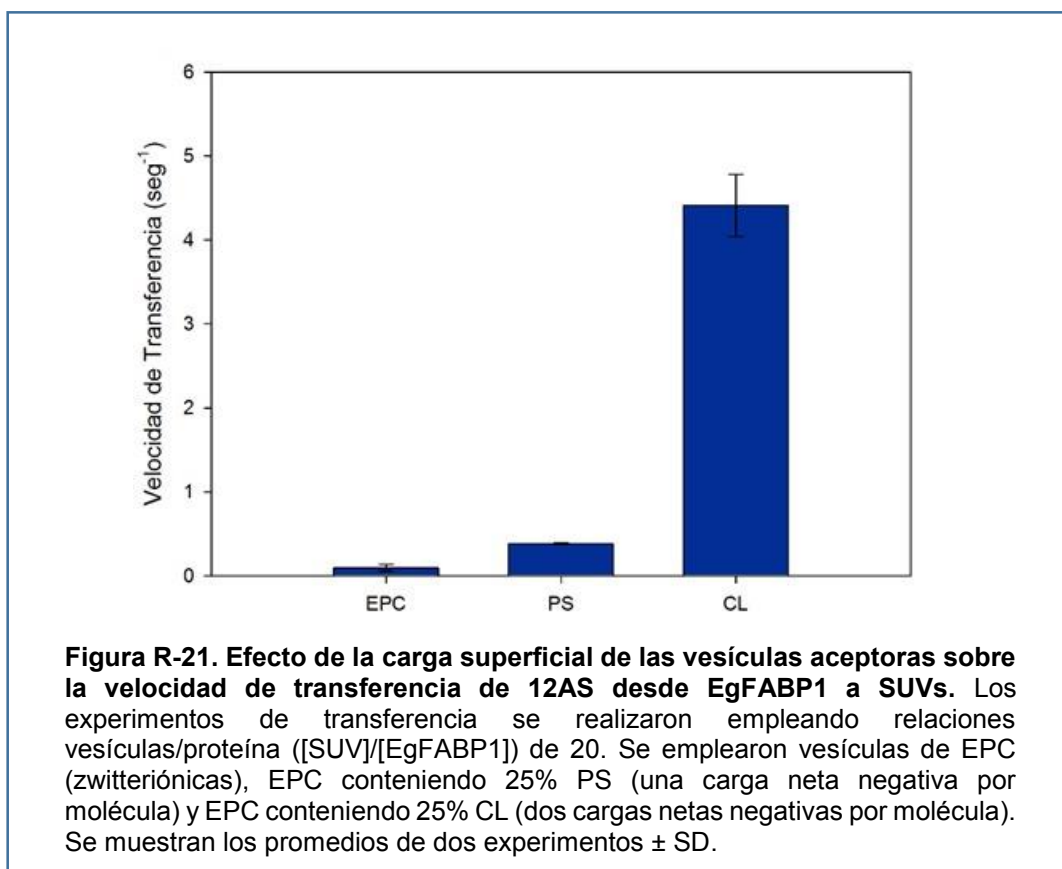
$\pm 0,03 \text{ seg}^{-1}$ . Este resultado da indicios de que el mecanismo responsable de la transferencia de ligandos desde EgFABP1 a vesículas fosfolipídicas sería un mecanismo dependiente de la colisión entre la proteína y la membrana, ya que la velocidad de transferencia del ligando aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración de vesículas aceptoras, lo que se corresponde con un mecanismo de tipo colisional.



Por otro lado, si se tratara, efectivamente, de un mecanismo de transferencia dependiente de la interacción proteína-membrana, un cambio en la composición de las vesículas fosfolipídicas debería modificar la velocidad de transferencia del ligando fluorescente. Si fuera, en cambio, un mecanismo de tipo difusional, la velocidad de transferencia no debería verse modificada por un cambio en la composición de las membranas fosfolipídicas, ya que el paso limitante de la velocidad (la disociación del complejo proteína/ligando) es un evento temporal y espacialmente independiente del contacto con la membrana. Para evaluar el efecto de la composición de las SUVs sobre la velocidad de transferencia del 12AS desde EgFABP1 a las vesículas fosfolipídicas, se realizó un ensayo similar al anterior, pero empleando vesículas fosfolipídicas con carga neta diferente. Se utilizaron vesículas zwitteriónicas de EPC, vesículas con 25% de PS, que contiene una carga neta negativa por molécula, y vesículas con 25% de CL, que posee dos cargas netas negativas por molécula (*Ver detalles en los ítems 2.3.1 y 2.3.3 de la sección Materiales y métodos*). La *Figura R-21* muestra los resultados de

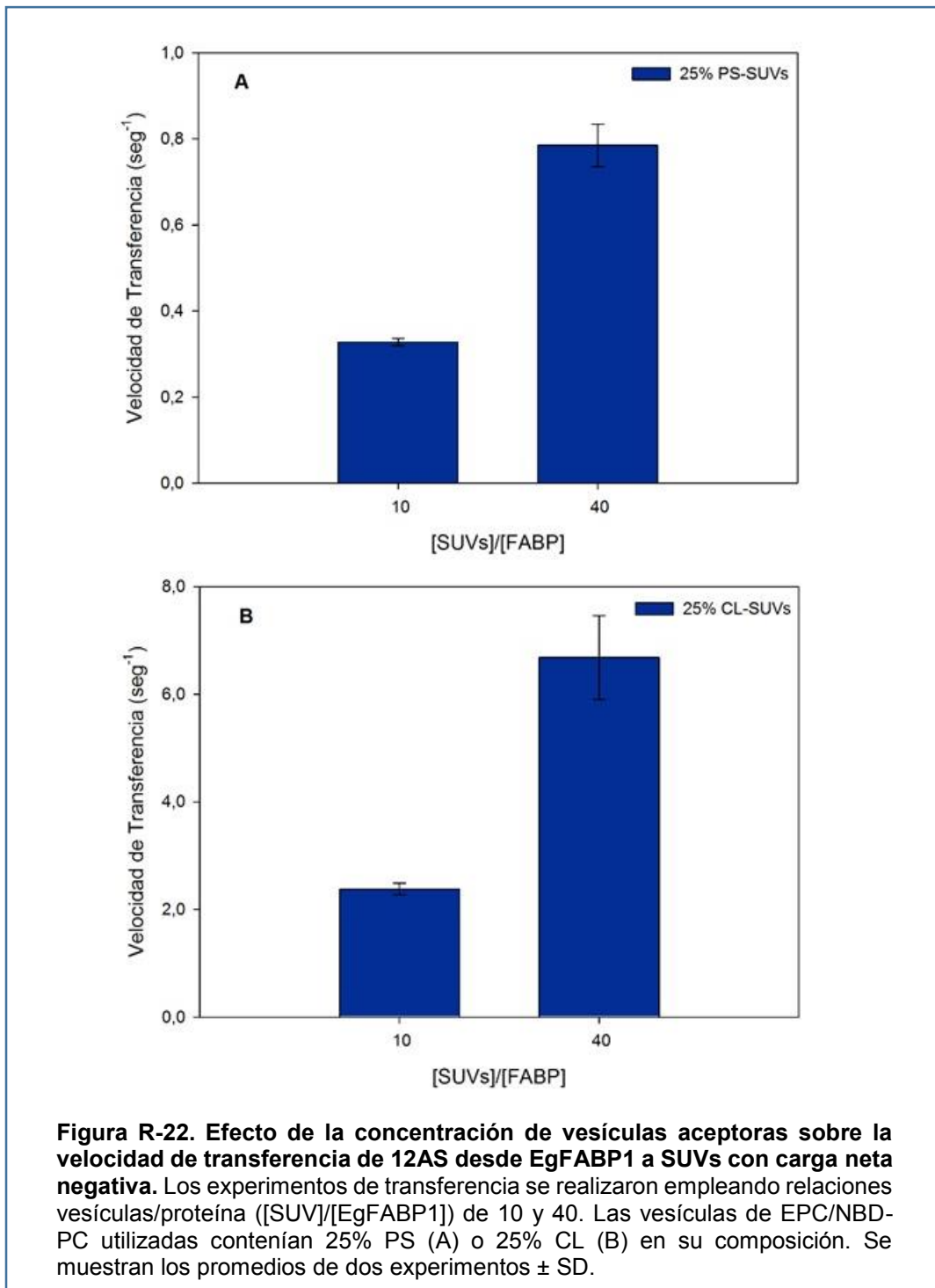
dichos experimentos. Tal como se puede apreciar en dicha figura, el aumento de carga neta negativa sobre la superficie de las SUVs provocó un aumento notable de la velocidad de transferencia del ácido graso hacia las mismas, lo cual es acorde a lo observado para otras FABPs con mecanismo colisional de transferencia de ligandos (Córsico et al., 2005, 1998; Falomir-Lockhart et al., 2006; Franchini et al., 2008; McDermott et al., 2002).

Se probó también el efecto del aumento de concentración de vesículas cargadas sobre la velocidad de transferencia de ligando de EgFABP1 y, tal como se puede observar en la *Figura R-22*, la misma aumentó de manera proporcional al aumento de la concentración de SUVs, independientemente de si las mismas contenían PS (una carga neta negativa por molécula) o CL (dos cargas netas negativas por molécula) en su composición.



Finalmente, se evaluó también el efecto de la fuerza iónica del *buffer* sobre la velocidad de transferencia de ligandos desde EgFABP1 hacia SUVs. Para el caso de vesículas zwitteriónicas, se observó un marcado aumento de la velocidad de transferencia hacia las mismas al aumentar la fuerza iónica del *buffer* (*Figura R-23, panel A*) mientras que para las vesículas cargadas negativamente (*Figura R-23, panel B*) se observó una drástica caída en la velocidad de transferencia al aumentar la fuerza iónica de la fase acuosa. El apantallamiento de cargas provocado por una alta concentración salina podría explicar la caída en la velocidad de transferencia de 12AS hacia vesículas cargadas negativamente.

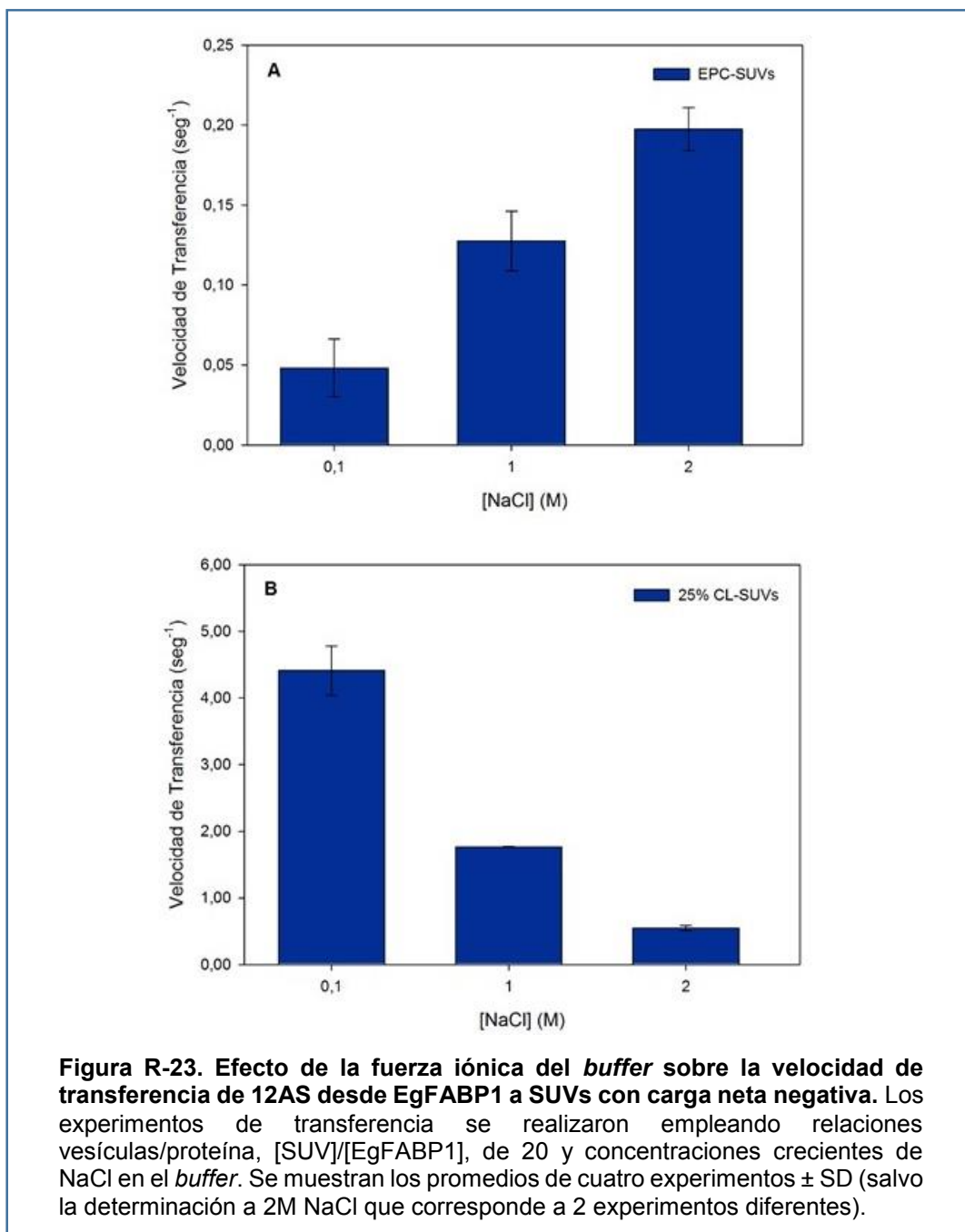
Evidentemente, las interacciones electrostáticas entre EgFABP1 y las SUVs son de gran relevancia, ya que la velocidad de transferencia de 12AS hacia SUVs cargadas muestra una dependencia importante con las cargas de las vesículas y del medio circundante. Por otro



lado, las interacciones hidrofóbicas serían favorecidas por el aumento de la concentración salina, lo cual se evidencia en el aumento de la velocidad de transferencia de ligandos hacia vesículas zwitteriónicas en función de la fuerza iónica del *buffer*. El aumento de las

interacciones hidrofóbicas estaría compensando de este modo la caída de las interacciones electrostáticas provocadas por el apantallamiento de cargas.

Los resultados obtenidos permiten incluir a EgFABP1 en el grupo de las FABPs “colisionales”, al cual pertenecen también, entre otras, SjFABPc de *S. japonicum*, y A-FABP, H-FABP e I-FABP de mamíferos. De este modo, se podría especular que EgFABP1 sería del tipo de FABPs encargadas de direccionar ligandos hacia diferentes organelas o vías metabólicas dentro de la célula (McDermott et al., 2002).

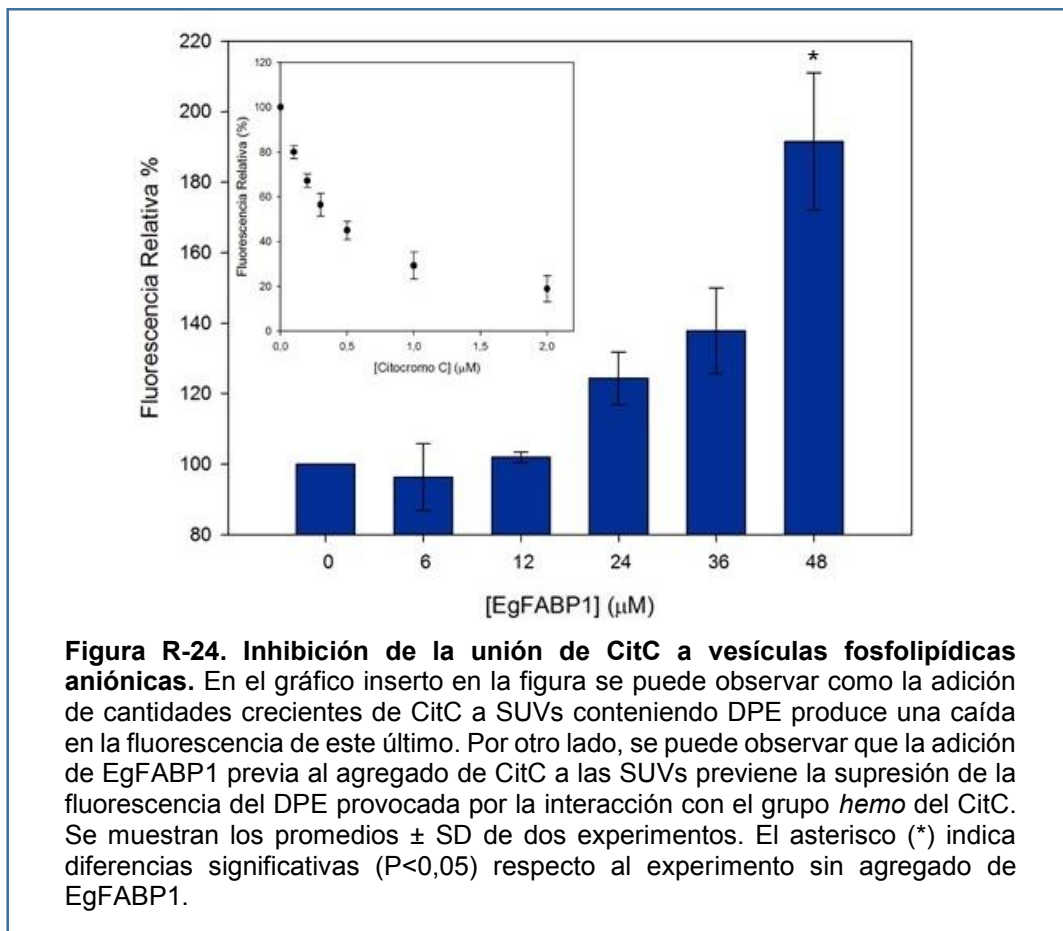


Los experimentos de transferencia de ligandos fluorescentes desde EgFABP1 hacia vesículas fosfolipídicas fueron llevados a cabo en colaboración con la Dra. Gabriela Alvite, con quien comparto la autoría del artículo “Direct Interaction between EgFABP1, a Fatty Acid Binding Protein from *Echinococcus granulosus*, and Phospholipid Membranes” (Pórfido et al., 2012), y en cuyo trabajo de tesis doctoral también se han presentado estos resultados.

### **3.3.3. Determinación de la unión de EgFABP1 a SUVs por competencia con Citocromo c**

Con el objetivo de profundizar el estudio sobre la interacción de EgFABP1 con membranas fosfolipídicas se realizó un estudio de competencia por la unión a vesículas con cardiolipina entre CitC y EgFABP1 (*Ver ítem 2.3.4 de la sección Materiales y métodos*). Este experimento se basa en la interacción del CitC con membranas ácidas conteniendo CL en su composición. Si las membranas contienen además un fluoróforo adecuado, como el grupo *dansilo* del DPE, cuya fluorescencia pueda ser suprimida por interacción con el grupo *hemo* del CitC, la interacción del CitC con dichas vesículas puede ser monitoreada por medidas de fluorescencia (Mustonen et al., 1987). Si se adiciona EgFABP1 a las SUVs conteniendo DPE y CL antes del agregado de CitC, es de esperar que la fluorescencia aumente respecto al mismo ensayo sin EgFABP1, si es que esta última interactúa con las membranas. En otras palabras, si EgFABP1 interactúa con las SUVs, previene la interacción de ellas con el CitC y, por lo tanto, evita la supresión de la fluorescencia del DPE.

La *Figura R-24* muestra que EgFABP1 es capaz de prevenir la interacción del CitC con SUVs aniónicas (con CL). Esta capacidad, sin embargo, resultó estadísticamente significativa sólo para el mayor agregado de EgFABP1 ensayado. Esto podría deberse a que la interacción de EgFABP1 con las membranas podría ser muy débil, o de una duración temporal demasiado corta, como para poder notar un cambio mayor a menores concentraciones. Asimismo, podría ser posible que la interacción de EgFABP1 con membranas se viera favorecida en su forma *holo*, unida a ligandos, más que en su forma libre de ácidos grasos. Sin embargo, por las características de este ensayo, esa no sería una variable factible de ser evaluada, ya que tan pronto como la proteína cargada con ligando se ponga en contacto con SUVs, la misma liberaría el ácido graso para pasar a su forma *apo* (tal como se observó en los experimentos de transferencia de ácidos grasos). Para la realización de estos ensayos se contó con la colaboración de la Dra. Valeria Silva (INIBIOLP, UNLP-CONICET).



### 3.4. Identificación y análisis de FABPs de *E. multilocularis*

Como se comentó en secciones anteriores, el trabajo con *E. multilocularis* presentado en esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Klaus Brehm, en el Instituto de Higiene y Microbiología de la Universidad de Wurzburg (Alemania). Cabe destacar que el laboratorio del Dr. Brehm ha sido uno de los pioneros en el desarrollo del cultivo de células primarias de *E. multilocularis* (Brehm & Spiliotis, 2008; Spiliotis & Brehm, 2009; Spiliotis et al., 2010, 2004) y en la aplicación de técnicas de silenciamiento génico en dichos cultivos (Spiliotis et al., 2010). El modelo de cultivo desarrollado en su laboratorio ha demostrado ser muy útil para el estudio de diversos aspectos de la biología molecular de *E. multilocularis* (Hemer et al., 2014; Koziol et al., 2014, 2013) y ha sido propuesto como un buen modelo para el estudio de *E. granulosus*. Asimismo, el Dr. Brehm y su grupo han participado en el proyecto de secuenciado de los genomas de estos cestodos, recientemente publicados (Tsai et al., 2013). La disponibilidad del sistema de cultivo de células primarias de *E. multilocularis*, así como el avanzado estado del borrador de su genoma en el transcurso de esta tesis, nos llevó a



proponer la identificación de los genes ortólogos a *egfabp1* y *egfabp2* en dicho organismo, y el empleo de siRNAs para intentar silenciar su expresión.

Para ello, primeramente se realizó una búsqueda de los genes de las FABPs en el genoma de *E. multilocularis*, realizando un alineamiento con las secuencias codificantes de *egfabp1* y *egfabp2* (Ver códigos de acceso para NCBI en el ítem 2.4.1 de la sección Materiales y Métodos), empleando la herramienta *BLASTN* del programa informático *BioEdit*. La gran similitud de secuencia entre los genes ortólogos de ambos organismos permitió encontrar las secuencias de ambas FABPs con gran facilidad. Con la finalidad de respaldar la información obtenida a partir del genoma, estas secuencias (denominadas *emfabp1* y *emfabp2* por analogía a las FABPs ya descritas en *E. granulosus*) fueron contrastadas también con datos transcriptómicos disponibles en el laboratorio del Dr. Brehm.

Una vez determinadas las secuencias codificantes para EmFABP1 y EmFABP2 (Ver ítem 3.4.2) se procedió a realizar el diseño de los siRNAs que se utilizarían para intentar silenciar la expresión de estas proteínas. Se diseñaron dos siRNAs, uno dirigido contra *emfabp1* y otro contra *emfabp2*, de tal manera que cada uno fuera específico para uno de los transcritos (Ver Apéndice 7.1.2). Estos siRNAs, así como un siRNA control contra *gfp*, utilizado previamente por Mizukami et al. (2010) y Spiliotis et al. (2010), fueron empleados en ensayos de silenciamiento de EmFABP1 y EmFABP2, como se comentará en el siguiente ítem.

Luego de esta primera búsqueda, se realizaron búsquedas más exhaustivas en el genoma de *E. multilocularis*, contando para ello con la asistencia del Dr. Ferenc Kiss (Universidad de Wurzburg, Alemania). Para ello, se utilizaron herramientas tales como *TBLASTN*, *BLASTX*, traducciones *in silico* y *BLASTP*. Se analizaron también bases de datos transcriptómicas de *E. multilocularis* y otros cestodos (como *Taenia solium*) y bases de datos de proteínas obtenidas por predicciones *in silico*. De esta manera, se obtuvieron tres secuencias adicionales que potencialmente codificarían para FABPs (Ver ítem 3.4.2). Las mismas fueron denominadas *emfabp3*, *emfabp4* y *emfabp5*. Los números utilizados sólo designan el orden cronológico en el que fueron identificadas las secuencias. A partir de dichas secuencias, se diseñaron *primers* específicos (Ver Apéndice 7.1.1) que se utilizaron para analizar los niveles de transcripción de dichos genes en los experimentos de silenciamiento contra EmFABP1 y EmFABP2, de manera de evaluar la posible compensación por otras FABPs en las células tratadas. Cabe aclarar que para el caso de *emfabp3*, al momento de llevar a cabo los experimentos de silenciamiento no se contaba con información certera de su extremo 3', por lo que en dichos experimentos no se la tuvo en cuenta. Asimismo, los *primers* diseñados para estas FABPs también fueron empleados para el clonado de sus secuencias codificantes, como se describirá más adelante. En este caso, luego del surgimiento de versiones más curadas del genoma de *E. multilocularis*, fue posible diseñar *primers* para *emfabp3*. Es importante destacar que las secuencias predichas de *emfabp1* a 4 actualmente se encuentran

anotadas en el genoma de *E. multilocularis* disponible en el sitio web *GeneDB*, perteneciente al Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.genedb.org/>), no así *emfabp5*, cuya existencia sería propuesta por primera vez (según nuestro conocimiento) en la presente tesis.

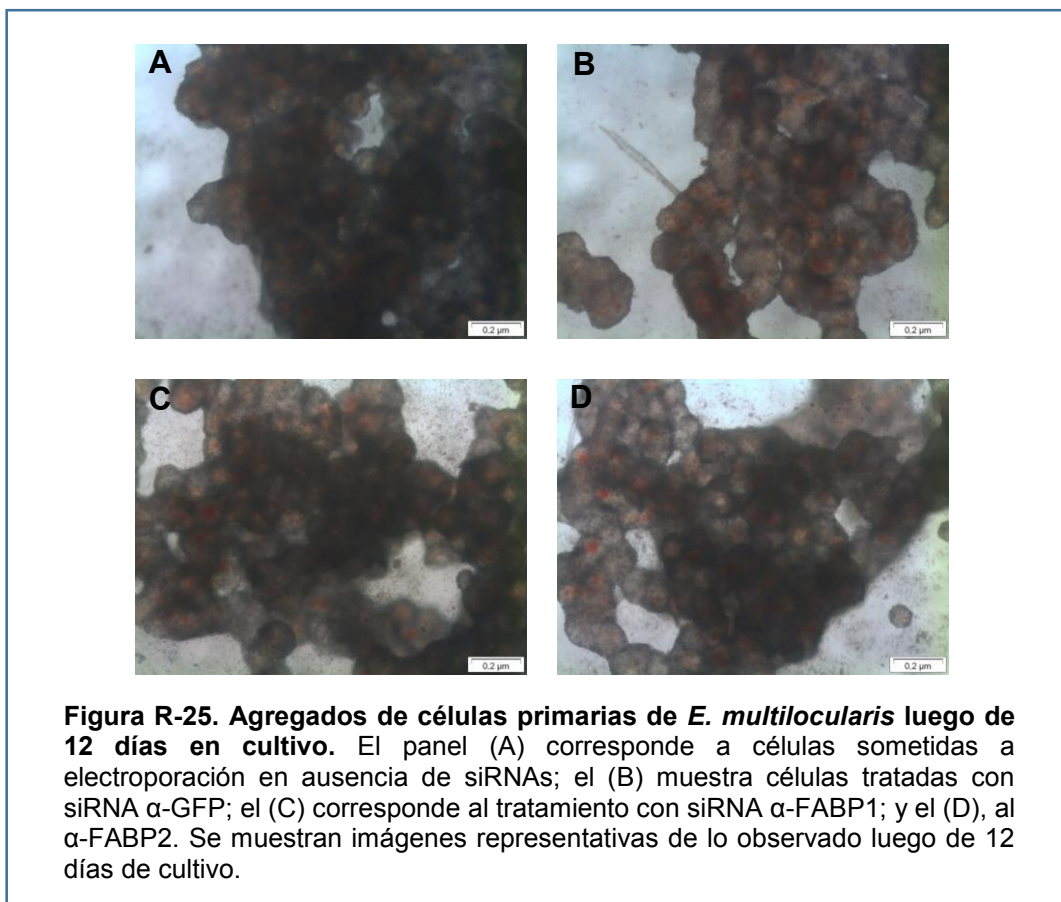
### 3.4.1. Ensayos de silenciamiento en células de *E. multilocularis*

Para los ensayos de silenciamiento, se obtuvieron las células primarias de *E. multilocularis* a partir de metacestodos obtenidos *in vitro*, siguiendo el procedimiento descrito en el ítem 2.4.3 de la sección *Materiales y métodos*. Una vez aisladas las células y montados los cultivos axénicos, se procedió al tratamiento con siRNAs por electroporación. Tal como se mencionó, se emplearon siRNAs dirigidos contra EmFABP1 ( $\alpha$ -FABP1), EmFABP2 ( $\alpha$ -FABP2) y un siRNA control contra GFP ( $\alpha$ -GFP). Se incluyeron además controles sin electroporar y electroporados sin siRNA (*mock*). Las células electroporadas se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos, utilizándose 8 pocillos por cada tratamiento. Los cultivos fueron observados al microscopio diariamente, y se les cambió el medio cada dos días. Las muestras para la extracción de proteínas y ARN se tomaron a los 7 y 12 días luego de la electroporación, siguiendo el esquema publicado por Spiliotis et al. (2010). En la *Figura R-25* se muestran imágenes representativas de cultivos correspondientes a distintos tratamientos a los 12 días post-electroporación. Las fotografías son previas a la cosecha de las células para la extracción de ARN y proteínas. Como se puede observar en la imagen, no se aprecian diferencias visibles en los diversos cultivos lo cual puede indicar que no hubo silenciamiento, o bien que el mismo no genera ningún fenotipo apreciable a simple vista. Las observaciones a tiempos menores mostraron resultados similares.

Con la finalidad de determinar si era posible detectar algún grado de silenciamiento a nivel proteico o de ARN mensajero (mRNA), se hicieron extracciones tanto de proteínas como de mRNA a partir de las células tratadas con siRNAs (*Ver ítems 2.4.4 y 2.4.5 de la sección Materiales y Métodos*), y se analizaron mediante *Western Blot* y RT-PCR semicuantitativa, respectivamente.

En la *Figura R-26* se muestra un ejemplo de los *Western Blots* obtenidos. Tal como se observa en dicha figura, los niveles de FABP resultaron muy variables. Inclusive se observaron variaciones en los niveles de Elp, la proteína utilizada para normalizar los niveles de expresión de FABP. Dada la brevedad de la estadía en el laboratorio del Dr. Brehm, no pudieron ensayarse otras proteínas constitutivas como normalizadoras más adecuadas que Elp. En la *Figura R-27* se muestra un gráfico con la cuantificación de la expresión relativa de FABPs respecto a Elp, de acuerdo a lo determinado por densitometría a partir de los *Western Blots*. Como se puede observar, la cuantificación no brindó resultados repetitivos entre los

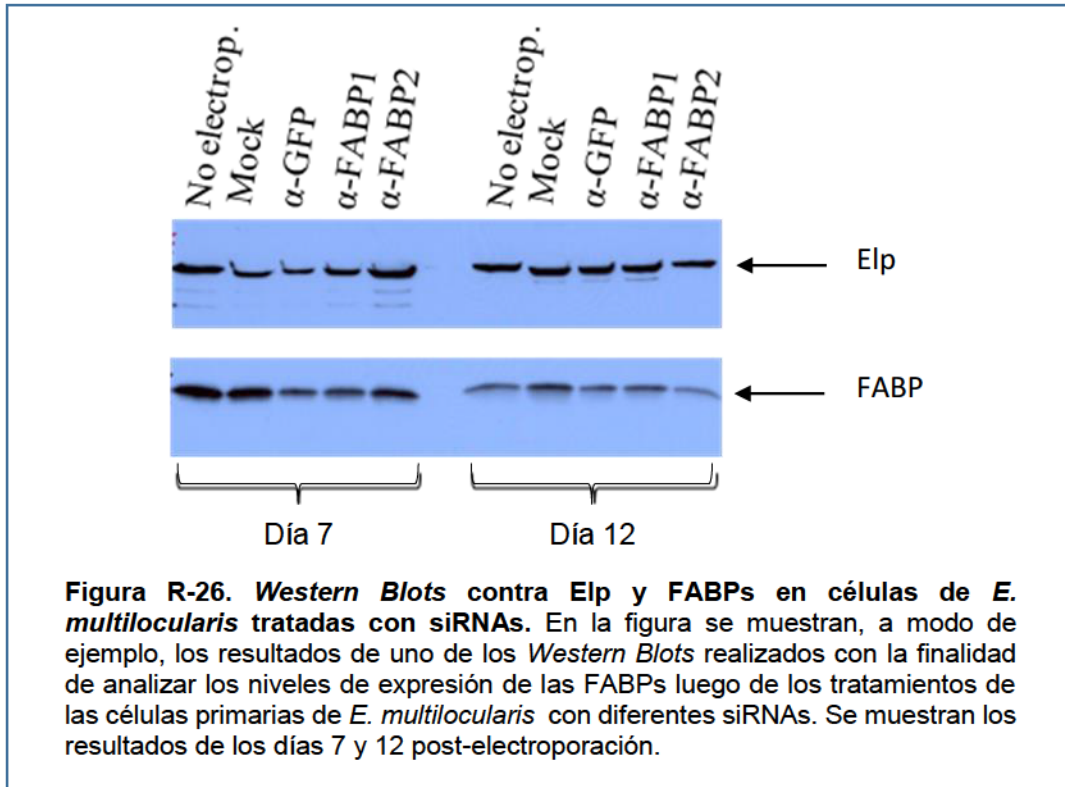
duplicados de cada condición, impidiendo sacar conclusiones certeras respecto al silenciamiento de las FABPs en células de *E. multilocularis*.



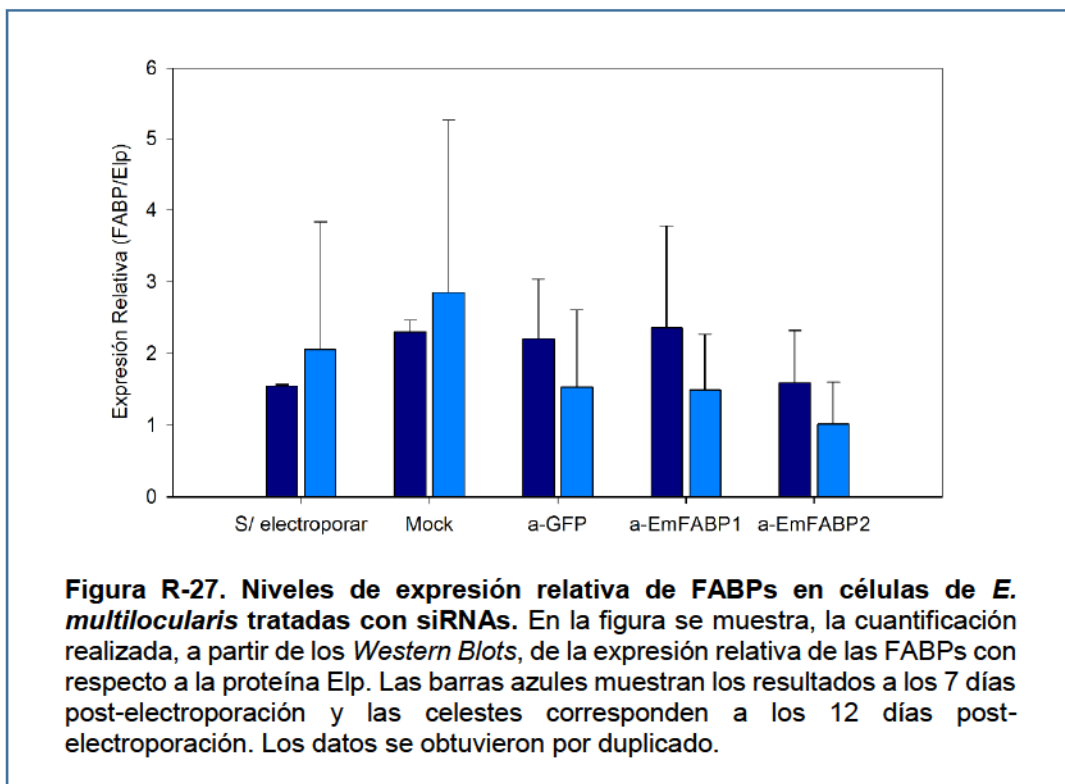
Las muestras de mRNA obtenidas se analizaron también por RT-PCR con la finalidad de detectar variaciones, si las hubiera, a nivel transcripcional. Para ello, se realizó la síntesis de cDNA, el cual luego fue utilizado como molde para las reacciones de PCR correspondientes. Las PCR se realizaron empleando diluciones seriadas 1/10 del ADN molde, y se utilizó un número de ciclos de amplificación tal que no se alcanzara la saturación (*Ver ítem 2.4.5.5 de la sección Materiales y Métodos*). Los resultados sugirieron que no se obtuvo un silenciamiento apreciable de EmFABP1 o EmFABP2, y que tampoco hubo compensación de las mismas por aumento de la expresión de las otras dos FABPs analizadas, ya que no hubo expresión detectable de EmFABP4 o EmFABP5 en ninguna de las condiciones ensayadas.

En la *Figura R-28* se muestra, a modo de ejemplo, la comparación de las RT-PCR de las células electroporadas en ausencia de siRNAs (*mock*) con aquellas electroporadas con siRNA  $\alpha$ -FABP1. Resultados similares se obtuvieron para los otros tratamientos.

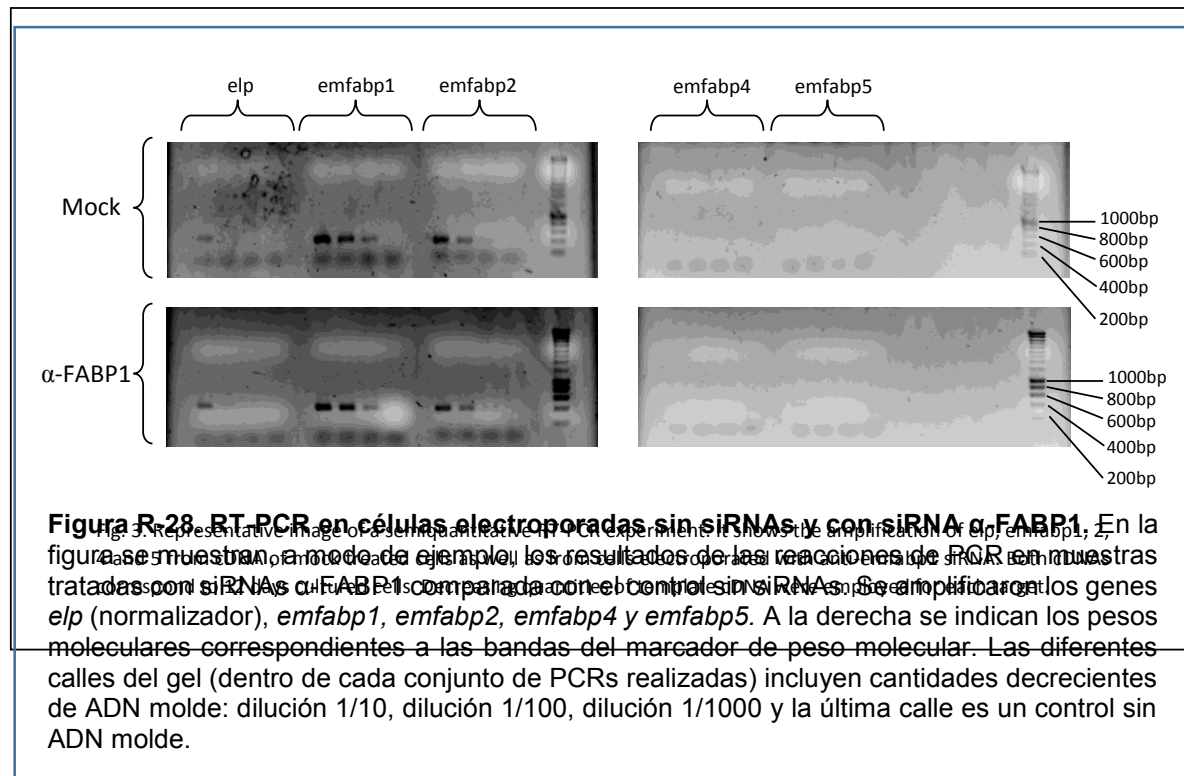
El experimento de silenciamiento se repitió empleando células extraídas a partir de metacestodos provenientes del aislamiento JAVA, y se incluyó un tratamiento con ambos siRNAs ( $\alpha$ -FABP1 y  $\alpha$ -FABP2). Los resultados, no obstante, fueron similares a los ya descritos.



**Figura R-26. Western Blots** contra Elp y FABPs en células de *E. multilocularis* tratadas con siRNAs. En la figura se muestran, a modo de ejemplo, los resultados de uno de los Western Blots realizados con la finalidad de analizar los niveles de expresión de las FABPs luego de los tratamientos de las células primarias de *E. multilocularis* con diferentes siRNAs. Se muestran los resultados de los días 7 y 12 post-electroporación.



**Figura R-27. Niveles de expresión relativa de FABPs** en células de *E. multilocularis* tratadas con siRNAs. En la figura se muestra, la cuantificación realizada, a partir de los Western Blots, de la expresión relativa de las FABPs con respecto a la proteína Elp. Las barras azules muestran los resultados a los 7 días post-electroporación y las celestes corresponden a los 12 días post-electroporación. Los datos se obtuvieron por duplicado.



Los motivos por los cuales no se pudo lograr (o detectar) el silenciamiento de las FABPs de *E. multilocularis* son múltiples y muy variados. Por un lado, es posible que los tiempos post-tratamiento a los cuáles se analizaron las muestras no fueran los adecuados para evaluar el silenciamiento de las FABPs. También es posible que la electroporación no haya sido suficientemente eficiente como para que los siRNAs ingresen a todas las células. Si ese fuera el caso, es posible que cualquier efecto que los mismos hubieran tenido sobre la expresión de las FABPs haya pasado desapercibido en un número de células “no tratadas” mucho mayor. Por otra parte, es posible que el gen *elp* no fuera el más adecuado para normalizar la expresión de las FABPs, en cuyo caso deberían analizarse otros posibles genes constitutivos para tomar como referencia. Recientemente, se ha sugerido un grupo de genes de *E. granulosus* s.s. y *E. ortleppi* que podrían ser usados como normalizadores en futuros experimentos (Espínola et al., 2014), aunque habría que probar que sean adecuados también para normalizar la expresión de genes de *E. multilocularis*. Finalmente, cabe destacar que las FABPs, en particular EmFABP1, es uno de los genes más expresados en *E. multilocularis* (Tsai et al., 2013), lo cual bien podría constituir una complicación adicional al intentar silenciar post-transcripcionalmente a dichos genes.

### 3.4.2. Clonado y caracterización de las FABPs de *E. multilocularis*

#### 3.4.2.1. Clonado de las secuencias codificantes de las diferentes EmFABPs

Tal como se comentó anteriormente, como consecuencia de las búsquedas bioinformáticas en el genoma de *E. multilocularis*, se encontraron cinco secuencias que codificarían para FABPs, entre ellas, los dos genes ortólogos a las FABPs ya descritas en *E. granulosus*, EgFABP1 y EgFABP2. En la *Tabla R-2*, se muestra un resumen de algunas características importantes de las secuencias correspondientes a las FABPs predichas.

Nombre	Nombre Sistemático GeneDB	Longitud Gen (pb) <sup>(a)</sup>	Longitud CDS (pb)	Exones	Longitud Proteína (aa)
EmFABP1	<i>EmuJ_000550000/EmuJ_002165500</i> <sup>(b)</sup>	482	402	2	133
EmFABP2	<i>EmuJ_000549800</i>	482	402	2	133
EmFABP3	<i>EmuJ_000551000</i>	4878	435	2	144
EmFABP4	<i>EmuJ_000417200</i>	3148	531	2	176
EmFABP5	-	1127	402	3	133

**Tabla R-2. Datos de las secuencias predichas para FABPs en *E. multilocularis*.** La tabla muestra algunas características de las secuencias predichas, relevantes para las tareas de clonado de las mismas. Los nombres sistemáticos corresponden al genoma disponible en <http://www.genedb.org/> (Wellcome Trust Sanger Institute).

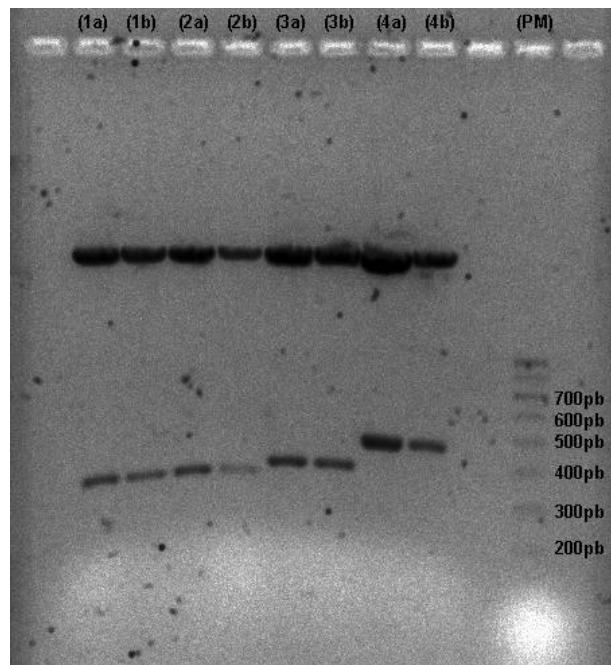
<sup>(a)</sup> Cabe aclarar que no es estrictamente el gen completo lo que se considera en este caso, sino las secuencias genómicas comprendidas entre el codón de inicio y el codón de terminación de la transcripción de las proteínas predichas, lo cual incluye tanto la CDS como secuencias correspondientes a intrones.

<sup>(b)</sup> En el genoma de *E. multilocularis* aparecen dos secuencias iguales, correspondientes a EmFABP1. Se discutirá sobre este punto en secciones posteriores.

Con la finalidad de validar las observaciones realizadas a partir de los estudios bioinformáticos, se decidió clonar las CDS de dichos genes a partir de mRNA obtenido de células primarias de *E. multilocularis* obtenidas en el laboratorio del Dr. Brehm.

Para ello, parte de las células obtenidas para el segundo ensayo de silenciamiento (del aislamiento JAVA) se cultivaron durante dos días en condiciones axénicas, sin ningún tratamiento adicional, para luego extraer el mRNA y sintetizar cDNA (*Ver ítem 2.4.5.4 de la sección Materiales y Métodos*). Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR utilizando dicho cDNA como molde y empleando el protocolo descrito en el *ítem 2.4.6.1* de la sección *Materiales y Métodos*. Se realizó un protocolo de *A-tailing*, se ligaron los fragmentos de ADN al vector comercial *pGEM-T Easy*, y se transformaron bacterias de la cepa *E. coli XL-1 Blue*.

Los plásmidos recombinantes se rastrearon por *screening* blanco/azul. Se seleccionaron dos colonias blancas (con inserto) de cada una de las placas que contenían bacterias transformadas con ligaciones de *pGEM-T* con *emfabp1-4*. Se realizaron cultivos de dichas colonias, se extrajeron los plásmidos y se digirieron con la enzima *EcoRI*, que corta a ambos lados del sitio múltiple de clonado del vector. Seguidamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,2% para visualizar los patrones de digestión. Como se puede observar en la *Figura R-29*, los tamaños aproximados de los insertos liberados en las distintas muestras se corresponden con lo esperado de acuerdo a las predicciones (402pb para *emfabp1* y *emfabp2*, 435pb para *emfabp3* y 531pb para *emfabp4*). Los clones de *emfabp5* no se chequearon por digestión con enzimas de restricción, si no que directamente se mandaron a secuenciar junto con los otros. Se secuenciaron dos clones de *emfabp3*, *emfabp4* y *emfabp5*, y un clon de



**Figura R-29. Digestiones con *EcoRI* de los plásmidos *pGEM-T* recombinantes.** La figura muestra una electroforesis en gel de agarosa donde se observan los insertos liberados al digerir los diferentes plásmidos con la enzima *EcoRI*. Las calles 1a y 1b muestran las digestiones correspondientes a plásmidos conteniendo el inserto de EmFABP1 aislados de dos colonias diferentes. Por analogía, los indicados como 2a y 2b, 3a y 3b, 4a y 4b, corresponden a EmFABP2, EmFABP3 y EmFABP4 respectivamente. A la derecha se indica el peso molecular de las bandas del marcador de peso molecular.

*emfabp1* y *emfabp2*. Los secuenciados se realizaron utilizando un *primer* universal que se apareja con el promotor SP6 presente en el vector *pGEM-T Easy* (Ver *Apéndice 7.2*). Los alineamientos de las secuencias predichas con las obtenidas experimentalmente a partir de los plásmidos recombinantes se muestra en el *Apéndice 7.3.2*. Debido a que fue secuenciada una única hebra de ADN de cada uno de los clones, existen algunas bases no determinadas.

No obstante, fuera de esos nucleótidos no determinados, lo secuenciado coincide con lo predicho. Para el caso de *emfabp5*, al haber quedado los insertos en direcciones opuestas en cada clon, se cuenta con el secuenciado de dos hebras diferentes. Para los análisis posteriores se emplearon las secuencias predichas.

### **3.4.2.2. Caracterización bioinformática de las secuencias proteicas de las FABPs de *E. multilocularis***

Como un primer paso para la caracterización de las secuencias de las posibles FABPs, se procedió a analizar las secuencias proteicas predichas en busca de dominios característicos que permitieran asignarlas a la familia de las FABPs. Para ello, se empleó la herramienta bioinformática *InterPro*, que permite contrastar la secuencia en estudio con diversas bases de datos de dominios proteicos. Las cinco secuencias fueron asignadas a la familia de las FABPs a través de distintos patrones presentes en su estructura primaria (*Ver Figura R-30*).

Por otra parte, se realizaron predicciones de estructura secundaria de las cinco secuencias, empleando la herramienta *PSIPRED*. En todos los casos, se predijeron estructuras con 10 hebras  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices entre las dos primeras hebras  $\beta$ , coincidiendo con la estructura típica de las FABPs (*Ver figuras R-31 a R-35*).

Si bien en la predicción para EmFABP1 aparecen 9 hebras  $\beta$ , se podría esperar que dicha proteína tenga el plegamiento típico de una FABP, ya que es la que más se parece a EgFABP1 (*Ver más adelante*), para la cual está resuelta la estructura cristalográfica (Jakobsson et al., 2003). Más aún, en la región entre las hebras  $\beta$ C y  $\beta$ D, que es donde estaría faltando un giro en la predicción, ambas proteínas son idénticas.

En el caso de EmFABP4, cuya secuencia primaria es notablemente más larga que la de las demás FABPs, no se asigna una estructura determinada a su extremo carboxilo terminal, excepto por una corta hebra  $\beta$ . De demostrarse, en estudios posteriores, que EmFABP4 se traduce, se pliega en una estructura de FABP, y conserva todos los aminoácidos predichos, podría tratarse de una variante diferente de FABP, no descrita hasta el momento; en cuyo caso habría que ver qué plegamiento adopta la región carboxilo terminal y qué rol cumple en la función de dicha proteína.











entre EmFABP4 y EmFABP5), los mismos se encuentran dentro de los rangos de similitud de secuencias observados normalmente entre diversas FABPs (Storch & Córscico, 2008).

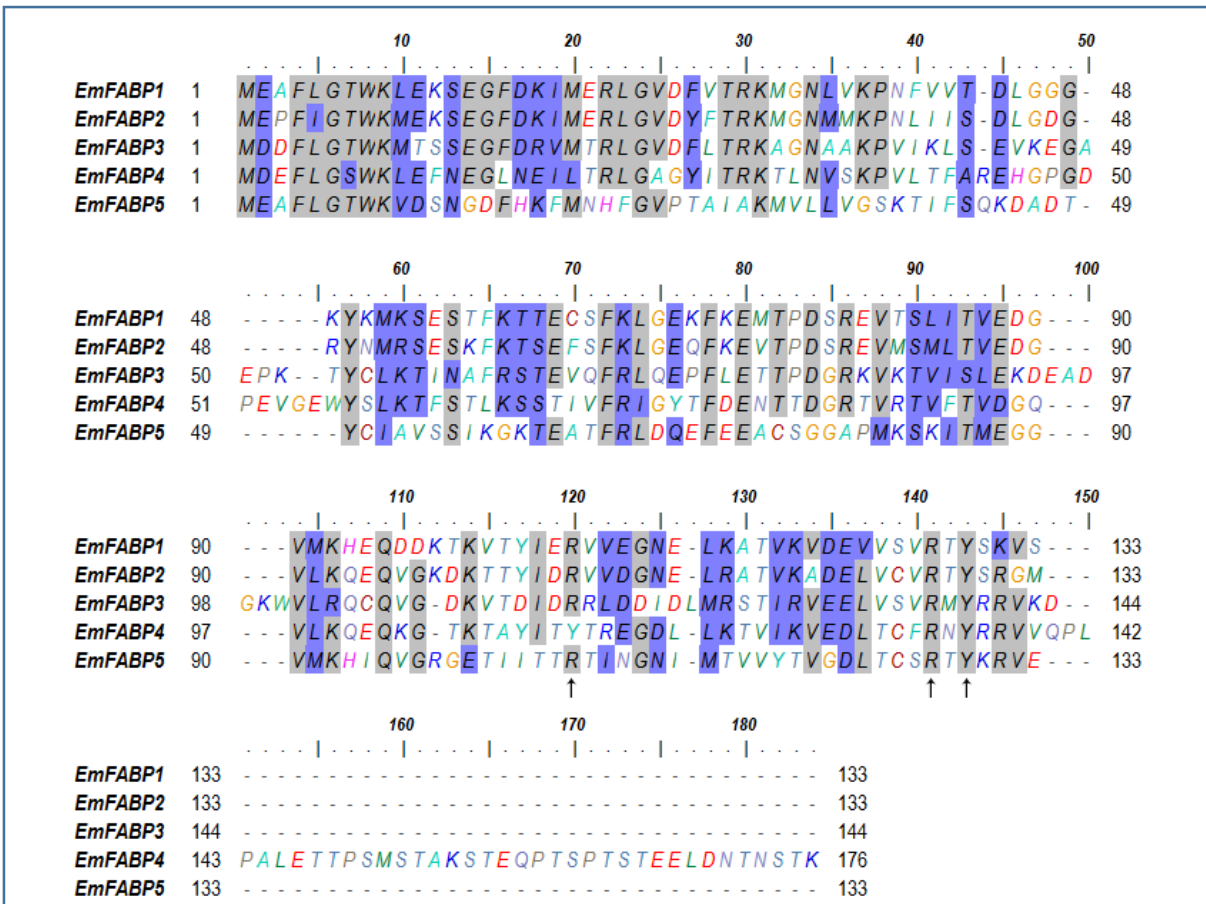
	EmFABP1	EmFABP1 <sup>(b)</sup>	EmFABP2	EmFABP3	EmFABP4	EmFABP5
EmFABP1		100,0%	83,6%	37,9%	28,4%	50,2%
EmFABP1 <sup>(b)</sup>	<b>100%</b>		83,6%	37,9%	28,4%	50,2%
EmFABP2	<b>71,6%/87,3%</b>	<b>71,6%/87,3%</b>		38,8%	27,7%	50,2%
EmFABP3	<b>22,9%/41,7%</b>	<b>22,9%/41,7%</b>	<b>24,3%/41,6%</b>		29,9%	34,7%
EmFABP4	<b>16,4%/27,7%</b>	<b>16,4%/27,7%</b>	<b>14,7%/26,5%</b>	<b>14,7%/33,9%</b>		26,0%
EmFABP5	<b>32,8%/48,5%</b>	<b>32,8%/48,5%</b>	<b>31,3%/49,2%</b>	<b>15,3%/23,6%</b>	<b>9%/20,3%</b>	

**Tabla R-3. Análisis de identidad de secuencias entre las diversas FABPs de *E. multilocularis*.** En la tabla se muestran los porcentajes de identidad de secuencia para las diversas FABPs. En la parte inferior de la diagonal (en negrita) se muestran los valores de similitud de secuencia a nivel proteico, siendo los valores en color negro los correspondientes a identidad de secuencia y los que están en azul, los de similitud. Por encima de la diagonal se encuentran los porcentajes de identidad de secuencia a nivel nucleotídico de las CDS correspondientes.

<sup>(b)</sup> Tal como se mencionó previamente (y se discutirá más adelante) en el genoma de *E. multilocularis* se encontraron dos secuencias que serían copias exactas una de la otra y codificarían para EmFABP1.

A partir del alineamiento de secuencias, se puede observar una conservación notable de los aminoácidos a lo largo de la estructura primaria de las diversas proteínas. Hay ciertas posiciones en las que la conservación es total, entre las cuales se destacan dos de las tres posiciones involucradas en el motivo P2 de unión a ligando. Los análisis de la estructura cristalográfica de EgFABP1 revelaron que dicha proteína se unía a su ligando a través de dicho motivo, al igual que A-FABP y H-FABP, entre otras proteínas de la familia. Los residuos que forman el motivo P2 son, según la numeración para EgFABP1: Arg<sup>107</sup>, Arg<sup>127</sup> y Tyr<sup>129</sup> (Jakobsson et al., 2003). Como se puede ver en la *Figura R-36*, todas las FABPs predichas, salvo EmFABP4, conservan esa tríada de aminoácidos. En EmFABP4, el aminoácido que correspondería a la Arg<sup>107</sup> es una Tyr. En otras muchas regiones de las proteínas existen aminoácidos que, aun no siendo idénticos, son semejantes en cuanto a polaridad, tamaño u otras características (*destacados con fondo azul en la Figura R-36*).

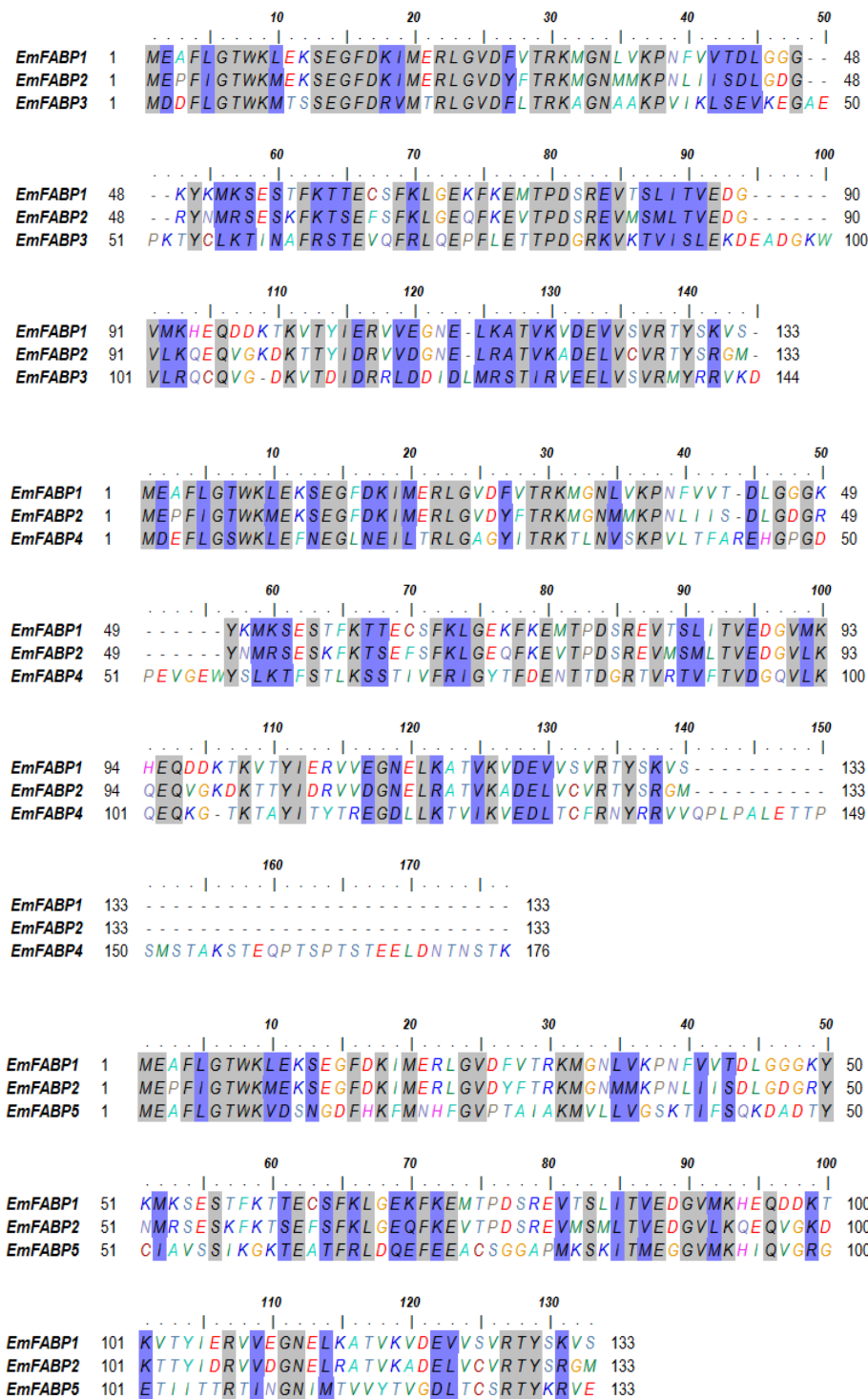
Al observar los alineamientos de EmFABP1 y EmFABP2 únicamente (*Figura R-37*) se observa la altísima conservación de los aminoácidos entre estas dos proteínas. Por otra parte, en los alineamientos de EmFABP1 y EmFABP2 con cada una de las otras tres FABPs por separado (*Figura R-38*), se observa también la conservación en diversas regiones de las proteínas.



**Figura R-36. Alineamiento de las secuencias de las FABPs de *E. multilocularis*.** La imagen muestra un alineamiento obtenido con la herramienta CLUSTALW. El fondo gris indica los aminoácidos idénticos entre las secuencias, mientras que el azul destaca aminoácidos similares entre las mismas. Como se puede observar, existe un claro patrón de conservación de la estructura primaria entre las diversas proteínas predichas, aun cuando algunas de ellas, en particular EmFABP3 y EmFABP4, parecen poseer ciertas inserciones a lo largo de su secuencia. Las tres flechas negras indican los aminoácidos que conforman el motivo P2 de unión a ligandos.



**Figura R-37. Alineamiento de las secuencias de EmFABP1 y EmFABP2.** La imagen muestra un alineamiento obtenido con la herramienta CLUSTALW de las secuencias de EmFABP1 y EmFABP2. Como puede observarse claramente en la figura, existe un gran número de aminoácidos que son idénticos en ambas proteínas (fondo gris).



**Figura R-38. Alineamiento de las secuencias de EmFABP1 y EmFABP2 con cada una de las demás FABPs.** La imagen muestra un alineamiento obtenido con la herramienta CLUSTALW de las secuencias de EmFABP1 y EmFABP2 comparadas con EmFABP3, EmFABP4 y EmFABP5 por separado. Se puede observar que, aun cuando EmFABP3 y EmFABP4 poseen ciertas inserciones en la secuencia, poseen muchos aminoácidos en común con EmFABP1 y EmFABP2 (ya sea idénticos o similares). EmFABP5, por su parte, mantiene varios de los aminoácidos importantes sin variaciones, como podrían ser los involucrados en el motivo P2, aunque varía algo más en otras regiones.

Con la finalidad de comparar las secuencias de las EmFABPs con las de proteínas de otras especies se realizaron análisis por *BLASTP* con las bases de datos del NCBI. Por un lado, se compararon las secuencias con la base de datos de proteínas, excluyendo las que fueran del género *Echinococcus* (Ver Tabla R-4). Por otra parte, se compararon con proteínas de mamíferos, para analizar a cuál de los subgrupos de FABPs se podrían asignar las de *E. multilocularis* (Ver Tabla R-5). En ambos casos, se tuvieron en cuenta sólo las entradas que correspondían a proteínas cuya existencia ha sido confirmada al menos a nivel de estructura primaria. Se descartaron las coincidencias con proteínas predichas y con construcciones artificiales.

FABP <i>E. multilocularis</i>	FABP más semejante	Especie	Cobertura	Identidad	Código de acceso
EmFABP1	TpFABP	<i>Taenia pisiformis</i>	100%	80%	gb ADQ55925.1
EmFABP2	fatty acid binding protein 2	<i>Taenia solium</i>	100%	96%	gb AFS64570.1
EmFABP3	fatty acids and retinol binding protein isoform 2	<i>Taenia solium</i>	93%	87%	gb ADZ72849.1
EmFABP4	FABPa	<i>Mesocestoides vogae</i>	78%	41%	gb ABO93626.3
EmFABP5	TpFABP	<i>Taenia pisiformis</i>	99%	39%	gb ADQ55925.1

**Tabla R-4. Comparación de secuencias de las FABPs de *E. multilocularis* con la base de datos de proteínas del NCBI.** Se muestran las entradas que mostraron mayor semejanza en los alineamientos. No se tuvieron en cuenta las proteínas del género *Echinococcus* ni las que fueran predichas o construcciones artificiales.

FABP <i>E. multilocularis</i>	FABP más semejante en mamíferos	Especie	Cobertura	Identidad	Código de acceso
EmFABP1	A-FABP	<i>Rattus norvegicus (Rata)</i>	97%	45%	NP_445817.1
EmFABP2	mP2	<i>Oryctolagus cuniculus (Conejo)</i>	96%	47%	NP_001075699.1
EmFABP3	mP2	<i>Homo sapiens (Humano)</i>	97%	38%	PDB: 3NR3_A
EmFABP4	A-FABP	<i>Rattus norvegicus (Rata)</i>	77%	34%	AAH84721.1
EmFABP5	mP2	<i>Bos taurus (Vaca)</i>	96%	35%	1PMP_A

**Tabla R-5. Comparación de secuencias de las FABPs de *E. multilocularis* con la base de datos de proteínas de mamíferos del NCBI.** Se muestran las entradas que mostraron mayor semejanza en los alineamientos. No se tuvieron en cuenta las proteínas predichas.

Como se puede ver a partir de las tablas, las mayores coincidencias se dan con FABPs de cestodos y en particular, de cestodos tenioides, a excepción de EmFABP4. Cabe destacar que los genomas de dichos organismos son muy recientes (y en algunos, ni siquiera están disponibles) por lo que tal vez en el corto plazo puedan surgir nuevas variantes de FABPs. Es más, dada la relación filogenética tan cercana entre los géneros *Echinococcus* y *Taenia*, es probable que cada FABP de un organismo de un género posea su ortólogo correspondiente en el otro. El hecho de que EmFABP3 se asemeje a una proteína de *T. solium* que se ha reportado que es capaz de unir retinol (Kim et al., 2012), lleva a pensar que la existencia de numerosas FABPs en cestodos tal vez implique que cada una de ellas posee un espectro de



ligandos más acotados, y funciones propias y específicas; al contrario de lo que previamente se pensaba (Esteves & Ehrlich, 2006).

Al comparar las FABPs de *E. multilocularis* con las FABPs de mamíferos, se puede notar que todas ellas se asemejan a FABPs del subgrupo IV (Smathers & Petersen, 2011), que incluye, entre otras, a H-FABP, A-FABP y mP2, lo cual coincide con lo previamente observado (Esteves & Ehrlich, 2006).

### 3.4.2.3. Caracterización bioinformática de los genes de las FABPs de *E. multilocularis*

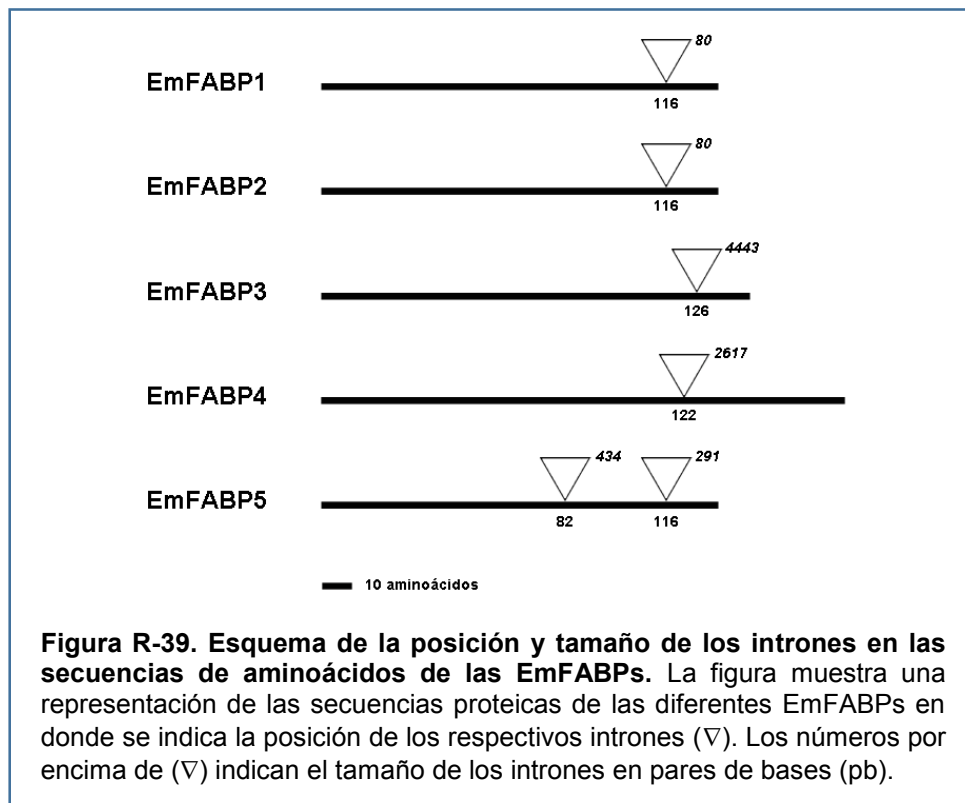
Como parte de los análisis de las secuencias predichas y clonadas de las diferentes FABPs de *E. multilocularis* se procedió a analizar la estructura génica de dichas secuencias. Tal como se mencionó previamente, las secuencias analizadas no son estrictamente los genes completos de las FABPs propuestas, ya que no se posee información sobre los extremos 5' ni 3' UTR (del inglés *untranslated region*, es decir, región no traducida) ni sobre regiones regulatorias como pueden ser las secuencias promotoras; sino que corresponden a las regiones genómicas comprendidas entre el codón de iniciación y el codón de finalización de la traducción, determinados a partir de las predicciones y del clonado de las CDS.

Mediante la herramienta bioinformática *SpIign* se alinearon las CDS y las secuencias genómicas respectivas para cada una de las FABPs. De esa manera, se localizaron correctamente los sitios de *splicing* de cada uno de los genes, así como las bases en los extremos 5' y 3' de los intrones (Ver Tabla R-6). A excepción del intrón I de *emfabp5*, todos los otros intrones poseen las típicas secuencias GT en el extremo 5' y AG en el 3'. El intrón I de *emfabp5* posee en el extremo 5' la secuencia GC, que si bien es menos común que la secuencia GT, se sabe que se presenta en algunos intrones de varias especies diferentes,

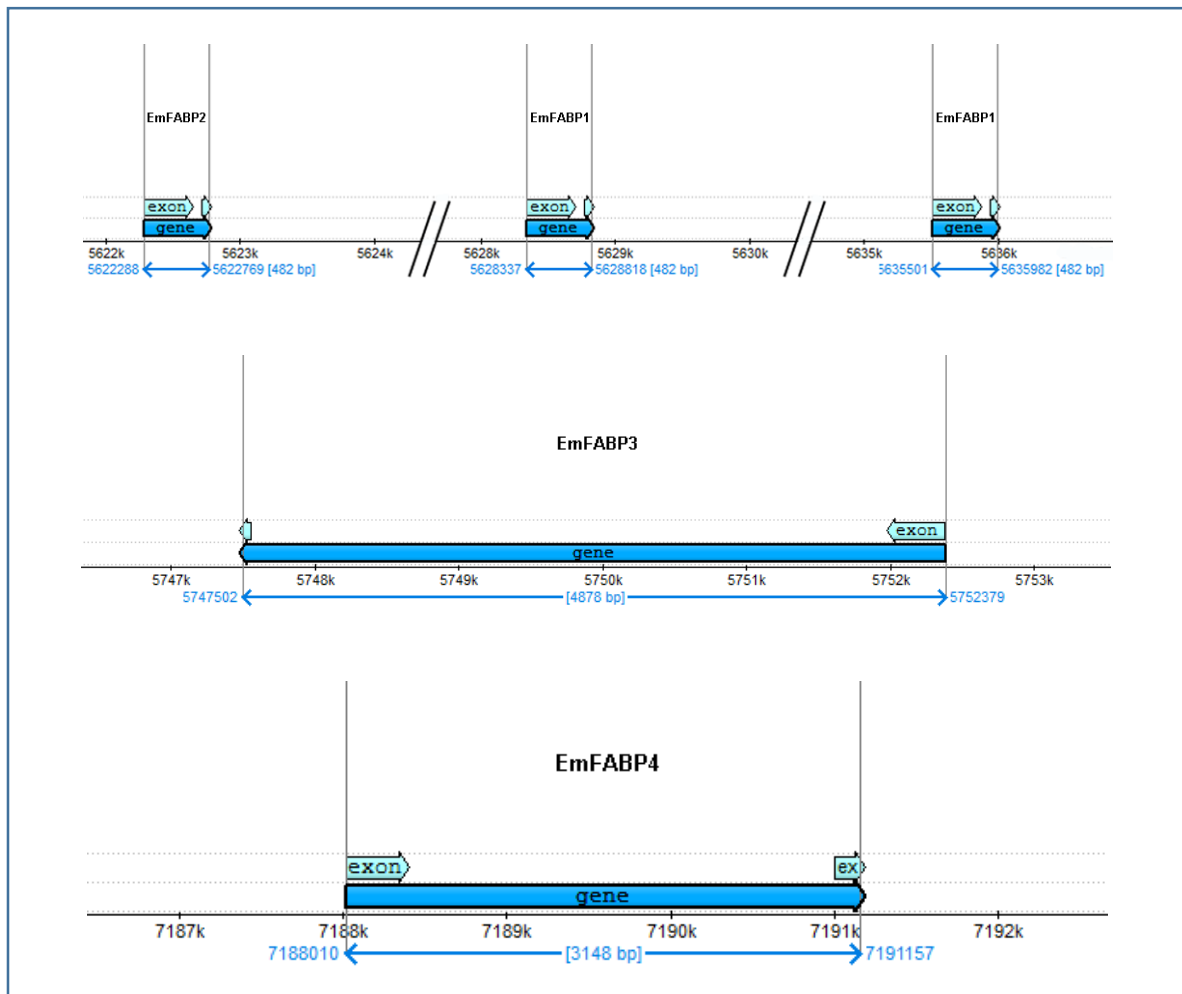
	Posición Intrón/es (aa)	Tamaño Intrón/es (pb)	Estructura Génica
EmFABP1	116	80	<Exón>GT...AG<Exón>
EmFABP2	116	80	<Exón>GT...AG<Exón>
EmFABP3	126	4443	<Exón>GT...AG<Exón>
EmFABP4	122	2617	<Exón>GT...AG<Exón>
EmFABP5	82/116	434/291	<Exón>GC...AG<Exón>GT...AG<Exón>

**Tabla R-6. Posición y tamaño de los intrones en las diferentes EmFABPs.** En la tabla se resume la posición de los intrones (en relación a la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas), el tamaño de los intrones (en pares de bases) y la estructura de los genes de las diferentes FABPs, destacándose las bases de los extremos de los intrones.

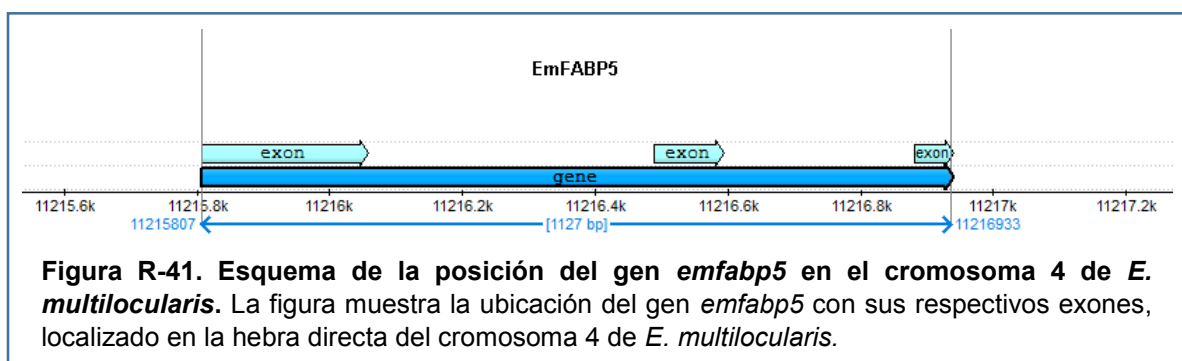
entre las cuales se hallan los humanos, *C. elegans* y *Arabidopsis thaliana* (Parada et al., 2014; Sheth et al., 2006). Por otra parte, la distribución de los intrones (Ver Figura R-39) coincide con lo observado previamente en FABPs de invertebrados, en el sentido de que, si bien el número y el tamaño de los intrones son variables, la posición de los mismos se conserva incluso en relación a las posiciones altamente conservadas de los intrones en las FABPs de vertebrados (Bernlohr et al., 1997; Esteves & Ehrlich, 2006; Smathers & Petersen, 2011; Zimmerman & Veerkamp, 2002). Es llamativo que sólo *emfabp5* posea dos intrones, aunque se ha visto, por ejemplo en *C. elegans*, que genes de diferentes FABPs poseen un número diferente de intrones (Esteves & Ehrlich, 2006).



Posteriormente, se analizó también la ubicación de los genes de las diferentes EmFABPs en el genoma de *E. multilocularis*. Dicho análisis ubicó a los genes para EmFABP1, EmFABP2, EmFABP3 y EmFABP4 en el cromosoma 7 de *E. multilocularis*, mientras que el gen de EmFABP5 se localiza en el cromosoma 4. Todas las proteínas del cromosoma 7 se encuentran codificadas en una misma hebra, salvo EmFABP3 que está codificada sobre la complementaria (Ver Figuras R-40 y R-41).



**Figura R-40. Esquema de la posición de los genes *emfabp1-4* en el cromosoma 7 de *E. multilocularis*.** La figura muestra la ubicación relativa de los diferentes genes a lo largo del cromosoma 7 de *E. multilocularis*. Como se puede observar, tanto EmFABP2, EmFABP4 como ambas copias de EmFABP1 se encuentran codificadas en una misma hebra, mientras que EmFABP3 está codificada en la otra. Las dos copias de EmFABP1 corresponden, de izquierda a derecha, a las entradas EmuJ\_002165500 y EmuJ\_000550000 del GeneDB.

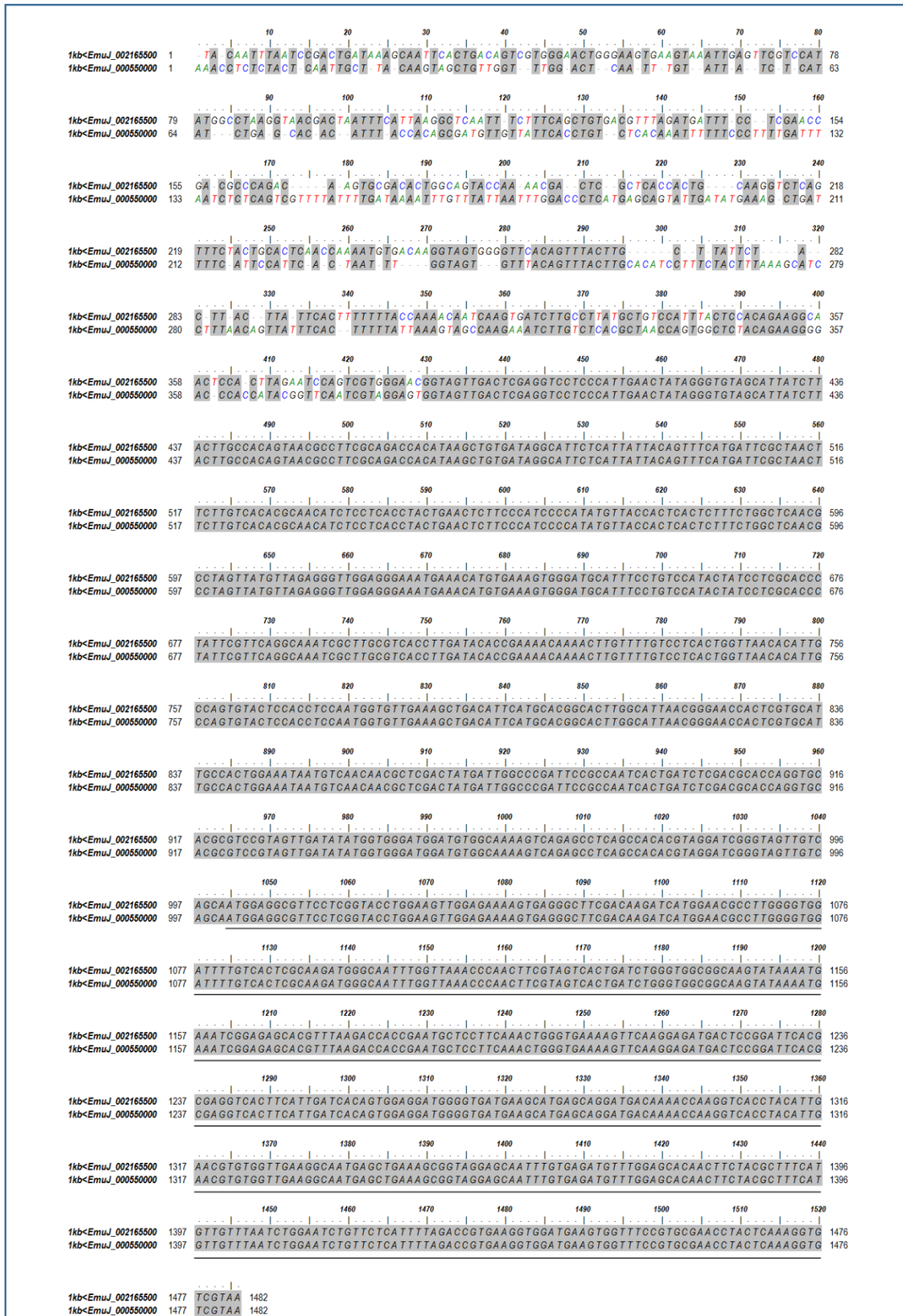


**Figura R-41. Esquema de la posición del gen *emfabp5* en el cromosoma 4 de *E. multilocularis*.** La figura muestra la ubicación del gen *emfabp5* con sus respectivos exones, localizado en la hebra directa del cromosoma 4 de *E. multilocularis*.

Cabe destacar que a continuación del gen *emfabp2* se encuentran dos copias del gen *emfabp1*. Esto había sido observado al analizar versiones previas del genoma de *E. multilocularis*, pero se había atribuido a un error de ensamblaje del mismo. No obstante, dicha distribución se conserva en las versiones actuales, más curadas, del genoma; y al analizar las

secuencias flanqueantes de ambos genes se observa que las mismas son diferentes. Río arriba del codón de inicio, ambas secuencias comparte unas 600 bases idénticas, pero luego varían ampliamente. En cuanto a las secuencias río abajo, conservan algunas regiones similares, pero se diferencian bastante una de la otra (*Ver Figuras R-42A y R-42B*). Si bien se requieren otros estudios para analizar si ambas secuencias se transcriben, el hecho de que las secuencias flanqueantes sean diferentes podría tener algún tipo de implicancia en la regulación post-transcripcional de dichos genes, ya que es en esas secuencias (3' UTR en particular) en donde se unen moléculas de ARN regulatorias, como los microRNAs (o miRNAs). Estas moléculas de ARN de 22 nucleótidos regulan la expresión génica induciendo la destrucción de los mRNA, modificando su estabilidad o regulando la traducción de los mismos. En *Echinococcus* spp. se ha descrito la existencia de miRNAs y sus vías de procesamiento (Bai et al., 2014; Cucher et al., 2015, 2011; Fromm et al., 2013; Jin et al., 2013; Zheng, 2013).

El hecho de que tres genes para FABPs se encuentren formando un *cluster* en el genoma de *E. multilocularis*, no es tan sorprendente si se tiene en cuenta que situaciones similares se han reportado ya en varios organismos. En el caso de humanos, por ejemplo, se ha observado que A-FABP, E-FABP, mP2, T-FABP y la recientemente reportada FABP12, se encuentran codificadas no sólo en un mismo cromosoma sino dentro de una región de unos 300000 pares de bases (Smathers & Petersen, 2011).



**Figura R-42A. Alineamiento de las dos copias de EmFABP1 en el genoma de *E. multilocularis*.** En la figura se muestran las secuencias de las dos copias de EmFABP1 incluyendo los 1000 pares previos al codón de inicio. Se marca con una línea negra la región entre el ATG y el codón de terminación.

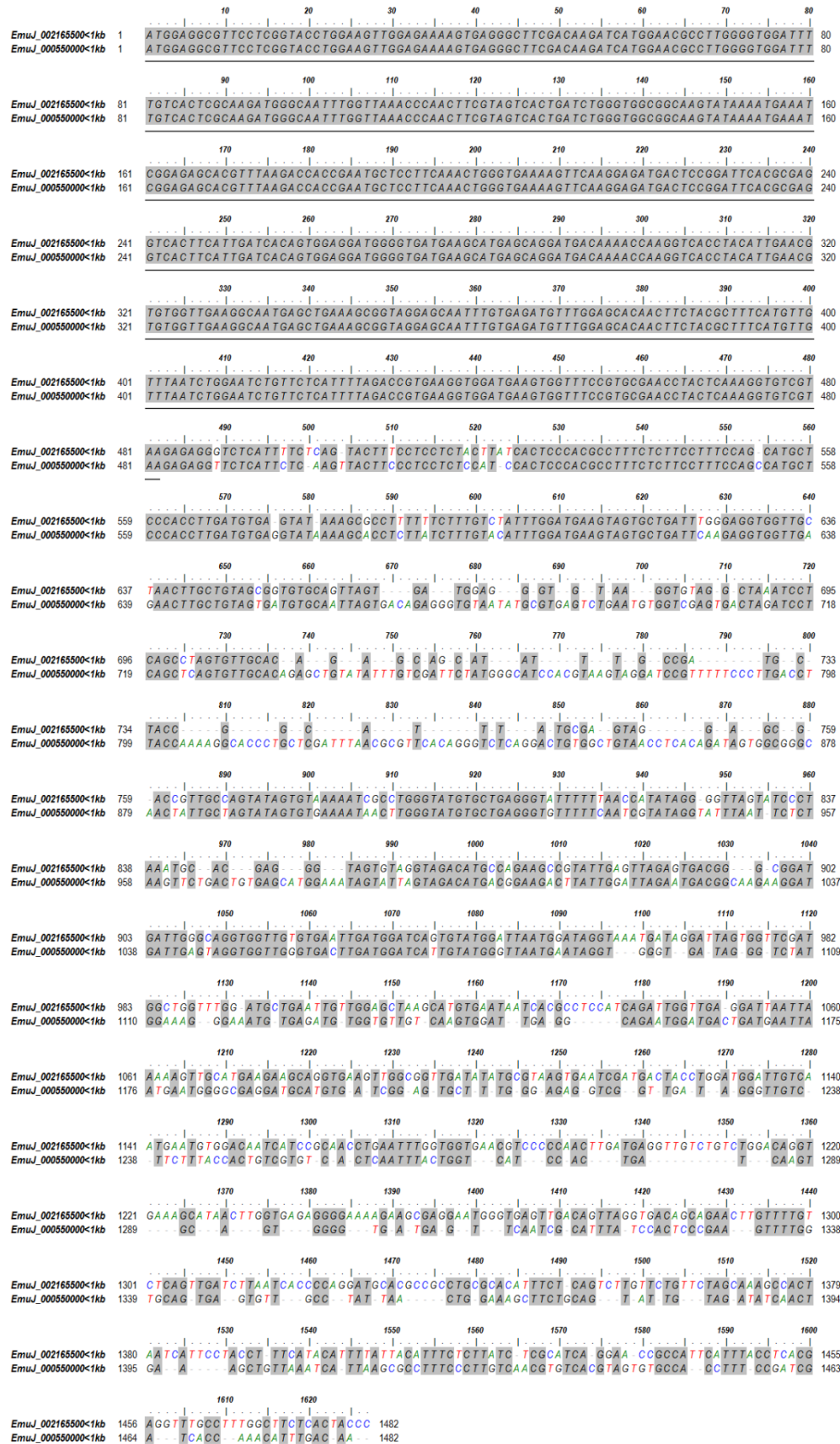


Figura R-42B. Alineamiento de las dos copias de EmFABP1 en el genoma de *E. multilocularis*. En la figura se muestran las secuencias de las dos copias de EmFABP1 incluyendo los 1000 pares de bases posteriores al codón de terminación. Se marca con una línea negra la región entre el ATG y el codón de terminación.

### 3.4.2.4. Predicción de FABPs en *E. granulosus* y comparación con las FABPs de *E. multilocularis*

Con el objetivo de analizar si en *E. granulosus* era posible encontrar los genes ortólogos a los de las FABPs de *E. multilocularis*, se realizaron búsquedas en la base de datos *GeneDB*, del Wellcome Trust Sanger Institute y se analizaron las secuencias genómicas de la versión “Egranulosus\_genome\_v3”. En la *Tabla R-7* se puede observar un resumen de lo encontrado en el genoma de *E. granulosus*.

Nombre	Nombre Sistemático GeneDB	Longitud Gen (pb) <sup>(a)</sup>	Longitud CDS (pb)	Exones	Longitud Proteína (aa)
EgFABP1	<i>EgrG_000549850</i> <sup>(b)</sup>	482	402	2	133
EgFABP1.2	<i>EgrG_000550000</i>	482	402	2	133
EgFABP2	<i>EgrG_000549800</i>	482	402	2	133
EgFABP3	<i>EgrG_000551000</i>	4897	435	2	144
EgFABP4	<i>EgrG_000417200</i>	3185	531	2	176
EgFABP5	-	1126	402	3	133

**Tabla R-7. Datos de las secuencias predichas para FABPs en *E. granulosus*.** La tabla muestra algunas características de las secuencias predichas. Los nombres sistemáticos corresponden al genoma disponible en <http://www.genedb.org/> (Wellcome Trust Sanger Institute).

<sup>(a)</sup> Se consideran las secuencias genómicas comprendidas entre el codón de inicio y el codón de terminación de la transcripción de las proteínas predichas.

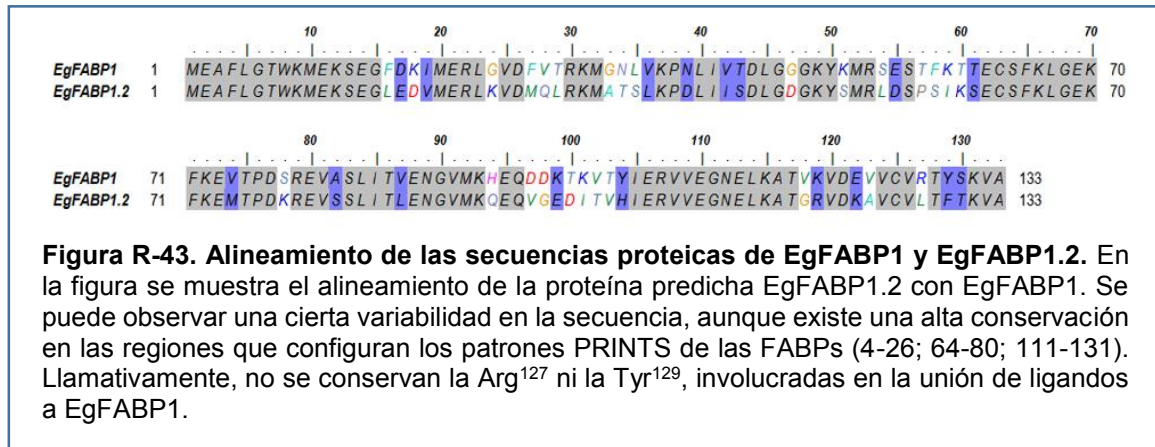
<sup>(b)</sup> En *GeneDB* se encuentra mal anotado el gen de EgFABP1 bajo el código de acceso presentado en la tabla.

Como se puede observar en la *Tabla R-7*, las secuencias encontradas en *E. granulosus* se asemejan en varios aspectos a las predichas en *E. multilocularis*, aunque difieren en otros. Quizás lo más llamativo es el hecho de que en el caso de *E. granulosus*, el *cluster* de tres genes contiguos de FABPs no posee dos copias exactamente iguales de *egfabp1*, sino que una pareciera ser una variante diferente (Ver *Figura R-43*). Dada la ubicación relativa de dicho gen, comparable a una de las copias de *emfabp1* (Ver *más adelante*), se lo denominó *egfabp1.2*.

El hecho de que EgFABP1.2 no conserve dos de los tres aminoácidos que forman parte del motivo P2 de unión a ligandos hace pensar que dicha proteína, en caso de expresarse, podría unir los ligandos de otra manera, o bien unir otro tipo de ligandos diferentes a los que une EgFABP1.

Se analizó también la similitud de secuencias dentro de la familia de las FABPs de *E. granulosus*, tal como se realizó para las FABPs de *E. multilocularis*. Como se puede observar en la *Tabla R-8*, las similitudes entre las diferentes FABPs se asemeja a lo observado con los genes ortólogos, de *E. multilocularis*. Asimismo, cabe destacar que la CDS de *egfabp1.2* se

asemeja casi tanto a la de *egfabp1* como *egfabp2*, mientras que a nivel proteico EgFABP2 se parece más que EgFABP1.2 a EgFABP1.



Por otra parte, con la finalidad de comparar las secuencias de las FABPs de ambos cestodos, se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas predichas para cada una de las FABPs y comparaciones del grado de similitud de las mismas. Como se puede observar en la *Figura R-44* y en la *Tabla R-9*, el grado de conservación es notable, y muestra la estrecha relación filogenética entre *E. multilocularis* y *E. granulosus*. Asimismo, refleja lo observado previamente en otros organismos, en donde se asemejan más las FABPs de un mismo órgano o tejido de distintos organismos, que las diferentes FABPs de distintos tejidos de un mismo organismo (Zimmerman & Veerkamp, 2002). La excepción parece ser EgFABP1.2, que no tendría un equivalente directo en *E. multilocularis*. Como se mencionó anteriormente, y se mostrará a continuación, la posición equivalente a la de *egfabp1.2*, en el genoma de *E. multilocularis*, es ocupada por una copia exacta de *emfabp1*.

	EgFABP1	EgFABP1.2	EgFABP2	EgFABP3	EgFABP4	EgFABP5
EgFABP1		81,3%	83,6%	40,0%	28,8%	51,2%
EgFABP1.2	<b>66,4%</b> / <i>79,8%</i>		74,6%	37,9%	27,9%	48,0%
EgFABP2	<b>74,6%</b> / <i>88,8%</i>	<b>61,7%</b> / <i>80,4%</i>		39,1%	27,7%	49,3%
EgFABP3	<b>23,6%</b> / <i>42,4%</i>	<b>20,1%</b> / <i>37,5%</i>	<b>24,3%</b> / <i>41,7%</i>		29,6%	34,0%
EgFABP4	<b>15,9%</b> / <i>27,3%</i>	<b>13,5%</b> / <i>25,0%</i>	<b>14,8%</b> / <i>26,1%</i>	<b>14,8%</b> / <i>32,9%</i>		25,6%
EgFABP5	<b>35,1%</b> / <i>48,5%</i>	<b>31,3%</b> / <i>47,0%</i>	<b>31,3%</b> / <i>48,5%</i>	<b>14,6%</b> / <i>22,2%</i>	<b>8,5%</b> / <i>19,9%</i>	

**Tabla R-8. Análisis de identidad de secuencias entre las diversas FABPs de *E. granulosus*.** En la tabla se muestran los porcentajes de identidad de secuencia para las diversas FABPs. En la parte inferior de la diagonal (en negrita) se muestran los valores de similitud de secuencia a nivel proteico, siendo los valores en color negro los correspondientes a identidad de secuencia y los que están en azul, los de similitud. Por encima de la diagonal se encuentran los porcentajes de identidad de secuencia a nivel nucleotídico de las CDS correspondientes.



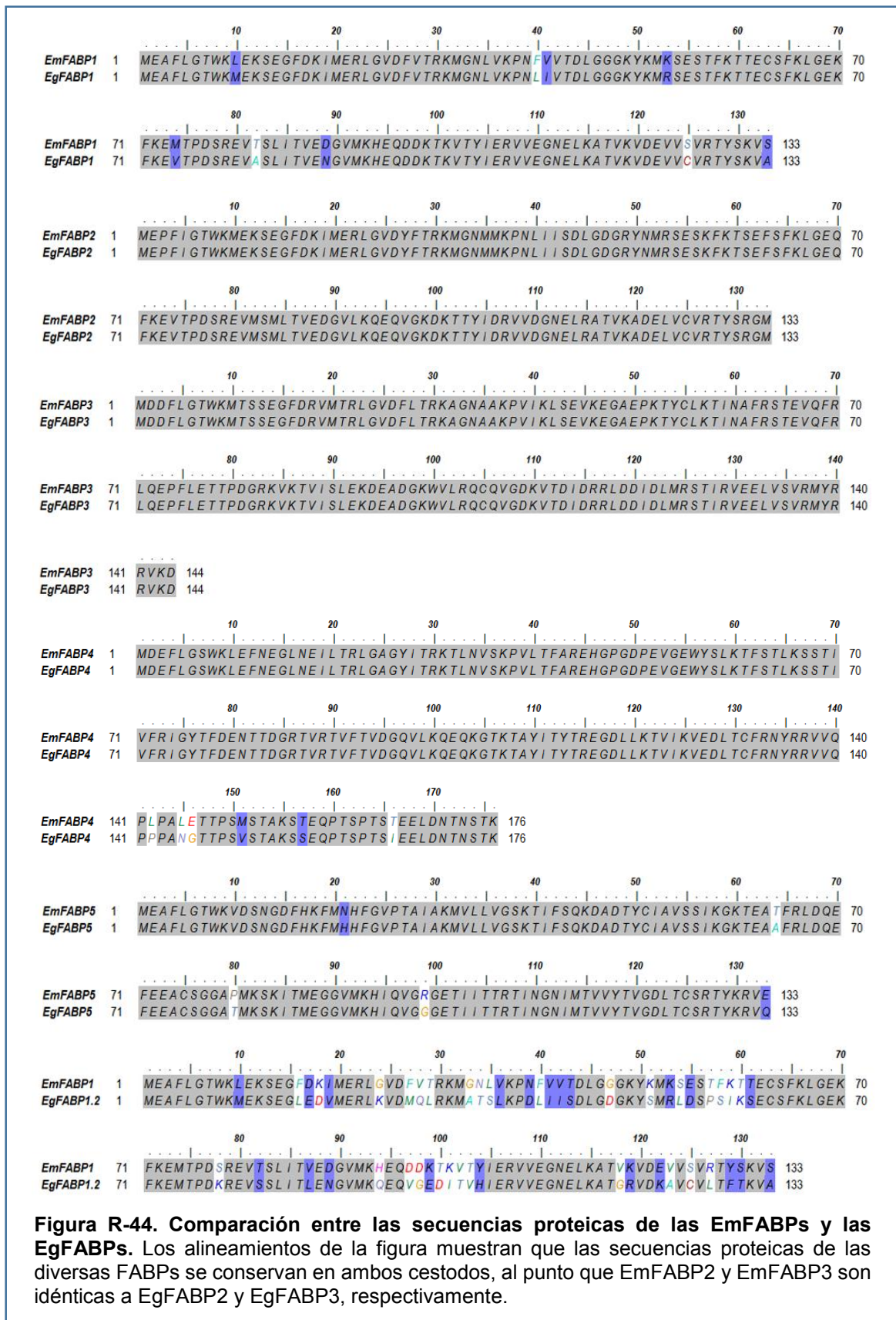
Al analizar las posiciones de los genes en el genoma de *E. granulosus*, se encontró que los genes de EgFABP2, EgFABP1 y EgFABP1.2 se encontraban formando un *cluster*, y ocupando posiciones relativas similares a los de EmFABP2 y ambas copias de EmFABP1 (Ver Figura R-45). Por otra parte, el gen de EgFABP3 se encontró en el mismo *scaffold* (fragmento de cromosoma aún no ensamblado) codificado en la otra hebra, al igual que EmFABP3. La distancia entre el inicio de EgFABP2 y el de EgFABP3 (recordar que está sobre la hebra complementaria) es de 135088pb, mientras que en *E. multilocularis* la distancia equivalente es de 130092pb. Estas cuatro FABPs se encontraron en el *scaffold\_007*, EgFABP4 en el *scaffold\_019* y EgFABP5 en el *scaffold\_009*.

	EmFABP1	EmFABP1 <sup>(b)</sup>	EmFABP2	EmFABP3	EmFABP4	EmFABP5
EgFABP1	92,5%/97,8%	92,5%/97,8%	74,6%/88,8%	23,6%/42,4%	15,9%/27,3%	34,3%/49,3%
EgFABP1.2	62,4%/78,2%	62,4%/78,2%	61,7%/80,4%	20,1%/37,5%	13,6%/25,0%	31,6%/46,7%
EgFABP2	71,4%/87,2%	71,4%/87,2%	100%	24,3%/41,7%	14,8%/26,1%	31,6%/48,9%
EgFABP3	22,9%/41,7%	22,9%/41,7%	24,3%/41,7%	100%	14,8%/33,5%	15,3%/23,6%
EgFABP4	16,5%/27,3%	16,5%/27,3%	14,8%/26,1%	14,8%/33,0%	96,6%/97,7%	9,1%/19,9%
EgFABP5	32,8%/47,8%	32,8%/47,8%	31,3%/48,5%	14,6%/22,2%	8,5%/19,9%	95,5%/97,8%

**Tabla R-9. Análisis de identidad de secuencias entre las FABPs de *E. granulosus* y *E. multilocularis*.** En la tabla se muestran los porcentajes de identidad de secuencia para las diversas FABPs. Los valores en color negro corresponden al porcentaje de identidad de secuencia y los que están en azul, a los porcentajes de similitud. En la diagonal se encuentra la comparación entre ortólogos de *E. granulosus* y *E. multilocularis*.  
(<sup>b</sup>) Corresponde a una de las copias de EmFABP1, que estaría codificada por el gen ortólogo al de EgFABP1.2

Durante el transcurso del presente trabajo de tesis fue publicado un trabajo en el que se realizó un análisis filogenético de diversas FABPs predichas a partir de datos genómicos de diferentes especies (Y. Zheng et al., 2013). En dicho trabajo, se propone la existencia de cinco *loci* correspondientes a genes de FABPs tanto en *E. granulosus* como en *E. multilocularis*. Se destaca que en *E. multilocularis* existen dos *loci* que codifican para una misma FABP, lo que coincide con lo observado y presentado en esta tesis. No obstante, en dicho trabajo se afirma que dos de los genes, en ambas especies, carecen de intrones. El análisis de las secuencias proteicas propuestas en dicho trabajo, y disponibles como material suplementario del mismo, mostró que dichas secuencias equivaldrían a las que hemos nombrado EgFABP3 y EgFABP4 (de *E. granulosus*), y EmFABP3 y EmFABP4 (de *E. multilocularis*). Los cinco *loci* por ellos propuestos serían los correspondientes a las FABPs 1, 2, 3 y 4 de cada cestodo, a lo que se suma una copia de EmFABP1 en el caso de *E. multilocularis* y lo que hemos denominado EgFABP1.2, en el caso de *E. granulosus*. El hecho de que se sostenga en dicho trabajo que las secuencias que codifican para las FABPs 3 y 4 carecen de intrones se debe a que no se

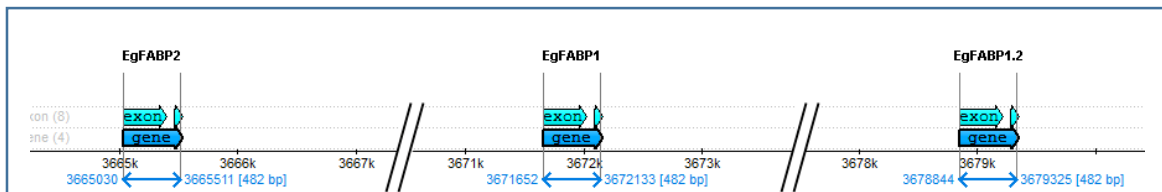
tuvo en cuenta el sitio de *splicing*, y se consideraron codones que, en realidad, forman parte del intrón (Ver Figura R-46). Por otra parte, al evaluar las secuencias propuestas con la herramienta *InterPro*, se observa que aparecen sólo las dos primeras *fingerprints*



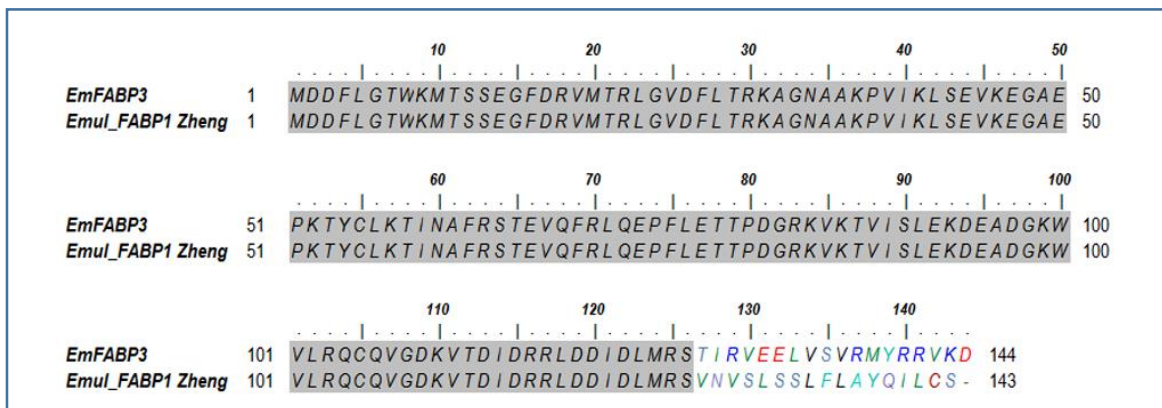
**Figura R-44. Comparación entre las secuencias proteicas de las EmFABPs y las EgFABPs.** Los alineamientos de la figura muestran que las secuencias proteicas de las diversas FABPs se conservan en ambos cestodos, al punto que EmFABP2 y EmFABP3 son idénticas a EgFABP2 y EgFABP3, respectivamente.

correspondientes a la familia de las FABPs, faltando la tercera, que abarca la región entre los aminoácidos 111 y 131 (Ver Figura R-47).

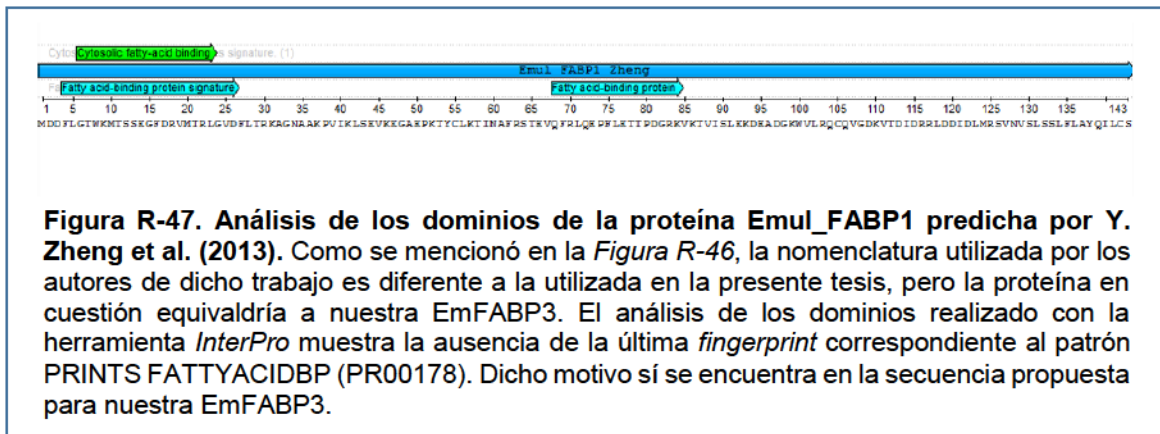
El haber podido clonar las CDS de los genes correspondientes a EmFABP3 y EmFABP4, y que la comparación de dichas CDS con el ADN genómico permita detectar la presencia, en ambos casos, de un intrón que las interrumpe, nos lleva a pensar que las FABPs carentes de intrones predichas por Y. Zheng et al. (2013) serían un artefacto. Cabe destacar también que las secuencias que hemos predicho para EgFABP5 y EmFABP5 (esta última incluso clonada) no han sido reportadas en dicho estudio.



**Figura R-45. Esquema de la posición de los genes *emfabp2*, *emfabp1* y *emfabp1.2* en el scaffold\_007 de la versión “*Egranulosus\_genome\_v3*” del genoma de *E. granulosus*.** Se puede observar que la distribución de los genes es equivalente a la que se presenta en *E. multilocularis*. La distancia entre el comienzo del primer gen y el final del último es de 14296pb en *E. granulosus* y de 13695pb en *E. multilocularis*.



**Figura R-46. Comparación de la secuencia de EmFABP3 con la secuencia equivalente propuesta por Y. Zheng et al. (2013).** A modo de ejemplo, se muestra la comparación de la secuencia de EmFABP3 propuesta en la presente tesis, con la FABP equivalente propuesta por otros autores. Dado que dichos autores utilizaron otra numeración, se agregó el nombre del primer autor del artículo a dichas secuencias para distinguirlas más fácilmente. Como se puede apreciar claramente en la figura, ambas predicciones coinciden en un 100% hasta el aminoácido 126. Cabe destacar que los aminoácidos idénticos en ambas secuencias corresponden a lo codificado en el primer exón (según nuestro modelo) y es luego del codón que codifica el aminoácido 126, justamente, donde comienza el intrón. Situaciones equivalentes se observan al comparar las secuencias de EmFABP4, EgFABP3 y EgFABP4, y las predicciones respectivas de los otros autores.

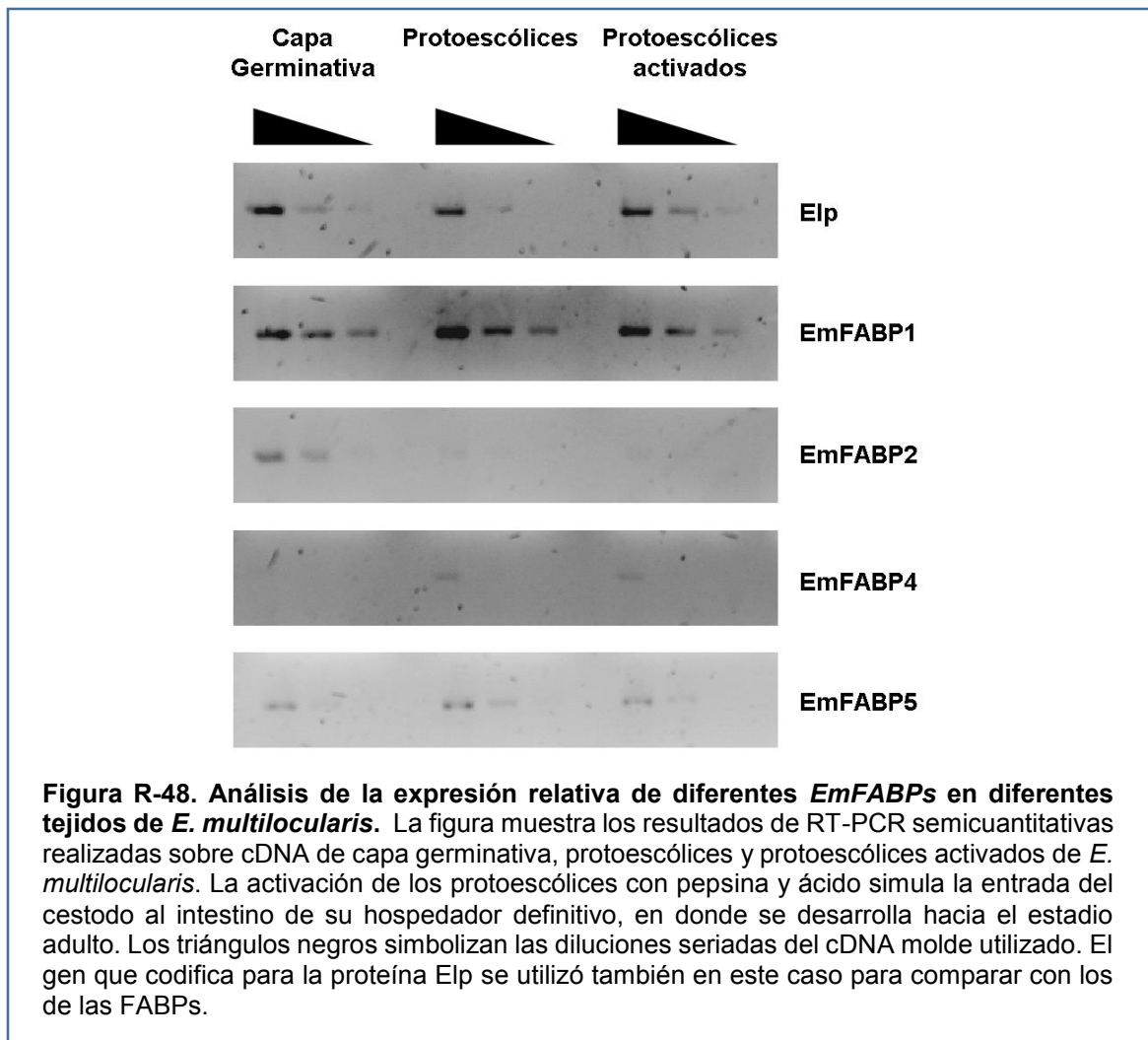


### 3.4.2.5. Análisis de la expresión a nivel transcripcional de FABPs en *E. multilocularis*

Con la intención de obtener algún tipo de información sobre los patrones de expresión de las FABPs de *E. multilocularis* se realizó un ensayo preliminar mediante RT-PCR semicuantitativa. Para ello, se utilizó cDNA de capa germinativa, protoescólices y protoescólices activados por tratamiento con ácido y pepsina (todos pertenecientes al aislamiento GH09) gentilmente cedidos por el Dr. Uriel Koziol (Universidad de Wurzburg, Alemania). Cabe recordar que al momento de realizar estos experimentos, no se contaba con los *primers* para la CDS de EmFABP3, por lo que no fue tenido en cuenta en el mismo.

Como se puede observar en la *Figura R-48*, EmFABP1 y EmFABP5 parecen expresarse tanto en la capa germinativa como en protoescólices de *E. multilocularis*, ya sea que éstos estén activados o no. EmFABP2, por su parte, pareciera expresarse mayormente en la capa germinativa de dicho cestodo, mientras que EmFABP4 pareciera ser exclusiva de los protoescólices. Cabe destacar que la expresión que aquí se analiza es en términos de transcripción de los genes correspondientes, lo cual no asegura que las proteínas respectivas sean traducidas. Por otra parte, como se discutió en la *Introducción* de este trabajo, tanto la capa germinativa como los protoescólices contienen una gran diversidad de tipos celulares, por lo que las diferentes EmFABPs podrían estar expresándose en distintos tejidos o tipos celulares de *E. multilocularis*, de modo análogo a lo que ocurre en otros organismos.

No obstante lo comentado, claramente queda mucho trabajo por hacer en lo referido al análisis de la expresión de las diferentes FABPs en ambos cestodos, en diferentes estadios y tejidos de los mismos. Un análisis de ese tipo podría ayudar a comprender mejor las posibles funciones de estas proteínas, del mismo modo que ha ocurrido en otros organismos.





#### 4. DISCUSIÓN GENERAL

Al introducir el presente trabajo de tesis se planteó como hipótesis general que las FABPs de *Echinococcus* spp. podrían intervenir en el direccionamiento de ácidos grasos hacia las vías de síntesis de fosfolípidos de membrana, necesarios para sostener el crecimiento continuo del metacestodo en los hospedadores intermediarios, así como también de moléculas de señalización que permitan evadir la respuesta inmune de los hospedadores. Asimismo, las FABPs podrían intervenir en la regulación de la plasticidad fenotípica que caracteriza a estos cestodos, por ejemplo, transportando ligandos al núcleo para interactuar con factores de transcripción.

Dentro de esta hipótesis compleja, particularmente nos planteamos analizar la interacción de EgFABP1 con ligandos y membranas fosfolipídicas artificiales, así como ampliar nuestro conocimiento en relación a otras FABPs del género *Echinococcus*, más recientemente descritas.

El análisis de la interacción de EgFABP1 con ligandos fue abordado desde distintos puntos de vista, empleando distintas aproximaciones experimentales. Por un lado, se analizaron los ligandos hidrofóbicos que co-purifican unidos a EgFABP1 cuando la proteína es expresada de manera recombinante en células de *E. coli*. Si bien, como se comentó anteriormente, *E. coli* no es el ambiente natural en el que EgFABP1 se encuentra, nos propusimos analizar qué tipos de ligandos se unían a ella en un entorno complejo, como un citoplasma celular. Es importante remarcar que, aun cuando el contenido del citoplasma de una bacteria pueda diferir del de una célula eucariota como la de *Echinococcus* spp., el mismo es un sistema claramente más complejo que una mezcla generada *in vitro* como puede ser el caso de un ensayo de titulación. A través de dicho ensayo, pudimos observar que EgFABP1 sería capaz de unir únicamente ácidos grasos, al menos dentro del espectro de ligandos disponibles en *E. coli*. Asimismo, dentro de los ácidos grasos unidos a EgFABP1, se pudieron detectar varios ácidos grasos diferentes, tanto saturados como insaturados, coincidiendo en gran medida con lo observado previamente en ensayos de competición *in vitro* (Alvite et al., 2001). Por otra parte, también se realizaron ensayos con el fin de evaluar la posibilidad de que la unión de ligandos indujera cambios conformacionales en EgFABP1. Para ello, se realizaron ensayos de digestión parcial de EgFABP1 en su forma *apo* o unida a diferentes ácidos grasos, y se analizaron los espectros de dicroísmo circular de la proteína en presencia o ausencia de ligandos. Tal como se discutió previamente, si bien a partir de estos experimentos no es posible concluir qué cambios conformacionales sufre EgFABP1 al unirse a los diversos ligandos ensayados, sí fue posible determinar que los efectos producidos por el ácido oleico fueron diferentes a los causados por los otros ácidos grasos. En este sentido, sería interesante analizar la capacidad de EgFABP1 de “activarse” diferencialmente por unión a ciertos

ligandos, efecto que se ha observado para otras proteínas de la familia de las FABPs, como A-FABP, E-FABP y la proteína relacionada, CRABP-II (Armstrong et al., 2014; Gillilan et al., 2007; Sessler & Noy, 2005). Dicha activación se basa en que, estabilizadas por diferentes ligandos, estas proteínas adoptan conformaciones tridimensionales en las que se expone una señal de localización nuclear que permite su translocación al núcleo. Cabe destacar que algunos ligandos que favorecen dicha translocación, activan también a ciertos receptores nucleares de la familia de los PPAR que interactúan específicamente con cada FABP, modulando de este modo la transcripción de genes relacionados, entre otros aspectos, con el metabolismo lipídico, la homeostasis energética y la diferenciación celular (Tan et al., 2002). Estos resultados sugieren que no sería la capacidad de una determinada FABP de unir un ligando lo que determinaría su función, sino el efecto que dicho ligando tenga sobre la proteína. Cabe destacar que estudios *in silico* llevados a cabo por la Dra. Esteves y colaboradores, han señalado al ácido oleico como uno de los ligandos que induciría mayores cambios en la conformación de EgFABP1, comparado con la proteína en su forma *apo*-EgFABP1 (Esteves & Paulino, 2013). Asimismo, en dicho estudio se destaca que el ácido oleico, pero no el ácido palmítico, sería capaz de modificar la posición de la Phe<sup>58</sup>, la cual podría intervenir en la exposición de la señal de localización nuclear, que en EgFABP1 estaría compuesta por Arg<sup>22</sup>, Arg<sup>30</sup> y Lys<sup>31</sup>, de modo análogo a lo que ocurre con A-FABP (Gillilan et al., 2007). Por otra parte, el análisis de las mismas interacciones en un modelo de EgFABP2 no parecen brindar evidencia de tal modificación, al menos con los ligandos ensayados (Esteves & Paulino, 2013). Estas observaciones abren un nuevo panorama, sumamente interesante, en el estudio de las FABPs de *Echinococcus* spp., así como también en el estudio de los posibles roles regulatorios que podrían tener diferentes ligandos hidrofóbicos, mediados por la acción de las FABPs, en el desarrollo y diferenciación de las células de estos cestodos.

Por otra parte, a partir de los ensayos de transferencia de ligandos fluorescentes a membranas fosfolipídicas, se pudo establecer que EgFABP1 transfiere los ácidos grasos a través de un mecanismo de tipo colisional. Como se discutió al presentar dichos resultados, el mecanismo de transferencia de tipo colisional es un modelo que plantea que la FABP debe tener contacto directo con la membrana fosfolipídica para ceder el ligando que transporta. Si bien se trata de un modelo sumamente simplificado, ya que las membranas biológicas son mucho más complejas que una bicapa fosfolipídica de composición uniforme, estos experimentos han sido muy utilizados en la caracterización de las FABPs y proteínas relacionadas. De hecho, ha sido en gran parte gracias a estos experimentos que se pudo establecer la importancia de la región portal de las FABPs, siendo ésta la zona que determina en gran medida las características funcionales de cada una de las diferentes proteínas de la familia. Estudios posteriores han determinado que, efectivamente, es en dicha región donde se encuentran sitios de interacción con otras proteínas, donde se producen cambios



conformacionales importantes para la funcionalidad de las FABPs, etc. (Storch & Córscico, 2008; Storch & McDermott, 2009; Storch & Thumser, 2010). Asimismo, la capacidad de EgFABP1 de interactuar con membranas deja abierta la posibilidad de que a través de dicha interacción pueda retirar ácidos grasos de ciertas membranas (o subdominios de membrana) celulares para dirigirlos hacia otras localizaciones o vías metabólicas. Debe remarcar, no obstante, que dicha interacción podría no darse directamente entre EgFABP1 y los fosfolípidos de las membranas, sino que podría estar mediada por la interacción con alguna otra proteína, sobre todo si se tienen en cuenta los modelos más actuales de las membranas celulares que proponen que las mismas poseen una estructura altamente poblada de proteínas que interactúan con determinados dominios lipídicos, con proteínas del citoesqueleto y/o componentes de la matriz extracelular (Nicolson, 2014).

Otro aspecto que fue abordado en el estudio de las FABPs de *Echinococcus* spp. en el presente trabajo, radicó en la búsqueda de los genes ortólogos a *egfabp1* y *egfabp2* de *E. granulosus* en el genoma de *E. multilocularis*, así como en la identificación de nuevos genes de la familia en ambos cestodos. Estos análisis fueron posibles gracias a la reciente publicación de los genomas de *E. granulosus* y *E. multilocularis* (Tsai et al., 2013; H. Zheng et al., 2013). Los resultados obtenidos han arrojado datos muy interesantes en lo que respecta a la familia de las FABPs del género *Echinococcus*. Por un lado, se encontró que *E. multilocularis* no sólo posee genes ortólogos a los que codifican para las proteínas EgFABP1 y EgFABP2 de *E. granulosus*, sino que ambos cestodos poseen varios genes más pertenecientes a esta familia de proteínas. La alta similitud entre ortólogos de ambas especies y la conservación de la ubicación relativa de los genes en los genomas de ambos cestodos conduce a pensar que la familia de FABPs del género *Echinococcus* se habría generado antes de la especiación de *E. granulosus* y *E. multilocularis*. Una observación muy llamativa derivada de los análisis de los datos genómicos es el hecho de que en *E. multilocularis* existan dos copias iguales de un mismo gen (*emfabp1*), mientras que en *E. granulosus* una de dichas copias se haya diferenciado de la otra (*egfabp1* y *egfabp1.2*). Existen diferentes modelos que intentan explicar cómo surgen nuevos genes con nuevas funciones a lo largo de la evolución (Conant & Wolfe, 2008). Gran parte de ellos toman como base para la aparición de nuevos genes la duplicación de genes preexistentes. De ese modo, una vez presentes dos copias del gen en cuestión, las mismas pueden sufrir mutaciones que permitan el surgimiento de nuevas funciones (*neofuncionalización*), o que favorezcan ciertas funciones, preexistentes en el gen original, en cada una de las copias (*subfuncionalización*) dando como resultado dos genes, cada uno con una función optimizada del gen original. Por otro lado, pueden también conservarse ambas copias, de modo de aumentar el dosaje del gen en cuestión, si es que ello brinda alguna ventaja adaptativa (Conant & Wolfe, 2008). Teniendo esto en cuenta, y si efectivamente las FABPs del género *Echinococcus* estuvieran involucradas en el

direccionamiento de ácidos grasos a vías de síntesis de fosfolípidos y otros compuestos para sostener el crecimiento continuo del metacestodo, se podría especular que el aumento en el dosaje de EmFABP1 en *E. multilocularis* podría estar relacionado con el crecimiento mucho más rápido del metacestodo de dicho parásito, comparado con el de *E. granulosus*. Por otra parte, las variaciones observadas en una de las copias del gen ortólogo a *emfabp1* en *E. granulosus*, podría significar la adquisición de nuevas funciones por parte de dicho gen. Existe también la posibilidad de que el gen que hemos denominado *egfabp1.2* pudiera ser un pseudogen, aunque hay alguna evidencia obtenida de datos transcriptómicos que indicarían que dicho gen se transcribe en protoescólices de *E. granulosus* (Tsai et al., 2013; H. Zheng et al., 2013).

Por otra parte, como se indicó en la *Tabla R-4*, al comparar la secuencia de EmFABP3 con las bases de datos de proteínas del NCBI mediante *BLASTP* se encontró que la secuencia a la que más se asemeja (excluyendo las del género *Echinococcus*) es la de una proteína que une ácidos grasos y retinol de *T. solium*. Si bien se ha determinado experimentalmente que dicha proteína de *T. solium* es capaz de unir retinol (Kim et al., 2012), la denominación de la misma como *fatty acid and retinol binding protein* puede conducir a confusiones, ya que dicha denominación se ha asignado a una familia de proteínas exclusivas de nematodos, ricas en  $\alpha$ -hélices y no relacionadas con las FABPs (Garofalo et al., 2002; Prior et al., 2001). Por otra parte, se cree que la subfamilia de las CRBPs/CRABPs ha surgido en la evolución luego de la separación entre vertebrados e invertebrados, por lo que tampoco corresponderían, *a priori*, a dicho grupo (Esteves & Ehrlich, 2006; Folli et al., 2005; Schaap et al., 2002). Asimismo, se ha reportado que FABPs tales como A-FABP, mP2 y E-FABP, a las cuales se asemejan principalmente las FABPs de *Echinococcus* spp. aquí descritas, son capaces de unir retinoides (Schaap et al., 2002). De acuerdo a lo expuesto, sería recomendable seguir considerando a EmFABP3 y EgFABP3 como miembros de la familia de las FABPs; salvo que futuras caracterizaciones sugieran que pertenecen a otra familia (o subfamilia) de proteínas de unión a lípidos.

La evidencia recolectada, que indica la existencia de varios miembros de la familia de las FABPs en *Echinococcus* spp., pone de relieve la importancia que estas proteínas podrían tener en estos cestodos y modifica parcialmente la visión que se tenía acerca de estas proteínas en invertebrados. El hecho de que gran parte de las FABPs descubiertas en invertebrados se asemejaran mayormente a las FABPs de vertebrados de un mismo grupo (el que incluye a H-FABP, A-FABP, mP2, etc.) y que existiera sólo una o dos proteínas de la familia por especie, habían sugerido que tal vez una única FABP, menos específica en su unión a ligandos y más promiscua en cuanto a las interacciones con otras proteínas, podría ser capaz de llevar a cabo todas las funciones que en vertebrados se han asignado a las diferentes FABPs (Esteves & Ehrlich, 2006). El panorama actual, que indicaría que habría al

menos cinco FABPs diferentes en *E. multilocularis* y seis en *E. granulosus*, hace pensar que cada una de ellas tendría diferentes roles y/o se podría expresar en diferentes tipos celulares o estadios de estos organismos. Asimismo, como se ha mencionado previamente, algunas de ellas poseen ciertas variaciones en algunos de los aminoácidos que constituyen el motivo P2 de unión a ligandos, lo que indicaría que las mismas podrían ser capaces de unir otro tipo de compuestos hidrofóbicos y no necesariamente (o únicamente) ácidos grasos; o bien, que unirían a sus ligandos de otra manera. Los datos de RNA-seq obtenidos por Tsai et al. (2013) indican que todas las FABPs aquí descritas, a excepción de EmFABP5 y EgFABP5 que no fueron anotadas en dicho genoma, se expresarían (en menor o mayor medida) en metacestodos y adultos de *E. multilocularis* y en protoescólices de *E. granulosus*.

Por otra parte, los datos transcriptómicos de *E. granulosus* publicados junto al genoma de dicho organismo por H. Zheng et al. (2013) brindan mayor información en relación a la expresión de las FABPs de *E. granulosus* en distintos estadios. En ese caso, se han predicho las seis variantes de FABPs presentadas en este trabajo, aunque la proteína homóloga a EgFABP1 se presenta truncada (a pesar de haber sido la primera en ser descubierta y la mejor caracterizada) y la correspondiente a la EgFABP5 presenta una variación, aparentemente debida a la predicción diferente del sitio de *splicing*. Si bien EgFABP5 aún debe ser clonada, es muy posible que sus sitios de *splicing* se correspondan a los determinados a partir del clonado de la CDS para EmFABP5, dada la alta similitud que presentan estas secuencias entre *E. granulosus* y *E. multilocularis*. Sin embargo, no obstante las diferencias planteadas, se puede observar a partir de los datos transcriptómicos que todas las EgFABPs se expresan en al menos un estadio de *E. granulosus*. En particular, EgFABP5 se expresaría solo en adultos y oncosfera, mientras que EgFABP2 y EgFABP4 se expresarían en todos los estadios salvo en la oncosfera. Por otra parte, se observa que en adulto aumentaría significativamente la expresión de EgFABP1.2, EgFABP2 y EgFABP4 con respecto a los otros estadios, mientras que EgFABP1 disminuiría su expresión en la oncosfera con respecto a los demás estadios. Dichas diferencias de expresión, no obstante, se analizaron a nivel de mRNA, por lo que se debe tener en cuenta que a nivel proteico podría haber variaciones, si es que hubiera mecanismos post-transcripcionales de regulación de la expresión. A nivel proteico, existe evidencia obtenida a partir de análisis proteómicos de que EgFABP3, aparte de EgFABP1, se expresaría en protoescólices de *E. granulosus* (Lic. Maite Folle, UdelaR, Montevideo; *comunicación personal*).

Cabe destacar que un análisis más profundo de la expresión de las FABPs podría determinar a qué se debe el aumento de la expresión de alguna de ellas en determinados estadios. Este aumento podría deberse a una inducción de la transcripción en células o tejidos preexistentes y/o a la diferenciación celular hacia nuevos tejidos. Asimismo, dicha información podría contribuir a la comprensión de las funciones de estas proteínas.



## 5. CONCLUSIONES

A continuación se resumen los datos obtenidos a partir del presente trabajo:

- Se subclonó la secuencia codificante de la proteína EgFABP1 a un plásmido con un mayor control de la expresión
- Se mejoró el protocolo de deslipidización de EgFABP1
- Se confirmó que EgFABP1 es capaz de unir ácidos grasos de diversa longitud de cadena y grado de insaturación
- Se observó que la unión de ligandos induce diferentes cambios conformacionales en EgFABP1 dependiendo del ácido graso unido
- Se caracterizó el mecanismo de transferencia de análogos de ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas artificiales, determinándose un mecanismo de tipo colisional
- Se analizó la presencia de varios genes de la familia de las FABPs tanto en *E. granulosus* como en *E. multilocularis*
- Se clonaron las secuencias codificantes de las cinco FABPs encontradas en *E. multilocularis*
- Se intentó silenciar la expresión de EmFABP1 y EmFABP2 en cultivos de células primarias de *E. multilocularis* empleando la tecnología de interferencia de ARN por siRNAs
- Se realizaron estudios preliminares de expresión a nivel transcripcional de las FABPs de *E. multilocularis* en distintos estadios parasitarios

En conjunto, los resultados aquí presentados amplían el conocimiento en relación no sólo a las características funcionales de EgFABP1 sino al panorama actual en relación a la familia de las FABPs en organismos invertebrados, y en particular, en cestodos del género *Echinococcus*, habiéndose encontrado interesantes diferencias entre las dos principales especies de dicho género.



## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como se desprende de lo presentado en esta tesis, la investigación en el campo de las FABPs es un área en la que resta mucho por descubrir. Más aún cuando se trata de organismos tales como *Echinococcus* spp. cuyo metabolismo se conoce tan poco, y cuyo impacto en la salud pública y la ganadería son tan importantes. A continuación se plantean algunos aspectos que sería interesante abarcar en futuras investigaciones tendientes a ampliar el conocimiento del rol de las FABPs en la biología y metabolismo de *Echinococcus* spp.:

- Subclonar y expresar las FABPs recombinantes de *E. multilocularis* y *E. granulosus*
- Caracterizar sus propiedades de interacción con ligandos y membranas, con la finalidad de poder clasificarlas en subgrupos de modo análogo a lo realizado para las FABPs de mamíferos
- Generar herramientas tales como anticuerpos y sondas específicas para cada proteína o mRNA de forma de poder profundizar en el conocimiento de los patrones de expresión de las diferentes FABPs tanto en diferentes estadios como tipos celulares, en *E. granulosus* y *E. multilocularis*
- Evaluar el comportamiento de las distintas FABPs en respuesta a diferentes ligandos, ya sea desde el punto de vista conformacional, como de localización intracelular
- Evaluar la capacidad de unión a inhibidores de FABPs por parte de estas proteínas y determinar el efecto que ello pudiera tener en la sobrevivencia y desarrollo de los parásitos; basándose en datos previos obtenidos para otras FABPs de estructura similar, como A-FABP (Cai et al., 2015; Chen et al., 2014; Hertz et al., 2009; Wang et al., 2015, 2014)
- Profundizar en los ensayos de silenciamiento de las FABPs como una estrategia adicional para esclarecer el rol que cumplen estas proteínas en *Echinococcus* spp.





## 7. APÉNDICES

### 7.1. Listado de primers y siRNAs

#### 7.1.1. Primers

Los parámetros tabulados (N, número de bases; %GC; y  $T_M$ , temperatura de *melting*, o fusión) fueron calculados empleando la herramienta *OligoCalc*, disponible en <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	N	%GC	$T_M$ (°C)
EgFABP1-Fw <sup>(a)</sup>	GAG <b>CATATG</b> GAGGCATTCCTTGGTACCT	28	50	61,4
EgFABP1-Rv <sup>(b)</sup>	GTT <b>GGATCC</b> <u>GAATT</u> CCTTACGCCACCTTTG	29	48	61,5
EmFABP1-CDS-Fw	ATGGAGGCGTTCCTCGGTA	19	58	53,2
EmFABP1-CDS-Rv	TTACGACACCTTTGAGTAGGTTC	23	43	53,5
EmFABP2-CDS-Fw	ATGGAGCCATTCATCGGTA	19	47	48,9
EmFABP2-CDS-Rv	TTACATCCCTCTTGAGTAGGTTCG	24	46	55,7
EmFABP3-CDS-Fw	ATGGATGACTTTCTGGGCACCT	22	50	54,8
EmFABP3-CDS-Rv	TCAGTCCTTTACTCGACGATACA	23	43	53,5
EmFABP4-CDS-Fw	ATGGATGAATTTCTGGGATCCTG	23	43	53,5
EmFABP4-CDS-Rv	TTATTTTGTCTGAATTAGTATTATCCAA	27	22	49,1
EmFABP5-CDS-Fw	ATGGAGGCATTCCTAGGCAC	20	55	53,8
EmFABP5-CDS-Rv	CTACTCCACTCGTTTGTAAGTT	22	41	51,1
Elp-Fw	AATAAGGTCAGGGTGACTAC	20	45	49,7
Elp-Rv	TTGCTGGTAATCAGTCGATC	20	45	49,7

<sup>(a)</sup> La secuencia resaltada en el *primer* EgFABP1-Fw corresponde al sitio de corte de la enzima *NdeI*.

<sup>(b)</sup> El sitio resaltado en el *primer* EgFABP1-Rv es el de *BamHI*, y el subrayado, el de *EcoRI*.

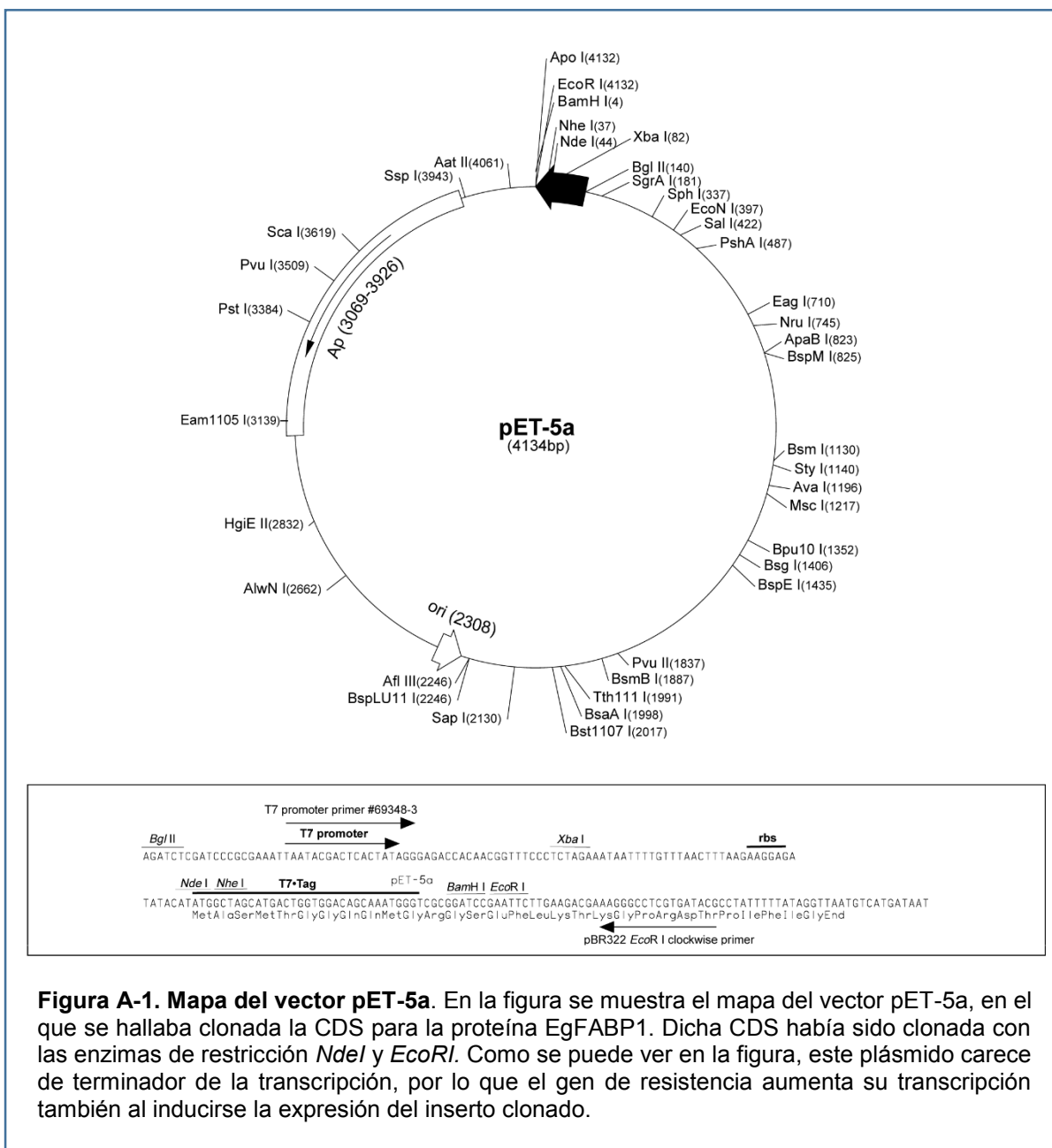
### 7.1.2. siRNAs

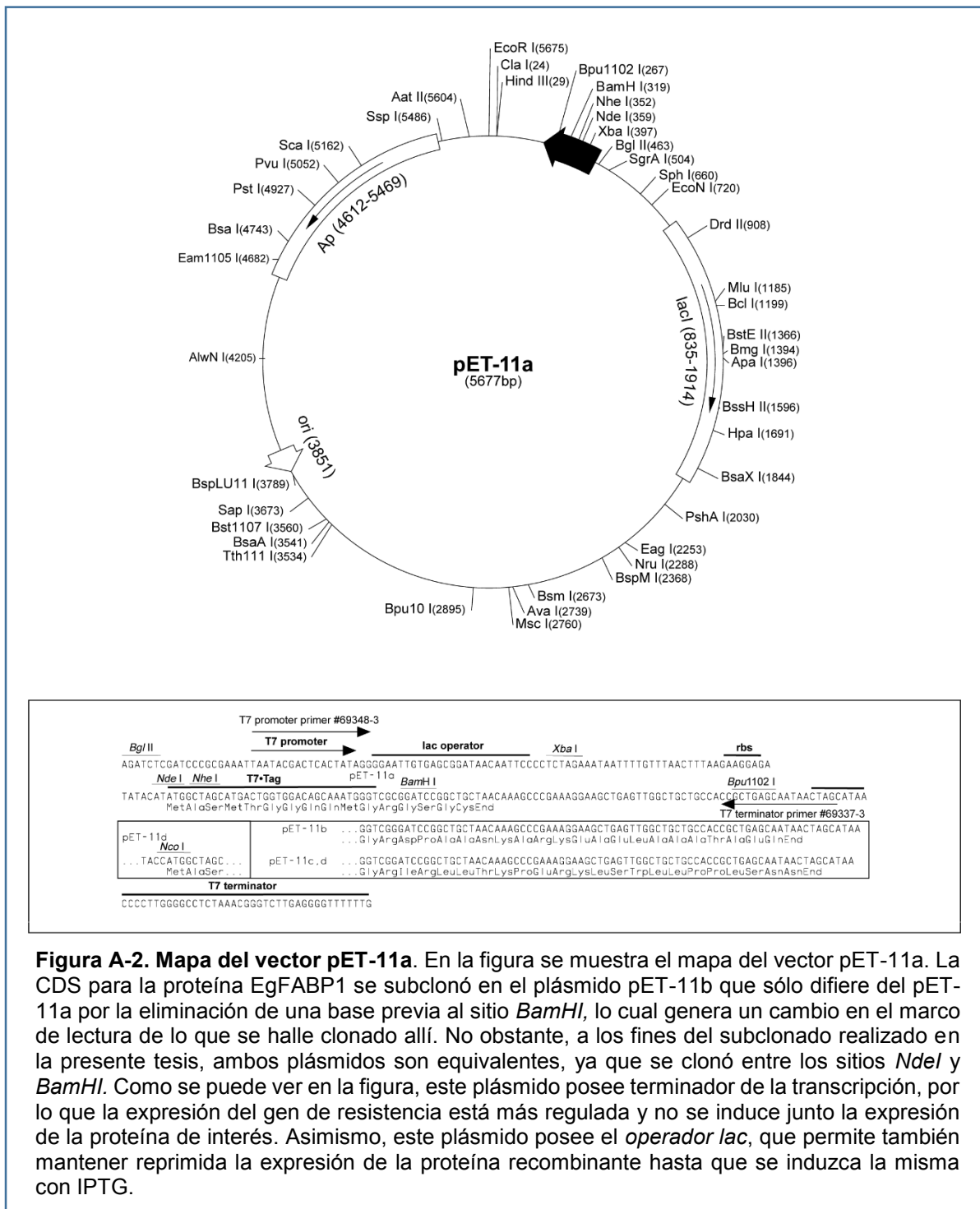
Los parámetros tabulados (N, %GC y  $T_M$ ) corresponden a los datos provistos por el fabricante de los siRNAs (*Sigma Aldrich*).

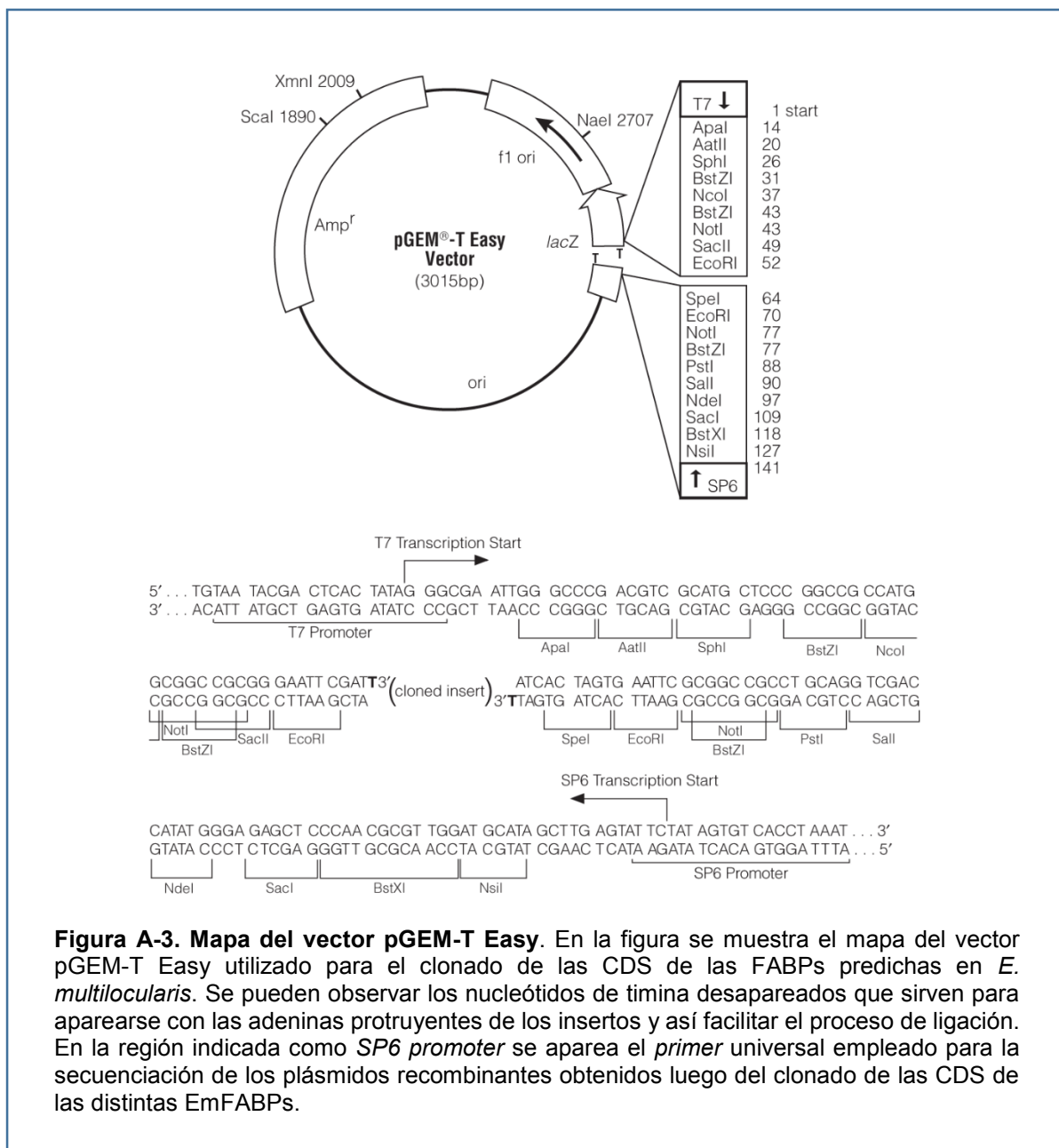
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia <sup>(a)</sup></b>	<b>N</b>	<b>%GC</b>	<b><math>T_M</math></b>
siRNA-gfp	5'-ACAUGAAGCAGCACGACUUCUUC-3'	23	47,8	62,3
siRNA-emfabp1	5'-AUUUGGUUAAACCCAACUUCGUA-3'	23	34,7	57,1
siRNA-emfabp2	5'-CGAUCUGGGUGAUGGCAGGUAUA-3'	23	52,1	65,6

<sup>(a)</sup> Sólo se transcribe la secuencia de la hebra correspondiente a la hebra codificante de cada gen.

## 7.2. Plásmidos empleados



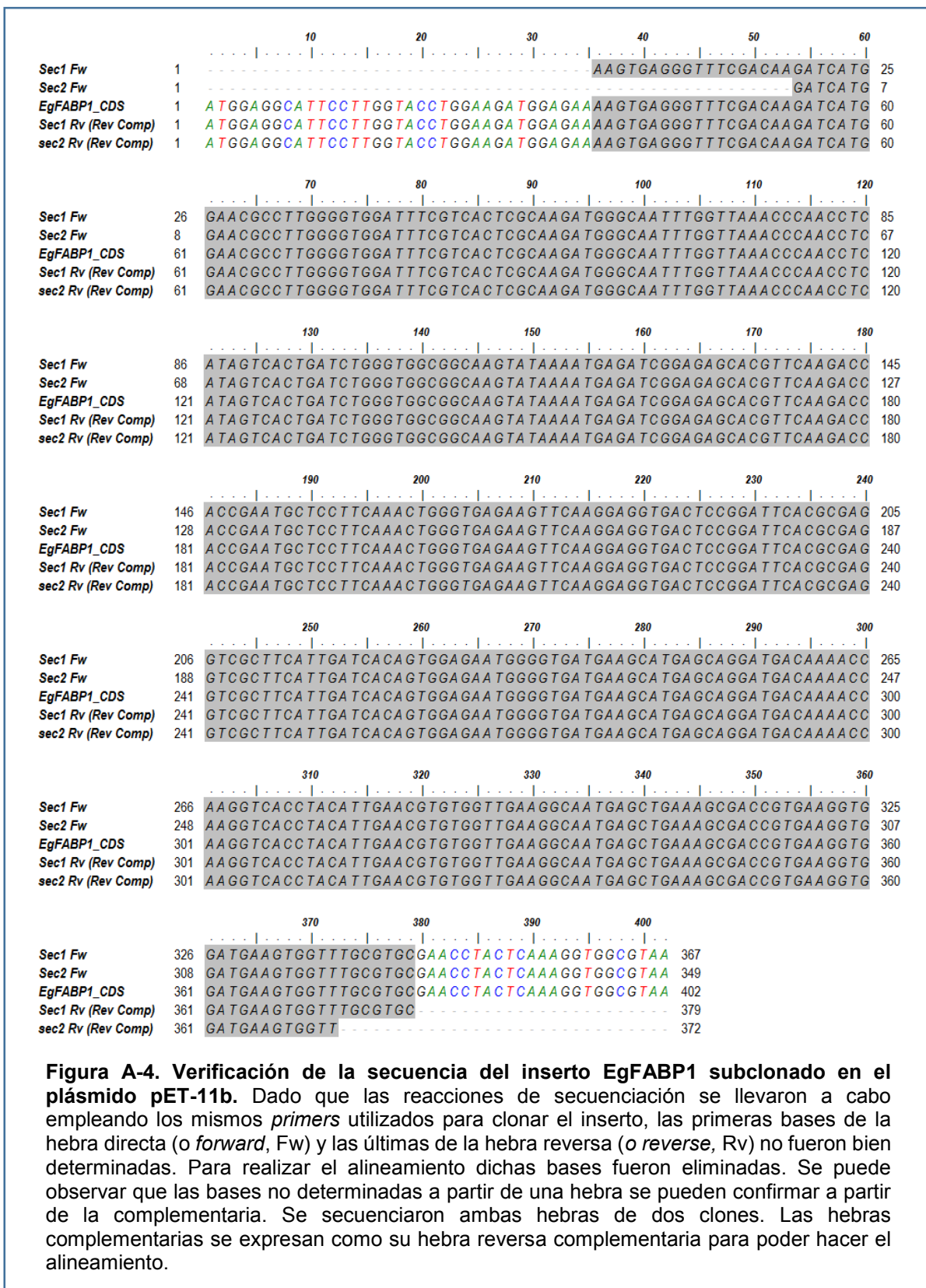




**Figura A-3. Mapa del vector pGEM-T Easy.** En la figura se muestra el mapa del vector pGEM-T Easy utilizado para el clonado de las CDS de las FABPs predichas en *E. multilocularis*. Se pueden observar los nucleótidos de timina desapareados que sirven para aparearse con las adeninas protruídas de los insertos y así facilitar el proceso de ligación. En la región indicada como *SP6 promoter* se aparee el *primer* universal empleado para la secuenciación de los plásmidos recombinantes obtenidos luego del clonado de las CDS de las distintas EmFABPs.

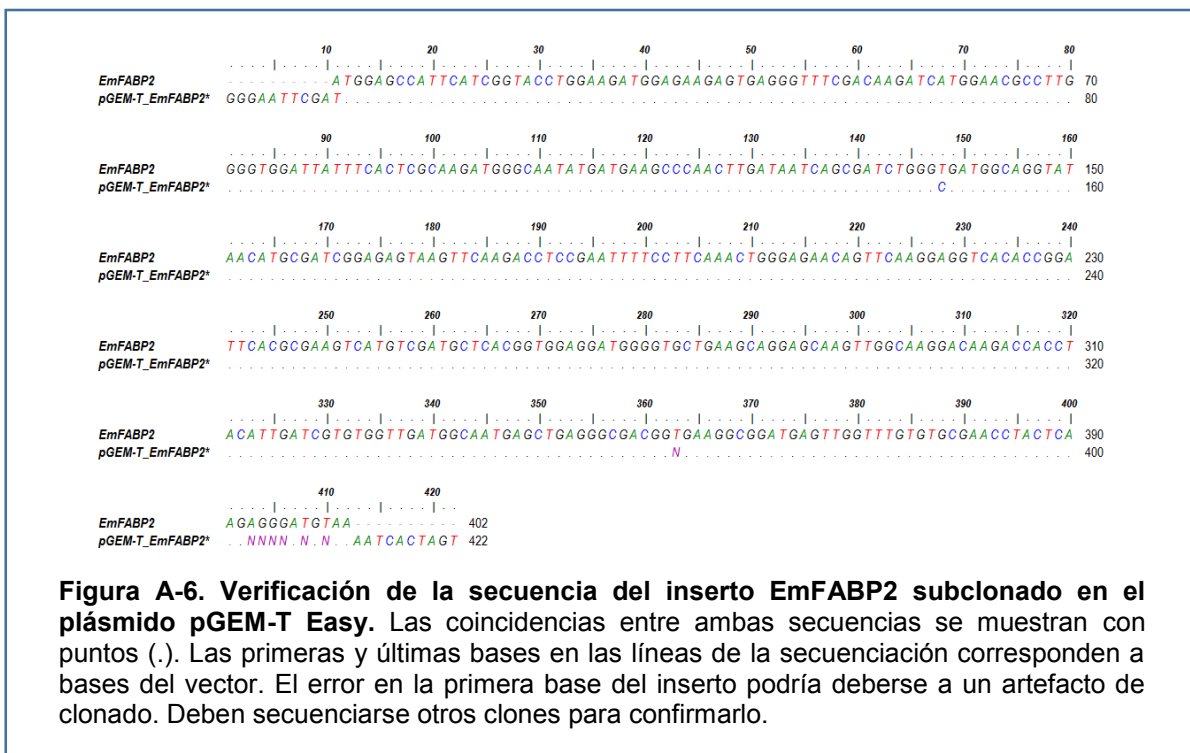
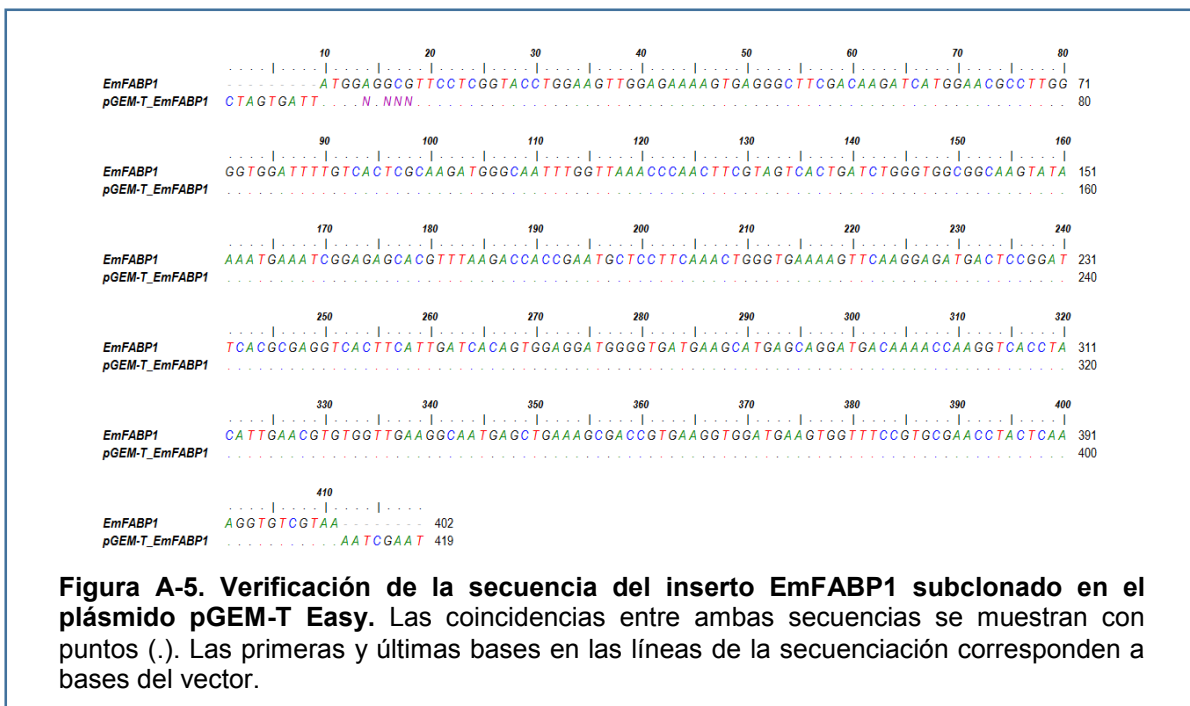
### 7.3. Verificación de secuencias clonadas

#### 7.3.1. Inserto de EgFABP1 subclonado en pET-11b

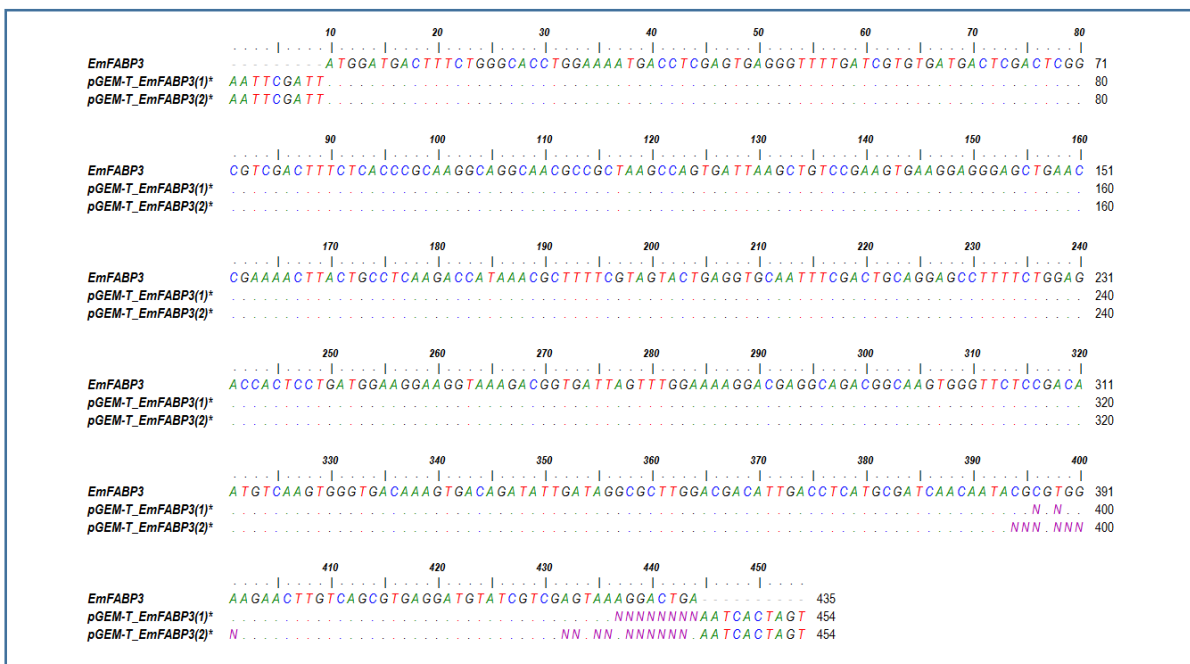


**Figura A-4. Verificación de la secuencia del inserto EgFABP1 subclonado en el plásmido pET-11b.** Dado que las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo empleando los mismos *primers* utilizados para clonar el inserto, las primeras bases de la hebra directa (o *forward*, Fw) y las últimas de la hebra reversa (o *reverse*, Rv) no fueron bien determinadas. Para realizar el alineamiento dichas bases fueron eliminadas. Se puede observar que las bases no determinadas a partir de una hebra se pueden confirmar a partir de la complementaria. Se secuenciaron ambas hebras de dos clones. Las hebras complementarias se expresan como su hebra reversa complementaria para poder hacer el alineamiento.

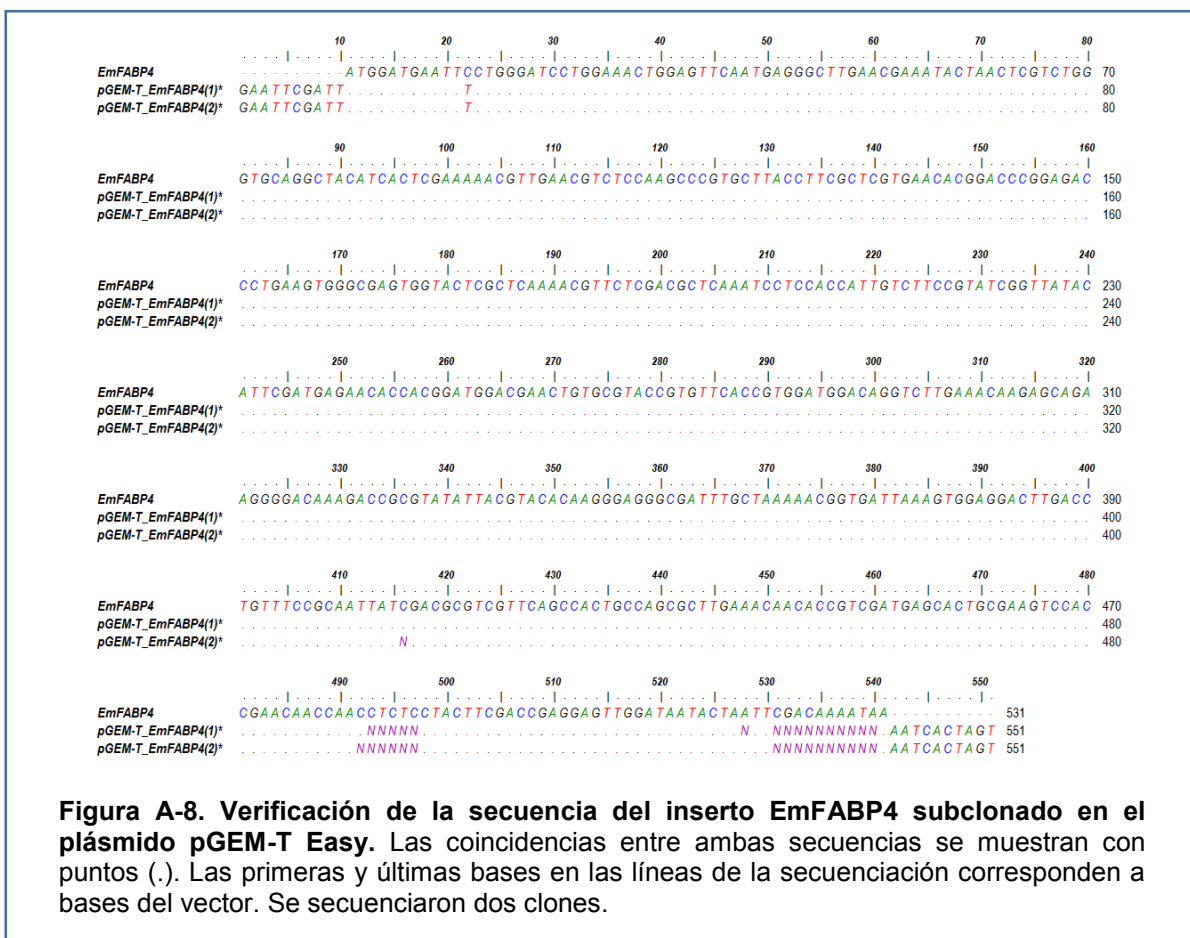
### 7.3.2. EmFABPs clonadas en pGEM-T



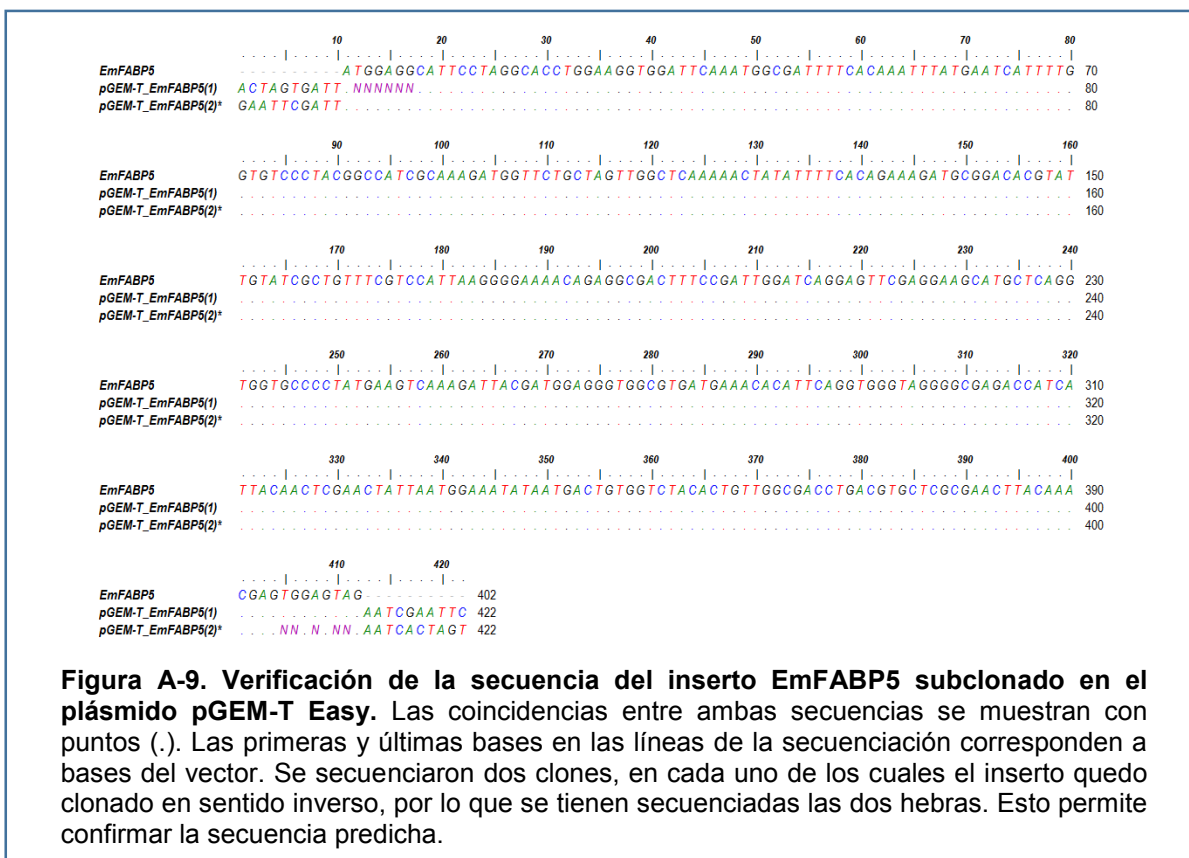




**Figura A-7. Verificación de la secuencia del inserto EmFABP3 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy.** Las coincidencias entre ambas secuencias se muestran con puntos (.). Las primeras y últimas bases en las líneas de la secuenciación corresponden a bases del vector. Se secuenciaron dos clones.



**Figura A-8. Verificación de la secuencia del inserto EmFABP4 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy.** Las coincidencias entre ambas secuencias se muestran con puntos (.). Las primeras y últimas bases en las líneas de la secuenciación corresponden a bases del vector. Se secuenciaron dos clones.



**Figura A-9. Verificación de la secuencia del inserto EmFABP5 subclonado en el plásmido pGEM-T Easy.** Las coincidencias entre ambas secuencias se muestran con puntos (.). Las primeras y últimas bases en las líneas de la secuenciación corresponden a bases del vector. Se secuenciaron dos clones, en cada uno de los cuales el inserto quedó clonado en sentido inverso, por lo que se tienen secuenciadas las dos hebras. Esto permite confirmar la secuencia predicha.

## 7.4. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales $\alpha$ -EgFABP1

### 7.4.1. Materiales y métodos empleados

#### 7.4.1.1. Inmunización y obtención de los sueros

Para la generación de los anticuerpos  $\alpha$ -EgFABP1 se contó con la colaboración del personal de la Cátedra de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Brevemente, el protocolo consistió en inocular tres conejos de aproximadamente 1,9 kg de peso con 500 $\mu$ g de EgFABP1 recombinante en Adyuvante Completo de Freund (*Sigma Aldrich*). Para la preparación de la mezcla a inocular se colocó el Adyuvante Completo de Freund en un tubo y luego se le agregó un volumen de la solución de EgFABP1 agitando exhaustivamente en *vortex*, de modo de generar una emulsión. Con la finalidad de evaluar la respuesta inmune de los conejos contra la proteína inoculada se extrajeron muestras de sangre aproximadamente un mes y medio después de la inoculación, y luego se realizaron varias extracciones por un plazo de cuatro meses. También se colectaron muestras de un conejo control, no inmunizado. El título de anticuerpos  $\alpha$ -EgFABP1 en suero se determinó por ELISA (*Ver ítem siguiente*). Pasados los cuatro meses post-inoculación, los conejos fueron sangrados “a blanco”. Para la obtención de los sueros a partir de las muestras de sangre, se incubó a esta última durante una hora a 37°C en tubos de centrifuga tipo *Falcon*, seguido de una incubación *ON* a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 3000rpm durante 5 min a 4°C empleando una centrifuga refrigerada *Avanti JE*. Se separaron los sueros, se alicuotaron, y se conservaron a -20°C hasta su posterior uso.

#### 7.4.1.2. Determinación del título del antisuero por ELISA

La determinación del título de anticuerpos de los sueros se determinó empleando un enzimoimmunoensayo, o ELISA (del inglés de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para los ELISAs se emplearon placas *MaxiSorp*<sup>®</sup> de 96 pocillos, de fondo plano (*Nunc*). La sensibilización se llevó a cabo incubando las placas con 100 $\mu$ l/pocillo de una solución de EgFABP1 (5 $\mu$ g/ml en *buffer* PBS) a 4°C, *ON*. Seguidamente, se bloquearon las placas agregándoles 200 $\mu$ l/pocillo de PBS-Leche (*buffer* PBS + 2% leche en polvo descremada) e incubándolas 1 hora a 37°C. Luego, se lavaron exhaustivamente con PBS-Tween (*buffer* PBS + 0,05% Tween 20). Posteriormente, se sembraron 100 $\mu$ l/pocillo de diluciones seriadas del suero en PBS-Leche, y se incubó durante 2 horas a 37°C. Luego de varios lavados (al menos

cinco) con PBS-Tween, se agregaron 100µl/pocillo de un anticuerpo de cabra α-IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (*Sigma Aldrich*), diluido en PBS-Leche. Dicha mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C, y luego se lavó nuevamente con PBS-Tween. Para el revelado, se emplearon 100µl/pocillo de una solución conteniendo 0,1mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, o TMB (*Sigma Aldrich*); y 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *buffer* fosfato/citrato (pH 5). El TMB se incorporó a partir de un *stock* fresco de 10mg/ml TMB en ácido acético al 50%. La placa, conteniendo el sustrato, se incubó durante 30min a temperatura ambiente, y protegida de la luz. La reacción se detuvo agregando 50µl/pocillo de 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finalmente, se registró la absorbancia a 450nm empleando un lector de placas *DTX 880* (*Beckman Coulter*). Dicha absorbancia se corrigió con la absorbancia a 595nm.

#### 7.4.1.3. Caracterización del antisuero por *Western-Blot*

La caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos según se describió en el ítem 7.4.1 se llevó a cabo por *Western-Blot*. Para ello, se utilizaron muestras de EgFABP1 recombinante purificada, protoescólicas de *E. granulosus*, y *screenings* de expresión de EgFABP1 y EgFABP2 recombinantes. Para los *Western-Blots* se realizaron, previamente, SDS-PAGE conteniendo diferentes muestras: varias concentraciones de EgFABP1 recombinante; 5µl de una suspensión de protoescólicas de *E. granulosus* hervidos en el *buffer de siembra* descrito en el ítem 2.1.2.2; o las proteínas provenientes de *screenings* de expresión realizados en *E. coli* BL21(DE3) conteniendo los plásmidos *pET-11b-egfabp1* o *pET-5a-egfabp2*, tal como se describió en el ítem 2.1.2.1. Como marcador de peso molecular para la electroforesis, y como control de la transferencia, se empleó el marcador coloreado *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (*GE Healthcare Life Sciences*). Una vez llevada a cabo la electroforesis de las muestras, se realizó la transferencia de las mismas a membranas de fluoruro de polivinilideno (*Pierce*), o PVDF por sus siglas en inglés, empleando un equipo de transferencia húmeda *Mini Trans-Blot* (*BioRad*). El *buffer de transferencia* utilizado fue 25mM Tris-HCl, 192mM Glicina, 20% Metanol, pH 8,3. La transferencia se realizó a 100V durante una hora. Seguidamente, se bloquearon las membranas incubándolas ON a 4°C con solución de bloqueo 5%: 5g de BSA (*Sigma Aldrich*) en *buffer* PBS-Tween. Al día siguiente, se incubaron las membranas durante una hora a temperatura ambiente con una dilución 1:25000 del suero α-EgFABP1 (preparada en solución de BSA al 1% preparada en *buffer* PBS-Tween). Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con *buffer* PBS-Tween, y luego se realizó una incubación de una hora con una dilución 1:5000 (preparada de igual modo que la del anticuerpo primario) de anticuerpos de cabra, α-conejo, conjugados a peroxidasa (*Sigma Aldrich*). Seguidamente, se repitieron los lavados con *buffer* PBS-Tween. Para el revelado se empleó el reactivo *SuperSignal West Pico Chemiluminescent*

*Substrate* (Pierce) según las indicaciones del fabricante. El registro de los resultados se llevó a cabo empleando un equipo de digitalización de imágenes *ImageQuant 350* (GE Healthcare Life Sciences). Durante mi estadía en el laboratorio del Dr. Brehm se evaluó también la respuesta de los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -EgFABP1 frente a muestras de *E. multilocularis*. Para ello, se separaron por SDS-PAGE 2,5 $\mu$ g de proteínas de un extracto de células en cultivo de *E. multilocularis* y se sometieron a *Western Blot*, revelando con los anticuerpos  $\alpha$ -EgFABP1 (el procedimiento se detalla en el ítem 2.4.5.2, aunque no difiere demasiado de lo antes descrito).

## 7.4.2. Resultados obtenidos

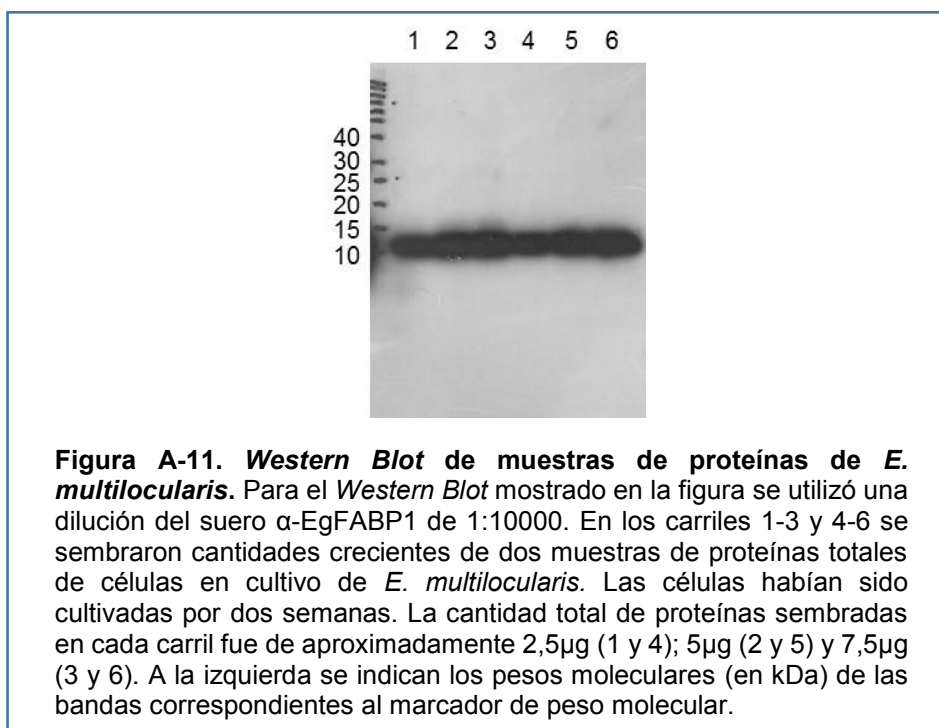
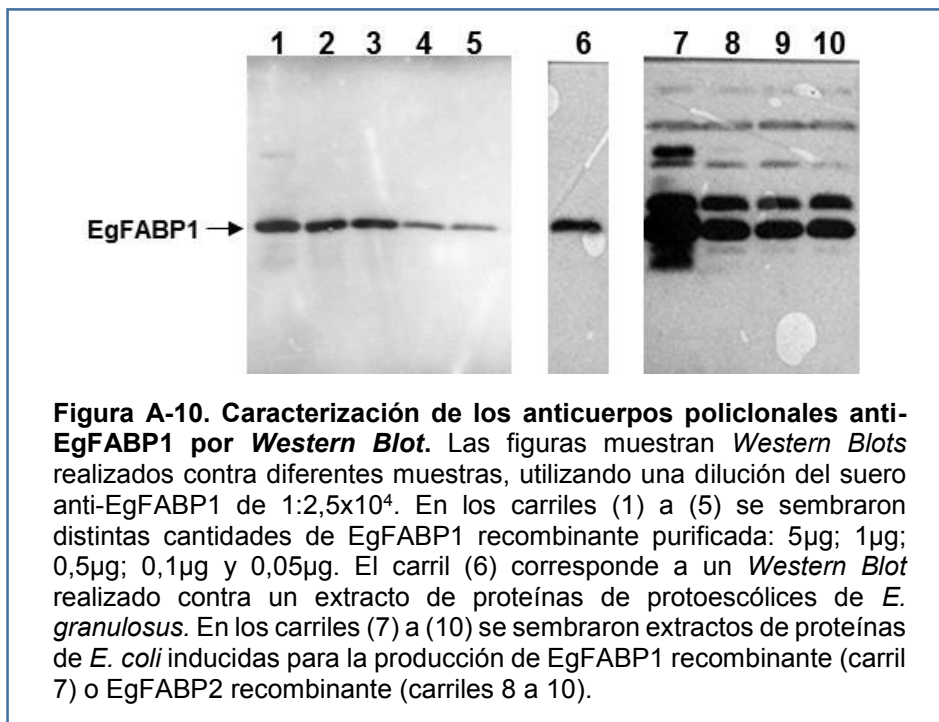
### 7.4.2.1. Caracterización de anticuerpos policlonales $\alpha$ -EgFABP1

Como se mencionó previamente, una vez extraída la sangre de los conejos y separados los sueros, se realizó un *pool* de todos los sueros y se les determinó el título mediante ELISA. El valor obtenido para el título fue de  $1,2 \times 10^7$ , expresado como el inverso de la última dilución que produjo un valor de DO mayor al del blanco.

Posteriormente, se realizaron diversos *Western Blots* para caracterizar la especificidad de los anticuerpos. Tal como se puede apreciar en la *Figura A-10*, los anticuerpos policlonales obtenidos son capaces de reconocer a EgFABP1 recombinante purificada y, lo que es más importante, es capaz de detectar una banda única de proteína de tamaño adecuado en un extracto de protoescolices de *E. granulosus*.

Por otro lado, cuando se realizó un *Western Blot* contra extractos de proteínas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con plásmidos para la expresión de EgFABP1 (pET11b-*egfabp1*) o EgFABP2 (pET5a-*egfabp2*), e inducidas con IPTG, se observó que los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -EgFABP1 son capaces de detectar también a EgFABP2. Asimismo, el suero reconoció múltiples bandas de proteínas propias de la bacteria. Es posible que dichas proteínas hayan sido contaminantes minoritarios en la preparación de EgFABP1 purificada con la que se inmunizaron los conejos, por lo que puede haber en el suero anticuerpos que las reconozcan. Cabe destacar también que la cantidad de proteínas en el extracto de *E. coli* ha sido seguramente muy alto, puesto que la banda correspondiente a EgFABP1 también es muy intensa.

Por su parte, tal como se mencionó anteriormente, durante mi estadía en el laboratorio del Dr. Brehm se evaluó también la capacidad de los anticuerpos  $\alpha$ -EgFABP1 de reconocer a las FABPs de *E. multilocularis*. En la *Figura A-11*, puede verse que en los extractos de proteínas de células de *E. multilocularis* los anticuerpos  $\alpha$ -EgFABP1 detectaron una única banda de proteínas, con un peso molecular acorde a lo esperado.



## 7.5. Inmunolocalización de FABPs en *Echinococcus* spp.

A continuación se presentan ensayos preliminares de inmunolocalización de FABPs en muestras de *E. granulosus* y *E. multilocularis*.

### 7.5.1. Materiales y métodos empleados

#### 7.5.1.1. Inmunofluorescencia en protoescolices *in toto* de *E. granulosus*

Para la detección de las FABPs de *E. granulosus* por inmunofluorescencia, se emplearon protoescolices provenientes de quistes bovinos que se mantuvieron durante dos meses en cultivo en medio DMEM con gentamicina en el laboratorio de la Dra. Rosenzvit (IMPAM, UBA-CONICET). La semana anterior a la fijación se incorporó al medio de cultivo 10% de suero fetal bovino. El protocolo de inmunolocalización se inició con el lavado de los protoescolices con PBS, seguido de lavados con el *buffer de permeabilización* (*Buffer PBS* con el agregado de 0,35% *Tritón X-100*; 0,50% dimetilsulfóxido (DMSO); 0,10%  $\text{NaN}_3$ ; 0,10% BSA;  $6,25 \times 10^{-3}$  % Digitonina) (Camicia et al., 2013). Luego de los lavados, los protoescolices se fijaron incubándolos durante 4 horas a temperatura ambiente en una solución de paraformaldehído (PAF) al 4%. Seguidamente, los protoescolices fijados se lavaron con Etanol 70% y se almacenaron en Etanol 100% a 4°C hasta su posterior uso. Los protoescolices se rehidrataron, y se lavaron con el *buffer de permeabilización*. Posteriormente, se incubaron los protoescolices durante 96 horas con la dilución de anticuerpos que correspondiera, preparada en el *buffer de permeabilización*. Las diluciones ensayadas fueron 1/100, 1/500, 1/1000 y 1/5000. Se emplearon 30  $\mu\text{l}$  de la suspensión de protoescolices por tratamiento. Luego de un lavado de 24 horas con el *buffer de permeabilización*, se incubaron las muestras durante 24 horas con una dilución 1/500 de anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC; *Invitrogen*), preparada en *buffer de permeabilización*. Seguidamente, se realizaron tres lavados sucesivos con PBS, y se realizó el montaje de las muestras. Para ello, se colocaron 20  $\mu\text{l}$  de glicerol 80% sobre un portaobjetos, seguido de 20  $\mu\text{l}$  de la muestra correspondiente. Se mezcló bien la muestra de protoescolices con el glicerol, se colocó un cubreobjetos, y se sellaron los bordes con esmalte. Como control, se incluyeron muestras tratadas con anticuerpos  $\alpha$ -serotonina (dilución 1/1000, como control positivo), muestras tratadas con anticuerpos  $\alpha$ -EgFABP1, sin anticuerpo secundario (y viceversa); y muestras tratadas con suero de conejo no inmunizado, como control negativo. El ensayo fue realizado con la asistencia del Dr. Federico Camicia (IMPAM, UBA-CONICET). Las imágenes de

microscopía confocal se obtuvieron en el servicio de microscopía de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

#### **7.5.1.2. Inmunohistoquímica en cortes de vesículas de *E. multilocularis* obtenidas *in vitro***

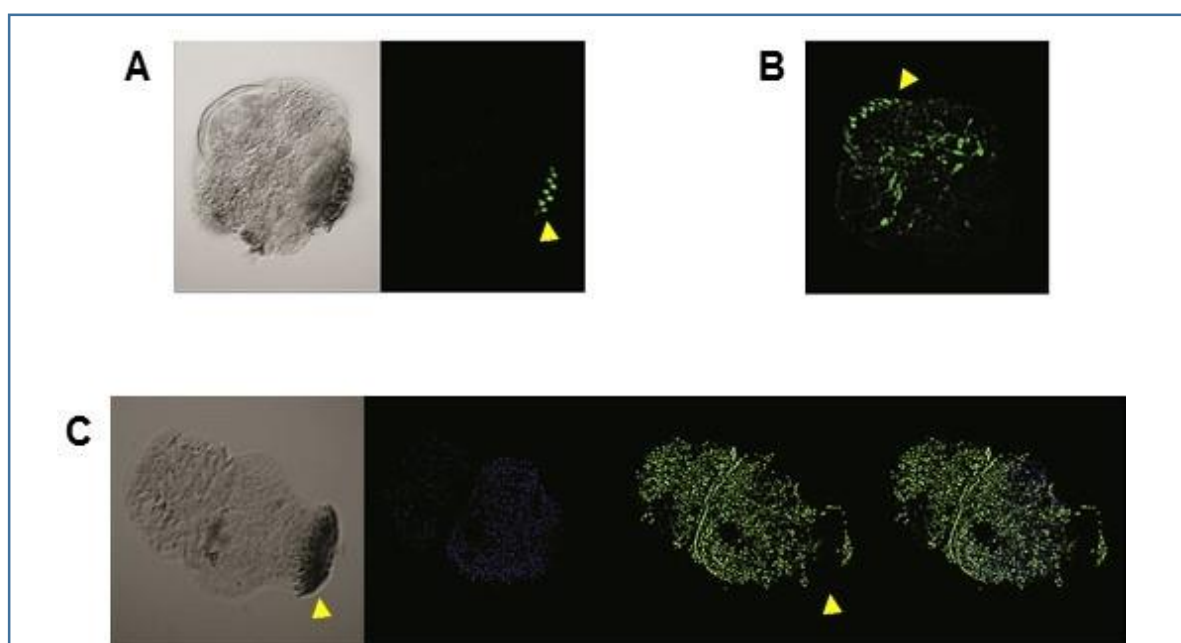
Para la detección por inmunohistoquímica de FABPs en el metacestodo de *E. multilocularis*, se utilizaron cortes en parafina de vesículas de *E. multilocularis* obtenidas *in vitro* (según Brehm & Spiliotis, 2008; Spiliotis & Brehm, 2009), gentilmente cedidas por el Dr. Uriel Koziol. Para ello, los cortes se desparafinaron mediante dos inmersiones sucesivas (de 5 minutos cada una) de los mismos en xilol. Seguidamente, los cortes se rehidrataron mediante inmersiones secuenciales, de dos minutos cada una, en etanol 100%, etanol 75%-PBS, etanol 50%-PBS y etanol 25%-PBS. Luego, se realizaron dos lavados (de 5 minutos cada uno) en *buffer* PBS. Con la finalidad de eliminar la actividad peroxidasa intrínseca a la muestra, se incubaron las mismas durante 10 minutos en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS. Pasado dicho tiempo, se lavaron las muestras con PBS durante 5 minutos, y se permeabilizaron mediante dos incubaciones consecutivas en una solución 0,1% Triton X-100 en PBS (5 minutos cada una). Posteriormente, se llevó a cabo un procedimiento de bloqueo incubando las muestras durante una hora en una solución compuesta por PBS conteniendo 1% BSA, 5% de suero de oveja (*Sigma Aldrich*) y 0,05% Tween-20. La incubación con el anticuerpo primario se realizó *ON* a 4°C, cubriendo el portaobjetos con *Parafilm*<sup>®</sup>, de modo de generar una cámara húmeda. La dilución de anticuerpo empleada fue de 1/2000 y se realizó en PBS conteniendo 1% BSA. Se realizó un control en paralelo, incubando una muestra con PBS/1% BSA. Al día siguiente, se hicieron 4 lavados de 15 minutos cada uno en PBS. Luego, se incubaron las muestras durante 2 horas con el anticuerpo secundario α-conejo conjugado a peroxidasa (diluído 1/500 en PBS/1% BSA) a temperatura ambiente, cubriendo los portaobjetos con *Parafilm*<sup>®</sup>. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno en PBS. A continuación, se realizó una incubación de 2 minutos en una solución 50mM de Acetato de Sodio (pH 5). Finalmente, se reveló empleando el reactivo 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, *Sigma Aldrich*). Se empleó 1ml de solución de AEC (preparada según indicaciones del fabricante) por cada portaobjetos. Las muestras se tiñeron también con una solución 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) preparada en PBS, incubándolas durante 10 minutos protegidas de la luz. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno en PBS. Finalmente, para el montaje de los preparados se utilizó Fluoprep (*Biomerieux*), se dejó secar los preparados durante 15 minutos, y se conservaron a 4°C protegidos de la luz.



## 7.5.2. Resultados obtenidos

### 7.5.2.1. Inmunofluorescencia en protoescólices *in toto* de *E. granulosus*

Debido a la escasa información disponible en relación a la localización de las FABPs en protoescólices de *E. granulosus* (Esteves et al., 1993), se buscó realizar inmunofluorescencias en protoescólices enteros (*in toto*) para complementar lo ya descrito. En la *Figura A-12* se muestran imágenes de los resultados. Dado que la morfología de los protoescólices se hallaba alterada, no se pudieron establecer conclusiones certeras acerca de la localización de EgFABP1. La incubación de los protoescólices con suero de conejo no inmunizado mostró solo algo de tinción inespecífica en los ganchos del rostelo, mientras que el control positivo con anticuerpos  $\alpha$ -serotonina permitió detectar los ganglios, aunque su morfología se hallaba también alterada (Camicia et al., 2013). La tinción con anticuerpos  $\alpha$ -EgFABP1 por su parte, aunque no haya permitido obtener demasiadas conclusiones respecto a su localización, presentó una señal distribuida en gran parte del protoescólex.



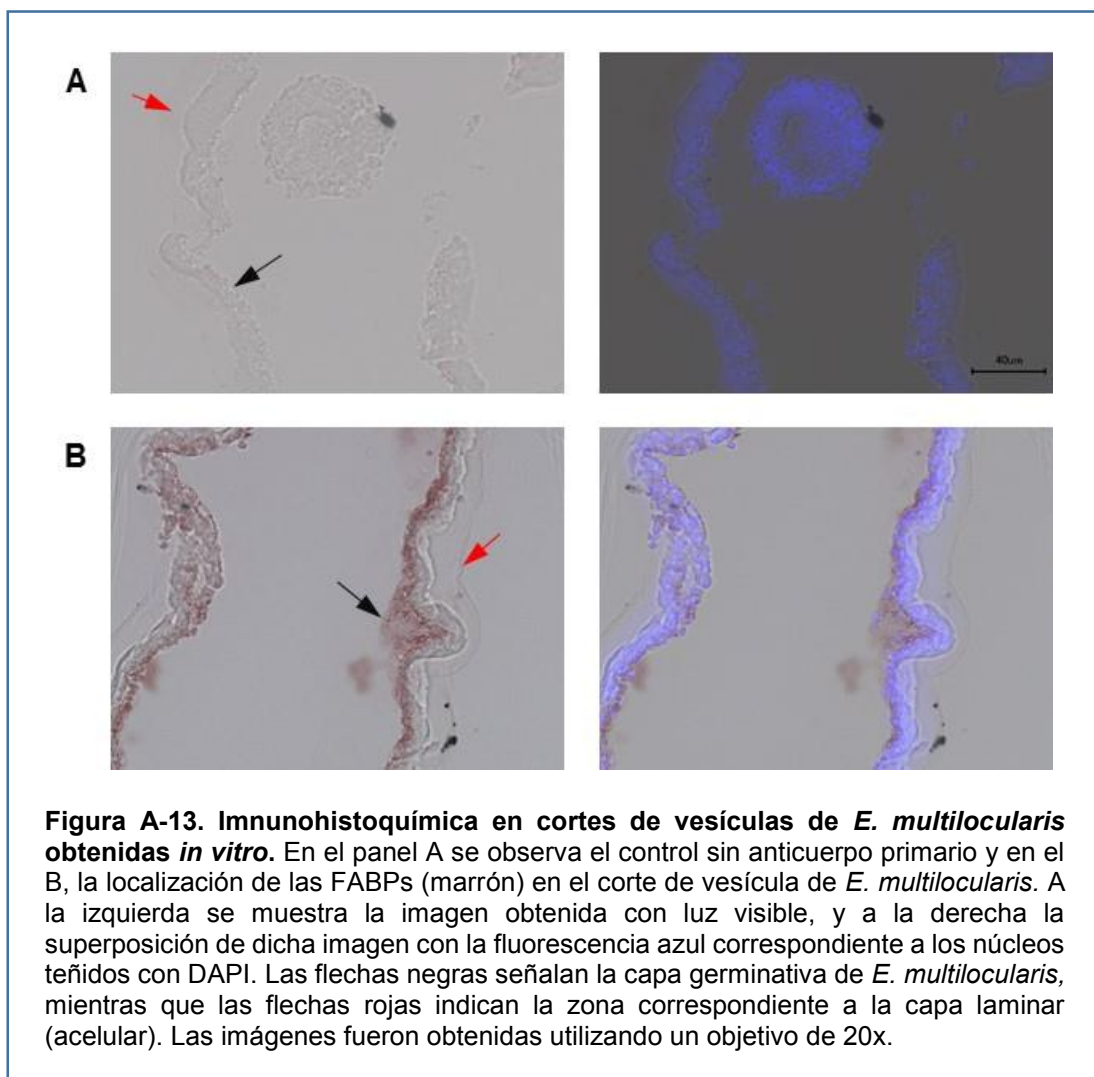
**Figura A-12. Inmunofluorescencias *in toto* en protoescólices de *E. granulosus*.** En el panel A se muestra la imagen de un protoescólex observado con luz visible (izquierda) y la tinción, inespecífica, obtenida al tratar dicho espécimen con suero de un conejo no inmunizado (dilución 1/50). La fluorescencia corresponde al FITC conjugado al anticuerpo secundario anti-conejo. En el panel B se observa un protoescólex tratado con anticuerpo anti-serotonina (dilución 1/1000). En el panel C se pueden ver diferentes imágenes correspondientes a un protoescólex tratado con anticuerpos anti-EgFABP1 (dilución 1/1000). De izquierda a derecha se muestra el protoescólex observado con luz visible, los núcleos teñidos con DAPI (azul), la señal correspondiente al anticuerpo secundario conjugado a FITC (verde), y la superposición de las señales de DAPI + FITC. Las puntas de flecha (en amarillo) señalan el rostelo de los protoescólices como referencia espacial.

Cabe destacar que, tal como se observó al caracterizar el suero  $\alpha$ -EgFABP1, el mismo es capaz de reconocer tanto a EgFABP1 como a EgFABP2, pero no se tiene información acerca de la capacidad del anticuerpo de detectar a alguna de las otras FABPs de *E. granulosus*. Como se mencionó previamente, existe evidencia de que EgFABP3, aparte de EgFABP1, se expresa a nivel proteico en dicho estadio del parásito (Lic. Maite Folle, UdelaR, *comunicación personal*). Los datos transcriptómicos, por otra parte, indican transcripción de varios de los genes de las FABPs en protoescólices, aunque las proteínas podrían no estar traducidas. Por lo tanto, con los datos disponibles en la actualidad es difícil discernir si la señal obtenida corresponde sólo a EgFABP1, a alguna de las otras EgFABPs, o a varias. La relativa escasez de material parasitario dificultó la continuidad de estos ensayos, aunque los mismos deberían ser continuados, de ser posible con anticuerpos que diferencien las distintas FABPs. De este modo podría obtenerse información que permita aproximarse mejor a las posibles funciones de estas proteínas en la biología del parásito.

#### **7.5.2.2. Inmunohistoquímica en cortes de vesículas de *E. multilocularis* obtenidas *in vitro***

Dado que no existía ninguna evidencia reportada sobre la presencia de FABPs en *E. multilocularis*, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica en cortes de vesículas de *E. multilocularis* obtenidas en cultivo. Tal como se mencionó previamente, dichos preparados fueron gentilmente cedidos por el Dr. Uriel Koziol (Universidad de Wurzburg, Alemania).

Tal como se puede observar en la *Figura A-13*, las FABPs estarían localizadas principalmente en la región de la capa germinativa en contacto con el líquido hidático, lo cual lleva a pensar que las mismas podrían estar involucradas en el intercambio de ácidos grasos entre el interior de las células y el líquido hidático. Sin embargo, dado que, por analogía con lo que ocurre en *E. granulosus*, el anticuerpo podría reconocer más de una FABP, se necesitarían estudios más detallados para profundizar en la localización diferencial de cada una de las FABPs. Asimismo, dado que la capa germinativa es una estructura muy compleja, sería deseable poder determinar en qué tipo celular en particular se expresan las diferentes FABPs.





## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Rojas, C.A., Romig, T., Lightowers, M.W., 2014. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans - review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.* 44, 9–18.
- Alvite, G., Di Pietro, S.M., Santomé, J.A., Ehrlich, R., Esteves, A., 2001. Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1533, 293–302.
- Alvite, G., Esteves, A., 2012. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Front. Physiol.* 3.
- Arighi, C.N., Rossi, J.P.F.C., Delfino, J.M., 2003. Temperature-induced conformational switch in intestinal fatty acid binding protein (IFABP) revealing an alternative mode for ligand binding. *Biochemistry* 42, 7539–7551.
- Armstrong, E.H., Goswami, D., Griffin, P.R., Noy, N., Ortlund, E. a, 2014. Structural basis for ligand regulation of the Fatty Acid Binding Protein 5, Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\beta/\delta$  (FABP5-PPAR $\beta/\delta$ ) signaling pathway. *J. Biol. Chem.*
- Bai, Y., Zhang, Z., Jin, L., Kang, H., Zhu, Y., Zhang, L., Li, X., Ma, F., Zhao, L., Shi, B., Li, J., McManus, D.P., Zhang, W., Wang, S., 2014. Genome-wide sequencing of small RNAs reveals a tissue-specific loss of conserved microRNA families in *Echinococcus granulosus*. *BMC Genomics* 15, 736.
- Becker, M.M., Kalinna, B.H., Waive, G.J., McManus, D.P., 1994. Gene cloning, overproduction and purification of a functionally active cytoplasmic fatty acid-binding protein (Sj-FABPC) from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Gene* 148, 321–325.
- Bernlohr, D.A., Simpson, M.A., Vogel Hertz, A., Banaszak, L.J., 1997. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 277–303.
- Brehm, K., Spiliotis, M., 2008. Recent advances in the in vitro cultivation and genetic manipulation of *Echinococcus multilocularis* metacystodes and germinal cells. *Exp. Parasitol.* 119, 506–515.
- Brehm, K., Wolf, M., Beland, H., Kroner, A., Frosch, M., 2003. Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display, in: *International Journal for Parasitology*. pp. 1145–1159.
- Brownlee, D.J., Fairweather, I., Johnston, C.F., Rogan, M.T., 1994. Immunocytochemical localization of serotonin (5-HT) in the nervous system of the hydatid organism, *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Cyclophyllidea). *Parasitology* 109, 233–241.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates.
- Cai, H., Liu, Q., Gao, D., Wang, T., Chen, T., Yan, G., Chen, K., Xu, Y., Wang, H., Li, Y., Zhu, W., 2015. Novel fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors: virtual screening, synthesis and crystal structure determination. *Eur. J. Med. Chem.* 90, 241–250.

- Camicia, F., Herz, M., Prada, L.C., Kamenetzky, L., Simonetta, S.H., Cucher, M., Bianchi, J.I., Fernandez, C., Brehm, K., Rosenzvit, M.C., 2013. The nervous and pre nervous roles of serotonin in *Echinococcus* spp. *Int. J. Parasitol.* 43, 647–659.
- Chen, J., Wang, J., Zhu, W., 2014. Binding modes of three inhibitors 8CA, F8A and I4A to A-FABP studied based on molecular dynamics simulation. *PLoS One* 9, e99862.
- Conant, G.C., Wolfe, K.H., 2008. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat. Rev. Genet.* 9, 938–950.
- Córsico, B., Cistola, D.P., Frieden, C., Storch, J., 1998. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12174–12178.
- Córsico, B., Falomir-Lockhart, L.J., Franchini, G.R., Scaglia, N. (Eds.), 2013. Análisis estructural y funcional de Macromoléculas, 1° Edición. ed. EDULP - Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- Córsico, B., Franchini, G.R., Hsu, K., Storch, J., 2005. Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *J. Lipid Res.* 46, 1765–1772.
- Córsico, B., Liou, H.L., Storch, J., 2004. The  $\alpha$ -Helical Domain of Liver Fatty Acid Binding Protein Is Responsible for the Diffusion-Mediated Transfer of Fatty Acids to Phospholipid Membranes. *Biochemistry* 43, 3600–3607.
- Crompton, D.W.T. (Ed.), 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, Geneva.
- Cronan, J.E., Rock, C.O., 1994. The presence of linoleic acid in *Escherichia coli* cannot be confirmed. *J. Bacteriol.* 176, 3069–3071.
- Cucher, M., Macchiaroli, N., Kamenetzky, L., Maldonado, L., Brehm, K., Rosenzvit, M., 2015. High-throughput characterization of *Echinococcus* spp. metacestode miRNomes. *Int. J. Parasitol.* 45, 253–267.
- Cucher, M., Prada, L., Mourglia-Ettlin, G., Dematteis, S., Camicia, F., Asurmendi, S., Rosenzvit, M., 2011. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int. J. Parasitol.* 41, 439–448.
- D'Alessandro, A., Rausch, R.L., 2008. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 380–401.
- De Gerónimo, E., Hagan, R.M., Wilton, D.C., Córsico, B., 2010. Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 1082–1089.
- Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J.O., Ferreira, F., 2011. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol.* 27, 204–213.

- Digenis, G.A., Thorson, R.E., Konyalian, A., 1970. Cholesterol biosynthesis and lipid biochemistry in the scolex of *Echinococcus granulosus*. *J. Pharm. Sci.* 59, 676–679.
- Eckert, J., Gemmel, M., Meslin, F., Pawlowski, Z. (Eds.), 2001. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, 1st ed. World Organisation for Animal Health, Paris, France.
- Espínola, S.M., Ferreira, H.B., Zaha, A., 2014. Validation of suitable reference genes for expression normalization in *Echinococcus* spp. larval stages. *PLoS One* 9, e102228.
- Esteves, A., Dallagiovanna, B., Ehrlich, R., 1993. A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 215–222.
- Esteves, A., Ehrlich, R., 2006. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 142, 262–274.
- Esteves, A., Paulino, M., 2013. In silico studies of *Echinococcus granulosus* FABPs. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 31, 224–239.
- Esteves, A., Portillo, V., Ehrlich, R., 2003. Genomic structure and expression of a gene coding for a new fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1631, 26–34.
- Estuningsih, S.E., Smooker, P.M., Wiedosari, E., Widjajanti, S., Vaiano, S., Partoutomo, S., Spithill, T.W., 1997. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int. J. Parasitol.* 27, 1419–28.
- Falimir-Lockhart, L.J., Laborde, L., Kahn, P.C., Storch, J., Córscico, B., 2006. Protein-Membrane Interaction and Fatty Acid Transfer from Intestinal Fatty Acid-binding Protein to Membranes. Support for a multistep process. *J. Biol. Chem.* 281, 13979–13989.
- Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318, 1–14.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Folli, C., Ramazzina, I., Percudani, R., Berni, R., 2005. Ligand-binding specificity of an invertebrate (*Manduca sexta*) putative cellular retinoic acid binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1747, 229–37.
- Fontana, A., Polverino de Laureto, P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., Zambonin, M., 2004. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* 51, 299–321.
- Franchini, G.R., Pórfido, J.L., Ibáñez Shimabukuro, M., Rey Burusco, M.F., Bélgamo, J. a., Smith, B.O., Kennedy, M.W., Córscico, B., 2015. The unusual lipid binding proteins of parasitic helminths and their potential roles in parasitism and as therapeutic targets. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 93, 31–36.
- Franchini, G.R., Storch, J., Córscico, B., 2008. The integrity of the  $\alpha$ -helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty

- acids to phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* 1781, 192–9.
- Frayha, G.J., 1968. A study on the synthesis and absorption of cholesterol in hydatid cysts (*Echinococcus granulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 27, 875–878.
- Frayha, G.J., 1974. Synthesis of certain cholesterol precursors by hydatid protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and cysticerci of *Taenia hydatigena*. *Comp. Biochem. Physiol.* B 49, 93–98.
- Frayha, G.J., Bahr, G.M., Haddad, R., 1980. The Lipids and Phospholipids of Hydatid Protoscolices of *Echinococcus granulosus* (Cestoda). *Int. J. Parasitol.* 10, 213–216.
- Fromm, B., Worren, M.M., Hahn, C., Hovig, E., Bachmann, L., 2013. Substantial loss of conserved and gain of novel MicroRNA families in flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2619–2628.
- Furuhashi, M., Hotamisligil, G.S., 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 489–503.
- Garofalo, A., Kläger, S.L., Rowlinson, M.C., Nirmalan, N., Klion, A., Allen, J.E., Kennedy, M.W., Bradley, J.E., 2002. The FAR proteins of filarial nematodes: secretion, glycosylation and lipid binding characteristics. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 161–170.
- Gelmedin, V., Zavala-Góngora, R., Fernandez, C., Brehm, K., 2005. *Echinococcus multilocularis*: Cloning and characterization of a member of the SNW/SKIP family of transcriptional coregulators. *Exp. Parasitol.* 111, 115–120.
- Gillilan, R., Ayers, S., Noy, N., 2007. Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. *J. Mol. Biol.* 372, 1246–1260.
- Gomori, G., 1942. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photo-electric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 27, 955.
- Guarnera, E.A., 2009. *Hidatidosis en Argentina: carga de enfermedad*, 1st ed. Buenos Aires.
- Hauerland, N.H., Chisholm, J.M., 1990. Fatty acid binding protein in flight muscle of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochim. Biophys. Acta* 1047, 233–238.
- Hemer, S., Konrad, C., Spiliotis, M., Koziol, U., Schaack, D., Förster, S., Gelmedin, V., Stadelmann, B., Dandekar, T., Hemphill, A., Brehm, K., 2014. Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biol.* 12, 1–22.
- Hertzel, A. V, Hellberg, K., Reynolds, J.M., Kruse, A.C., Juhlmann, B.E., Smith, A.J., Sanders, M.A., Ohlendorf, D.H., Suttles, J., Bernlohr, D.A., 2009. Identification and characterization of a small molecule inhibitor of Fatty Acid binding proteins. *J. Med. Chem.* 52, 6024–6031.
- Hodsdon, M.E., Cistola, D.P., 1997. Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by <sup>15</sup>N NMR relaxation and <sup>1</sup>H exchange. *Biochemistry* 36, 2278–2290.



- Holcman, B., Heath, D.D., 1997. The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Trop.* 64, 5–17.
- Hsu, K., Storch, J., 1996. Fatty Acid Transfer from Liver and Intestinal Fatty Acid-binding Proteins to Membranes Occurs by Different Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 271, 13317–13323.
- Hubbard, S.J., 1998. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1382, 191–206.
- Irabedra, P., Roig, C., 2007. Estimación del impacto económico de la equinococosis quística en el Cono Sur (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Oficina Regional para América Latina y el Caribe.
- Jabbar, A., Jenkins, D.J., Crawford, S., Walduck, A.K., Gauci, C.G., Lightowlers, M.W., 2011. Oncospheral penetration glands are the source of the EG95 vaccine antigen against cystic hydatid disease. *Parasitology* 138, 89–99.
- Jakobsson, E., Alvite, G., Bergfors, T., Esteves, A., Kleywegt, G.J., 2003. The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1649, 40–50.
- Jin, X., Lu, L., Su, H., Lou, Z., Wang, F., Zheng, Y., Xu, G.-T., 2013. Comparative analysis of known miRNAs across platyhelminths. *FEBS J.* 280, 3944–3951.
- Kim, S.H., Bae, Y.A., Yang, H.J., Shin, J.H., Diaz-Camacho, S.P., Nawa, Y., Kang, I., Kong, Y., 2012. Structural and Binding Properties of Two Paralogous Fatty Acid Binding Proteins of *Taenia solium* Metacestode. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1868.
- Kleinfeld, A., Storch, J., 1993. Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry* 32, 2053–2061.
- Koziol, U., Krohne, G., Brehm, K., 2013. Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*. *Front. Zool.* 10, 1–17.
- Koziol, U., Rauschendorfer, T., Zanon Rodríguez, L., Krohne, G., Brehm, K., 2014. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *Evodevo* 5, 1–23.
- Kralisch, S., Ebert, T., Lossner, U., Jessnitzer, B., Stumvoll, M., Fasshauer, M., 2014. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int. J. Obes.* 38, 1251–1254.
- Kralisch, S., Fasshauer, M., 2012. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* 56, 10–21.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Larrieu, E., Herrero, E., Mujica, G., Labanchi, J.L., Araya, D., Grizmodo, C., Calabro, A., Talmon, G., Ruesta, G., Perez, A., Gatti, A., Santillán, G., Cabrera, M., Arezzo, M.,

- Seleiman, M., Cavagión, L., Cachau, M.G., Alvarez Rojas, C. a., Gino, L., Gauci, C.G., Heath, D.D., Lamberti, R., Lightowers, M.W., 2013. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Early impact and preliminary data. *Acta Trop.* 127, 143–151.
- Larrieu, E., Zanini, F., 2012. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974-2010. *Rev. Panam. Salud Pública* 31, 81–87.
- Lee, E.-G., Kim, S.-H., Bae, Y.-A., Chung, J.-Y., Suh, M., Na, B.-K., Kim, T.-S., Kang, I., Ma, L., Kong, Y., 2007. A hydrophobic ligand-binding protein of the *Taenia solium* metacestode mediates uptake of the host lipid: implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis. *Proteomics* 7, 4016–4030.
- Lowe, J.B., Sacchettini, J.C., Laposata, M., McQuillan, J.J., Gordon, J.I., 1987. Expression of Rat Intestinal Fatty Acid-binding Protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 5931–5937.
- Lymbery, A.J., Jenkins, E.J., Schurer, J.M., Thompson, R.C.A., 2015. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends Parasitol.* 31, 23–29.
- Martínez, C., Paredes, R., Stock, R.P., Saralegui, A., Andreu, M., Cabezón, C., Ehrlich, R., Galanti, N., 2005. Cellular organization and appearance of differentiated structures in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *J. Cell. Biochem.* 94, 327–335.
- Massey, J.B., Bick, D.H., Pownall, H.J., 1997. Spontaneous transfer of monoacyl amphiphiles between lipid and protein surfaces. *Biophys. J.* 72, 1732–1743.
- Maté, S.M., Brenner, R.R., Ves-Losada, a., 2004. Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 70, 49–57.
- Maule, A.G., Marks, N.J. (Eds.), 2006. *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. CABI.
- McDermott, L., Kennedy, M.W., McManus, D.P., Bradley, J.E., Cooper, A., Storch, J., 2002. How helminth lipid-binding proteins offload their ligands to membranes: differential mechanisms of fatty acid transfer by the ABA-1 polyprotein allergen and Ov-FAR-1 proteins of nematodes and Sj-FABPc of schistosomes. *Biochemistry* 41, 6706–6713.
- McDermott, L., Moore, J., Brass, A., Price, N.C., Kelly, S.M., Cooper, A., Kennedy, M.W., 2001. Mutagenic and chemical modification of the ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris*: consequences for structure and lipid binding properties. *Biochemistry* 40, 9918–9926.
- McManus, D.P., 2013. Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology* 140, 1617–1623.
- McManus, D.P., Gray, D.J., Zhang, W., Yang, Y., 2012. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *BMJ* 344, e3866.

- Mizukami, C., Spiliotis, M., Gottstein, B., Yagi, K., Katakura, K., Oku, Y., 2010. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitol. Int.* 59, 647–652.
- Mohammadzadeh, T., Sadjjadi, S.M., Rahimi, H., 2014. Still and Moving Image Evidences for Mating of *Echinococcus granulosus* Reared in Culture Media. *Iran. J. Parasitol.* 9, 129–133.
- Moral, M. (Ed.), 2012. Enfermedades infecciosas. Hidatidosis. Guía para el Equipo de Salud Nro 11. Ministerio de Salud de la Nación- República Argentina.
- Moro, P., Schantz, P.M., 2009. Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 125–133.
- Morrison, W., Smith, L., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600–608.
- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G., Klinkert, M.Q., 1991. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 8447–8454.
- Mustonen, P., Virtanen, J.A., Somerharju, P.J., Kinnunen, P.K., 1987. Binding of cytochrome c to liposomes as revealed by the quenching of fluorescence from pyrene-labeled phospholipids. *Biochemistry* 26, 2991–2997.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A., 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* 43, 1017–1029.
- Nicolson, G.L., 2014. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1451–1466.
- Obal, G., Ramos, A., Silva, V., Lima, A., Batthyany, C., Bessio, M., Ferreira, F., Salinas, G., Ferreira, A.M., 2012. Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1642.
- Olsen, O.W., 1977a. *Parasitología animal: El parasitismo y los protozoos, Volumen 1.* Aedos.
- Olsen, O.W., 1977b. *Parasitología animal: Platelminfos, acantocéfalos y nematelmintos, Volumen 2.* Aedos.
- Parada, G.E., Munita, R., Cerda, C. a, Gysling, K., 2014. A comprehensive survey of non-canonical splice sites in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res.* 42, 1–15.
- Paulino, M., Esteves, A., Vega, M., Tabares, G., Ehrlich, R., Tapia, O., 1998. Modelling a 3D structure for EgDf1 from *Echinococcus granulosus*: putative epitopes, phosphorylation motifs and ligand. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 12, 351–360.
- Plenefisch, J., Xiao, H., Mei, B., Geng, J., Komuniecki, P.R., Komuniecki, R., 2000. Secretion of a novel class of iFABPs in nematodes: Coordinate use of the *Ascaris*/*Caenorhabditis* model systems. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 223–236.

- Pórfido, J.L., Alvite, G., Silva, V., Kennedy, M.W., Esteves, A., Córscico, B., 2012. Direct Interaction between EgFABP1, a Fatty Acid Binding Protein from *Echinococcus granulosus*, and Phospholipid Membranes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1893.
- Prior, A., Jones, J.T., Blok, V.C., Beauchamp, J., McDermott, L., Cooper, A., Kennedy, M.W., 2001. A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *Biochem. J.* 356, 387–394.
- Rigano, R., Buttari, B., Profumo, E., Ortona, E., Delunardo, F., Margutti, P., Mattei, V., Teggi, A., Sorice, M., Siracusano, A., 2007. *Echinococcus granulosus* Antigen B Impairs Human Dendritic Cell Differentiation and Polarizes Immature Dendritic Cell Maturation towards a Th2 Cell Response. *Infect. Immun.* 75, 1667–1678.
- Rodríguez-Pérez, J., Rodríguez-Medina, J.R., García-Blanco, M.A., Hillyer, G. V, 1992. *Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Exp. Parasitol.* 74, 400–407.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaap, F.G., van der Vusse, G.J., Glatz, J.F.C., 2002. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol. Cell. Biochem.* 239, 69–77.
- Schmid, F., 1997. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational change: 4. Circular dichroism, in: Creighton (Ed.), *Protein Structure: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, pp. 261–297.
- Schroeder, F., Jolly, C., Cho, T., Frolov, A., 1998. Fatty acid binding protein isoforms: structure and function. *Chem. Phys. Lipids* 92, 1–25.
- Sessler, R.J., Noy, N., 2005. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol. Cell* 18, 343–353.
- Sheth, N., Roca, X., Hastings, M.L., Roeder, T., Krainer, A.R., Sachidanandam, R., 2006. Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 34, 3955–3967.
- Silva-Álvarez, V., Folle, A.M., Ramos, A.L., Zamarreño, F., Costabel, M.D., García-Zepeda, E., Salinas, G., Córscico, B., Ferreira, A.M., 2015a. *Echinococcus granulosus* antigen B: A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host – parasite interface. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 93, 17–23.
- Silva-Álvarez, V., Franchini, G.R., Pórfido, J.L., Kennedy, M.W., Ferreira, A.M., Córscico, B., 2015b. Lipid-Free Antigen B Subunits from *Echinococcus granulosus*: Oligomerization, Ligand Binding, and Membrane Interaction Properties. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003552.
- Smathers, R.L., Petersen, D.R., 2011. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum. Genomics* 5, 170–191.

- Smyth, J.D., McManus, D.P. (Eds.), 2007. *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*. Cambridge University Press.
- Spiliotis, M., Brehm, K., 2009. Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. *Methods Mol. Biol.* 470, 245–62.
- Spiliotis, M., Mizukami, C., Oku, Y., Kiss, F., Brehm, K., Gottstein, B., 2010. *Echinococcus multilocularis* primary cells: Improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 174, 83–87.
- Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., Brehm, K., 2004. Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitol. Res.* 92, 430–432.
- Storch, J., Bass, N.M., 1990. Transfer of fluorescent fatty acids from liver and heart fatty acid-binding proteins to model membranes. *J. Biol. Chem.* 265, 7827–7831.
- Storch, J., Bass, N.M., Kleinfeld, A.M., 1989. Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264, 8708–8713.
- Storch, J., Córscico, B., 2008. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 73–95.
- Storch, J., McDermott, L., 2009. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J. Lipid Res.* 50, S126–S131.
- Storch, J., Thumser, A., 2010. Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 285, 32679–32683.
- Tan, N., Shaw, N., Vinckenbosch, N., 2002. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5114–5127.
- Thompson, R.C.A., Jenkins, D.J., 2014. *Echinococcus* as a model system : biology and epidemiology. *Int. J. Parasitol.* 44, 865–877.
- Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J., 1988. The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.* 27, 209–258.
- Thompson, R.C.A., McManus, D.P., 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* 18, 452–457.
- Torgerson, P.R., Keller, K., Magnotta, M., Ragland, N., 2010. The global burden of alveolar echinococcosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e722.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcíarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernandez, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., Cai, X.,

- Soberón, X., Olson, P.D., Laclette, J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63.
- Uversky, V., 1993. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* 32, 13288–13298.
- Velkov, T., Lim, M., Capuano, B., Prankerd, R., 2008. A protocol for the combined sub-fractionation and delipidation of lipid binding proteins using hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B* 867, 238–246.
- Wang, Y., Law, W.-K., Hu, J.-S., Lin, H.-Q., Ip, T.-M., Wan, D.C.-C., 2014. Discovery of FDA-approved drugs as inhibitors of fatty acid binding protein 4 using molecular docking screening. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 3046–3050.
- Wang, Y., Lin, H.-Q., Law, W.-K., Liang, W.-C., Zhang, J.-F., Hu, J.-S., Ip, T.-M., Waye, M.M.-Y., Wan, D.C.-C., 2015. Pimozide, a Novel Fatty Acid Binding Protein 4 Inhibitor, Promotes Adipogenesis of 3T3-L1 Cells by Activating PPAR $\gamma$ . *ACS Chem. Neurosci.* 6, 211–218.
- WHO, 2015. WHO | World Health Organization [WWW Document]. URL [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Kang, H., Chen, J., Wang, L., Chen, A., Yu, S., Gao, Z., Jin, L., Gu, W., Wang, Z., Zhao, L., Shi, B., Wen, H., Lin, R., Jones, M.K., Brejova, B., Vinar, T., Zhao, G., McManus, D.P., Chen, Z., Zhou, Y., Wang, S., 2013. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat. Genet.* 45, 1168–1177.
- Zheng, Y., 2013. Phylogenetic analysis of the Argonaute protein family in platyhelminths. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 1050–1054.
- Zheng, Y., Blair, D., Bradley, J.E., 2013. Phyletic distribution of fatty acid-binding protein genes. *PLoS One* 8, e77636.
- Zimmerman, A.W., Veerkamp, J.H., 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1096–1116.