



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Variabilidad genética y expresión del antígeno B
de *Echinococcus granulosus* y sus implicancias
en el diagnóstico de la hidatidosis**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Lic. Laura Kamenetzky

Directora: Dra. Mara C. Rosenzvit

Consejero de estudios: Dr. Alberto Kornblihtt

**Departamento de Parasitología
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas- ANLIS
“Dr. Carlos G. Malbrán”**

Buenos Aires, 2007

A mi madre

Agradecimientos

A Mara Rosenzvit, por bancarse 12 años como mi directora, por ser 12 años una gran maestra y por sobre todo, por los 12 años de amistad, invaluable.

A mis compañeros del laboratorio, sin ellos no podría haber realizado mucho de lo que se muestra aquí, pero no voy a hablar de trabajo, lo importante pasa por otro lado: a Fede por su humor, un pilar fundamental para afrontar el día a día del laboratorio y su ganas infinitas de aprender cada día más; Pato por sus anécdotas que dan para reír varios días, sus consejos y sobre todo por su gran compañerismo; a Ariana, por seguirme explicando lo importante de esta vida; a Ariel por su amabilidad y por compartir conmigo su experiencia como padre; a Marce por su ánimo y empuje, fue muy bueno compartir con ella las últimas y más difíciles etapas, y por último a Lisandro, recientemente incorporado al grupo, gracias por la paciencia.

A los compañeros del Departamento en especial a Silvana por compartir su amistad y experiencia; Marcelo también por su amistad y sabios consejos; Bibi, Karina, Grachu, Jorge L., Marta, Mariela, Silvio, Cinthia y Graciana, siempre dispuestos a ayudarme, Pilar y Laura por ser tan amables y sobre todo por pasarme las llamadas del jardín con tanta paciencia.

Al grupo Toxo, un bajón que estén tan lejos, aunque siguen estando cerca para muchas cosas. Sergio, mi gran co-director y amigo, Pablo, las primeras etapas fueron muy buenas en su compañía, ahora sé que siempre cuento con él cuando lo necesito; Valen, nadie nunca pudo superar sus charlas en la peluquería.

A los compañeros del Malbrán, los chicos de mico, que haría sin ellos? Willy, Nico, Rubén, Hernán, Diego y todos los anónimos que siempre me ayudaron; a la gente de micobacterias en especial a Betty, una diosa, su ayuda incondicional es un ejemplo de compañerismo; a la gente de antibiogramas siempre dispuestos a regalarme antibióticos, a la gente de fisiopatogenia que hizo malabares para que pueda realizar mis centrifugadas más allá del horario malbranezco; a la gente de virus, de sueros y antígenos y del serpentario por su amabilidad.

A mis colegas y amigos de otros Institutos: de la UFRGS de Brasil, gracias a Arnaldo y Henrique por confiar en mi, a Cristiano, Larissa, Veridiana, Claudinha, Karina, Leo, Ana, Felipe, Melissa, por ayudarme en el laboratorio y por llevarme a conocer los mejores lugares de su ciudad; de la Facultad de Ciencias de Montevideo, Carmen por compartir su gran experiencia; del IMMF de Córdoba, Hugo Luján por ayudarnos en las primeras inmunos y darle empuje a nuestro proyecto, de la Facultad de Medicina, Gerardo Mirkin por ayudarnos en las últimas inmunos y compartir su gran experiencia; de la CNEA, Maria Muhlmann y Alejandro por la buena predisposición para prestarnos y ayudarnos con el microscopio de fluorescencia.

A las señas de "Mi pequeño Mundo", Lilian, Lore, Salomé, Glori, Mari, Mechi, Gabi y Ceci por ser tan amorosas y dulces con Gala y conmigo, y darme la seguridad emocional e imprescindible para afrontar la nueva etapa de madre-investigadora.

A mi familia, Gala y Dani, no hay palabras que describan lo que siento por ellos, junto a ellos, sólo algo aproximado: los amo.

A mis padres Rosa y Coco y mi hermano Gustavo, me dieron la fuerza y el empuje que permite disfrutar los momentos felices de la vida y el resto poder soportarlo.

A Rosa, Rafael, Gabi, Seba y Clara porque se que puedo contar con ellos, gracias!

A mis amigos, Kari, Emi y León, que lindo compartir las aventuras de la paternidad!, Germán, Jose, Mari L., Vero y Gus, Mari S., Mari O., Rosario, Topa, Demián y Marianita, Walter, Marita y Micky, los chicos del ensamble, Ceci y Tamara, por la diversión, el cariño, el ánimo y la confianza en mi.

A Ioda, gracias a él descubrí mi capacidad de querer sin pedir absolutamente nada a cambio.

Publicaciones durante el período de doctorado

Resultados de esta tesis:

- Kamenetzky, L., Muzulin, P. M., Gutierrez, A. M, Angel, S. O., Zaha, A., Guarnera, E. A. and Rosenzvit, M. C. (2005) High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 131, 805-815.

- Rosenzvit, M. C., Camicia F., Kamenetzky L., Muzulin P. M., Gutierrez A. M. (2006). Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane bound proteins from *Echinococcus granulosus*. *Parasitology International*, 55, S63 – S67

- Lorenzo C., Ferreira H., Monteiro K., Rosenzvit M., Kamenetzky L., García H., Vasquez Y., Naquira C., Sánchez E., Lorca M., Contreras M., Last J., González-Sapienza G. (2005). Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind randomized multi-center study. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2764-2770.

- Muzulin P. M., Kamenetzky L., Gutiérrez A.M Zaha A., Guarnera E. A., Rosenzvit M.C. (2007) Further analysis of genetic variability in *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. En preparación.

Presentados en la introducción de esta tesis:

- Roratto P. A., Bartholomei-Santos M. L., Gutierrez A. M., Kamenetzky L., Rosenzvit M. C., Zaha A. (2006) Detection of genetic polymorphism among and within *Echinococcus granulosus* strains by heteroduplex analysis of a microsatellite from the U1 snRNA genes. *Genetics and Molecular Research*; 5, 542-552.

- Haag K. L., Ayala F. J., Kamenetzky L., Gutierrez A. M. and Rosenzvit M. (2004). Livestock trade history, geography and parasite strains: the

mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina
Journal of Parasitology, 90, 234-239.

- Guarnera, E., Parra, A Kamenetzky, L., García, G. E, Gutierrez, A. (2004).
Cystic echinococcosis in Argentina: evolution of metacestodes and clinical
expression in various *Echinococcus granulosus* strains. Acta Trópica 92 153-
159.

- Bartholomei-Santos M. L., Heinzelmann L. S., Oliveira R. P, Chemale G.,
Gutierrez A. M., Kamenetzky L., Haag K. L. and A. Zaha (2003). Isolation and
characterization of microsatellites from the tapeworm *Echinococcus
granulosus*. Parasitology. 126:599-605.

- Kamenetzky L., Gutierrez A. M., Canova S. G., Haag K. L., Guarnera E. A.,
Parra A., García G. E., Rosenzvit M. C.(2002). Several strains of
Echinococcus granulosus infect livestock and humans in Argentina. Infection,
Genetics and Evolution 63, 1–8.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNt: ARN de transferencia

BSA: seroalbúmina bovina

CO1: citocromo oxidasa subunidad 1

DAB: Di-aminobenzidina Dihidrocloruro

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiamintetracético

EST: *expressed sequence tag* (secuencia parcial de un clón de ADN copia)

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

GPI: glicosidil fostatidil inositol

hs: horas

IgG: Inmunoglobulina G

IL: interleukina

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido.

ITS1: espaciador transcripto interno ribosomal 1

kDa: kilodalton

LB: extracto de levadura (5g/l), NaCl (10 g/l), triptona (10 g/l).

LB-agar: LB con 15 g/l de agar.

LH: líquido hídrico

MDH: malato dehidrogenasa

μ g: microgramo

μ l: microlitro

μ M: micrometro

mg miligramo

min: minutos

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MAb: anticuerpo monoclonal

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido
Ni: níquel
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS: NaCl (137mM); KCl (2,7mM); Na₂HPO₄ (10mM); KH₂PO₄ (2mM).
Pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
rAgB1-rAgB4: antígeno B1-B4 recombinante
RFLP: polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción
RT: retrotranscripción
SDS: dodecil sulfato de sodio
SSC: NaCl 0,3 M; citrato de sodio 0,03M
SSCP: polimorfismo conformacional de cadena simple
TE: Tris-HCl (10mM), EDTA (1mM), pH8
Th1: células T *helper* 1
Th2: células T *helper* 2
Tris: trihidroximetil aminometano
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
1.1. <i>Echinococcus granulosus</i>	5
1.2. Morfología de los protoescolices de <i>E. granulosus</i>	9
1.3. Genotipos de <i>E. granulosus</i>	14
1.4. Distribución geográfica y epidemiología de <i>E. granulosus</i>	18
1.5. Genotipos presentes en la Argentina	20
1.6. Hidatidosis	24
1.7. Diagnóstico de la hidatidosis en humanos	25
1.8. Importancia de las proteínas de secreción	26
1.9. El Antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i>	28
1.10. Variabilidad de las secuencias que codifican al AgB	28
1.11. Potencial diagnóstico del AgB	29
1.12. Localización del AgB en el metacestode de <i>E. granulosus</i>	31
1.13. Función del AgB en la biología del parásito	32
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1. Materiales y métodos del objetivo 1)	37

2.1.1. Obtención de material parasitario.....	37
2.1.2. Obtención de ADN.....	37
2.1.3. Obtención de ARN.....	37
2.1.4. Análisis del genotipo de <i>E. granulosus</i>	38
2.1.5. Amplificación de los genes AgB2 y AgB4	38
2.1.6. Transformación de bacterias	39
2.1.7. Clonado y análisis mediante polimorfismo de conformación simple cadena (SSCP)	39
2.1.8. Secuenciación	40
2.1.9. Análisis de las secuencias obtenidas	40
2.1.10. Análisis de transcritos.....	41
2.1.11. Diseño de <i>primers</i> gen-específicos	42
2.1.12. Amplificación de AgB gen específica	42
2.2. Materiales y métodos del objetivo 2)	43
2.2.1. Hibridación <i>in situ</i>	43
2.2.2. Obtención de antígenos.....	44
2.2.3. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales anti AgB ..	45
2.2.4. Inmunoblot	46
2.2.5. Inmunolocalización en protoescólices <i>in toto</i>	46
2.2.6. Inmunolocalización en cortes de protoescólices	47
2.3. Materiales y métodos del objetivo 3)	47
2.3.1. Obtención de material parasitario.....	47

2.3.2. Análisis de expresión estadio específica	48
2.3.3. Clonado, secuenciación y análisis.....	48
2.3.4. Inmunoblots del AgB en los estadios adulto y oncosfera.....	48
2.4. Materiales y Métodos para el objetivo 4).....	49
2.4.1. Inmunoblot con AgB recombinante	49
2.4.2. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)	49
RESULTADOS	52
3.1. Objetivo 1) Determinar la variabilidad genética y transcripcional del antígeno B dentro y entre genotipos en el estadio protoescólex de <i>E. granulosus</i>	53
3.1.1. Aislamiento de variantes genómicas del AgB	53
3.1.2. Análisis de las variantes nucleotídicas del AgB	56
3.1.3. Análisis de diversidad nucleotídica e identidad aminoacídica	59
3.1.4. Análisis de secuencias aminoacídicas deducidas	60
3.1.5. Sustituciones sinónimas y no sinónimas.....	61
3.1.6. Análisis de transcripción de las variantes del AgB.....	61
3.2. Objetivo 2) Determinar la localización de la expresión de las subunidades del AgB en el estadio protoescólex	70
3.2.1. Hibridación <i>in situ</i> del AgB.....	70
3.2.2. Producción de AgB recombinantes	71
3.2.3. Producción de anticuerpos monoclonales.....	75
3.2.4. Inmunolocalización del AgB en protoescólex.....	76

3.3. Objetivo 3) Analizar la expresión del antígeno B en los estadíos adulto y oncosfera del parásito.	104
3.3.1. Análisis de expresión por RT-PCR gen específica	104
3.3.2. Análisis de expresión por inmunoblot.....	107
3.4. Objetivo 4) Evaluar la capacidad diagnóstica de diferentes subunidades del AgB como proteínas recombinantes.....	110
3.4.1. Potencial diagnóstico de la subunidad B4.....	110
3.4.2. Potencial diagnóstico de las subunidades B1 y B2.....	112
DISCUSIÓN	119
Variabilidad del AgB	120
Localización del AgB en protoescolices	125
Expresión estadio específica del AgB	128
Potencial diagnóstico del AgB	129
CONCLUSIONES GENERALES	131
APÉNDICE	132
BIBLIOGRAFÍA.....	140

Resumen

Echinococcus granulosus, el agente causal de la hidatidosis quística, existe como un número de genotipos (G1-G10) que difieren en características biológicas de importancia como la especificidad del hospedador intermediario y la infectividad en humanos. En la Argentina se han identificado cinco genotipos (G1, G2, G5, G6 y G7), cuatro de ellos capaces de infectar al hombre. Estos genotipos se agrupan filogenéticamente en tres clusters G1/G2, G5 y G6/G7. Uno de los principales antígenos presentes en el líquido del quiste hidatídico, el antígeno B (AgB) es una lipoproteína oligomérica codificada por una familia de al menos cinco genes (*AgB1*-*AgB5*). El AgB nativo fue ampliamente utilizado en el diagnóstico de la hidatidosis y probablemente esté involucrado en la evasión de la respuesta inmune. Sin embargo la función y localización de esta proteína en el parásito no ha sido descrita con certeza. En esta tesis se muestra que el AgB es extremadamente polimórfico en *E. granulosus*. Cada cluster de genotipos posee diferente tipo y número de secuencias correspondientes al AgB, algunas de ellas bajo presión de selección. El análisis exhaustivo de estas secuencias permitió desarrollar métodos sensibles y específicos para determinar la presencia de transcritos de AgB en los clusters de genotipos y en los estadios del ciclo de vida del parásito. El genotipo G1 expresa los cinco genes, sin embargo en el genotipo G7 se encontraron sólo transcritos funcionales de *AgB1*, *AgB3* y *AgB4*. Las secuencias relacionadas al *AgB2* presentes en el genotipo G7 corresponderían a pseudogenes. Se describió por primera vez la presencia del AgB en oncosferas y adultos, siendo el *AgB3* y *AgB5* los más expresados. Asimismo, se obtuvieron proteínas recombinantes a partir de algunas de las variantes de AgB descritas y se generaron anticuerpos monoclonales subunidad específicos. El análisis en conjunto de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica del estadio protoescólex mostraron una localización del *AgB2* y *AgB4* en tegumento, ventosas, almohadilla rostelar y corpúsculos calcáreos mientras que la localización del *AgB1* se determinó sólo en corpúsculos calcáreos. Las diferentes localizaciones de cada subunidad de AgB podrían indicar un rol diferencial de estas proteínas en el establecimiento y/o supervivencia del parásito. Por último se describe el estudio del potencial de dos de las subunidades de AgB para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis en el marco de la Red Sudamericana de Serología Hidatídica.

Palabras clave: Antígeno B, variabilidad genética, *Echinococcus granulosus*, hidatidosis, inmunolocalización.

Abstract

Echinococcus granulosus, the causative agent of cystic hydatid disease, exists as a number of genotypes (G1-G10) which differ in biological characteristics such as intermediate host specificity and human infectivity. Five genotypes, four of them capable of infecting humans, have been identified in Argentina. These genotypes are grouped by phylogenetic analysis in three clusters, G1/G2, G5 and G6/G7. One of the main antigens present in hydatid cyst fluid is the oligomeric lipoprotein antigen B (AgB), which is encoded by a family of at least five genes (*AgB1-AgB5*). The native AgB has been currently used in immunodiagnosis of cystic hydatid disease and is probably involved in the evasion of the host immune response. However, the function and localization of this protein in the parasite have not yet been precisely described. It is shown, in this PhD thesis, that AgB is highly polymorphic in *E. granulosus*. Each genotype cluster has different type and number of AgB sequences, some of them being under natural selection pressure. The detailed analysis of these sequences derived in the development of more sensitive and specific methods for detecting the presence of AgB in the genotype clusters and in the different stages of parasite's life cycle. The five AgB genes are expressed in G1 genotype, while only *AgB1*, *AgB3* and *AgB4* were found in G7 genotype as functional transcripts. *AgB2* related sequences identified in G7 genotype may probably represent pseudogenes. The expression of AgB in oncospheres and adult worms has been described for the first time, *AgB3* and *AgB5* genes are probably the most expressed in these stages. Recombinant proteins have also been obtained from some of the described AgB variants and monoclonal antibodies have been developed. *In situ* hybridization and immunohistochemical analysis of protoscoleces have shown that *AgB2* and *AgB4* localizes on the tegument, suckers, rostellar pad and calcareous corpuscles, while *AgB1* localizes only on calcareous corpuscles. Differential localization of each subunit could mean that these proteins have different roles in growth and/or survival of the parasite. Finally, two AgB subunits have been analyzed for their potential in immunodiagnosis of human hydatid disease in a collaborative work with the South American Hydatid Serology Network.

Keywords: Antigen B, genetic variability, *Echinococcus granulosus*, hydatid disease, immunolocalization

Introducción

1. Introducción

1.1. *Echinococcus granulosus*

Echinococcus granulosus es un pequeño gusano plano, endoparásito perteneciente a la Clase Cestoda (familia Taeniidae). Presenta un ciclo de vida indirecto que involucra a dos hospedadores mamíferos, uno definitivo (carnívoro) que puede ser el perro, zorro, lobo u otros cánidos y otro intermediario (herbívoro u omnívoro) que incluye al hombre y mamíferos ungulados como ovejas, vacas, cerdos y cabras entre otros. El hospedador intermediario desarrolla quistes hidatídicos por ingestión de huevos presentes en las heces del hospedador definitivo que contaminan el ambiente. El hospedador definitivo se infecta al ingerir protoescólices provenientes de quistes hidatídicos presentes en las vísceras del hospedador intermediario infectado y éstos se diferencian a adulto (figura 1).

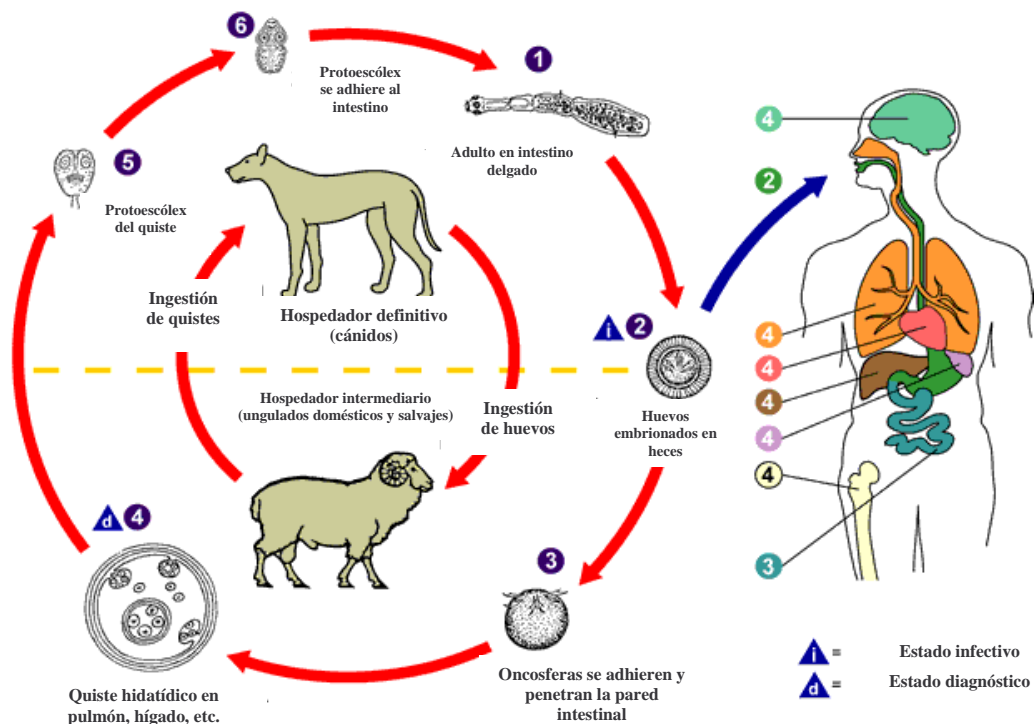


Figura 1: Ciclo de vida de *E. granulosus*. El gusano adulto (1) se aloja en el intestino delgado del hospedador definitivo (cánidos). Las proglótides conteniendo huevos (2) son liberadas en las heces del hospedador contaminando el ambiente. Al ser ingeridos por el hospedador intermediario (ovinos, bovinos, porcinos, equinos, camélidos, humanos, etc.) los huevos liberan la oncosfera (3), que penetra la pared intestinal y migra por el sistema circulatorio o linfático hasta llegar a un órgano (principalmente hígado y pulmón). La oncosfera se diferencia a quiste (4) en el órgano infectado, que crece gradualmente y si el quiste es fértil produce protoescólices (5). El hospedador definitivo se infecta por ingestión de vísceras del hospedador intermediario contaminadas con quistes hidatídicos. Después de la ingestión los protoescólices se evaginan (6) y se adhieren a la mucosa intestinal del hospedador definitivo dónde se desarrollan a gusanos adultos (1). Luego del período prepatente, que varía según la cepa infectante, los gusanos adultos son capaces de liberar huevos infecciosos, cerrando así el ciclo de vida del parásito. Esquema original modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Echinococcosis.htm>

El cestode adulto, se encuentra adherido a la mucosa del intestino delgado del hospedador definitivo, y alcanza una longitud de hasta 7 mm y en general tiene menos de 5 proglótides (figura 2). El tiempo que demora el parásito adulto en alcanzar la madurez sexual es de 3-4 semanas (Thompson, 1995). Los huevos se desarrollan en la última proglótide, el tiempo transcurrido desde que el hospedador definitivo se infecta hasta que libera huevos en las heces (período prepatente) depende del genotipo o cepa de *E. granulosus* infectante.

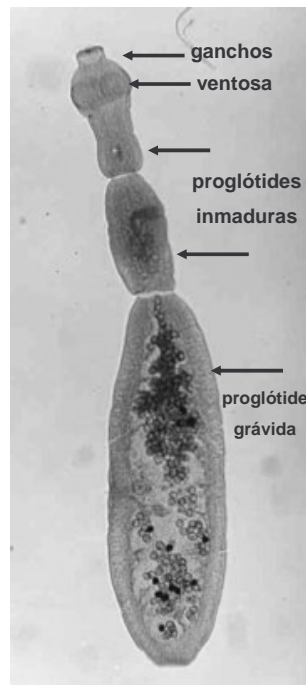


Figura 2. Estadío adulto de *E. granulosus*.

En el estómago del hospedador intermediario el huevo sufre la acción de enzimas digestivas que degradan el embrióforo que recubre a la oncosfera (Thompson, 1995). La oncosfera activada penetra la pared intestinal donde tiene acceso a vasos sanguíneos o linfáticos y es transportada pasivamente hasta que se fija en algún órgano del hospedador (principalmente en hígado y pulmón, en menor frecuencia se encuentran en riñón, hueso, músculo, cerebro y otros sitios). Una vez fijada la oncosfera se diferencia dando origen al quiste hidatídico.

Los quistes son el estadio metacestode o larvario del parásito y tienen un contenido acuoso denominado líquido hidatídico (LH) donde se encuentran proteínas, enzimas, lípidos y otras sustancias. Los quistes son en general uniloculares compuestos por una capa nucleada o germinal interna y una capa acelular o laminar externa (figura 3).

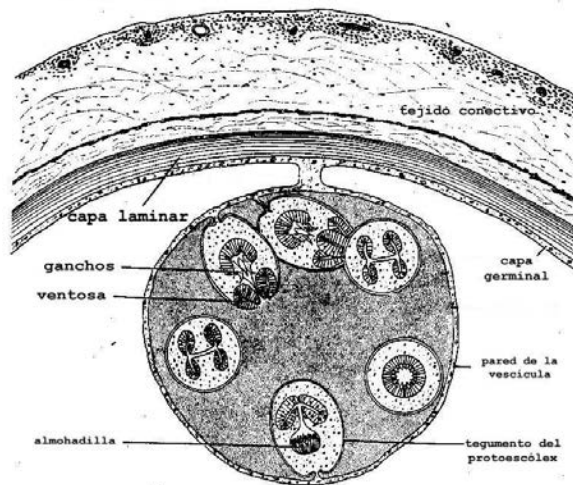


Figura 3. Corte de quiste hidatídico. Modificado de Morseth (1967).

La capa laminar está formada principalmente por mucopolisacáridos asociados a proteínas, ricos en galactosa, galactosamina y glucosamina (Morseth, 1967; McManus & Bryant, 1995). La capa germinal posee una estructura semejante al tegumento del gusano adulto, que consiste en un sincicio citoplasmático distal del cual se proyectan microtrichas (prolongaciones del tegumento) que penetran la capa laminar. En la capa germinal se encuentran varios tipos celulares: células almacenadoras de glucógeno, musculares, tegumentarias y células indiferenciadas de gran capacidad proliferativa (Morseth, 1967; McManus & Bryant, 1995). A partir de estas células se desarrollan las cápsulas prolíferas. Estas se originan como pequeñas masas nucleares, proliferan y se vacuolarizan pudiendo quedar sujetas a la capa germinal por un pedúnculo corto o soltarse en el interior del quiste. Dentro de las cápsulas prolíferas proliferan células indiferenciadas que

resultan en evaginaciones que darán lugar a los protoescólices. Durante todo su desarrollo el protoescólex queda adherido a la capa germinal a través del pedúnculo. Cuando completa su desarrollo el pedúnculo se escinde y el protoescólex infectivo queda libre en el interior del quiste (Galindo *et al.*, 2002). Muchas veces los protoescólices no se producen y en ese caso el quiste es infértil. Dos factores que determinan la fertilidad del quiste son la edad del mismo y la dupla hospedador–genotipo del parásito, por ejemplo la cepa que desarrolla quistes fértiles en ovejas produce quistes mayoritariamente infértiles en cerdos o vacas (Thompson, 1995). En los quistes fértiles los protoescólices permanecen en un estado latente en el interior del quiste hidatídico hasta que la integridad del mismo sea afectada. Cuando los quistes fértiles se rompen liberan los protoescólices dentro del hospedador intermediario y pueden desarrollar nuevos quistes en diferentes órganos, principalmente en el peritoneo, produciendo así la denominada hidatidosis secundaria (Ammann & Eckert, 1995). El LH consiste en una mezcla de componentes bioquímicos, orgánicos e inorgánicos, que van desde iones hasta proteínas. Las proteínas séricas del hospedador, como albúmina y globulinas, son las proteínas mayoritarias (McManus & Bryant, 1995).

El mecanismo de entrada de las proteínas del hospedador al quiste hidatídico no es conocido, podría ser por difusión a través de fisuras de las capas del quiste, por endocitosis o por mecanismos de transporte más específicos (Smyth & McManus, 1989). Asimismo, el mecanismo de salida de macromoléculas del quiste tampoco está definido claramente. Coltorti (1975) sugirió que las microfisuras generadas por daño mecánico modificarían las condiciones locales de permeabilidad del quiste permitiendo la salida de macromoléculas fuera del mismo. Este fenómeno fue estudiado en detalle para determinar la entrada de IgGs del hospedador hacia el interior del quiste y se especula que el mismo mecanismo explicaría la salida de componentes antigénicos desde el parásito hacia el hospedador (Varela- Díaz & Coltorti, 1972, 1973).

1.2. Morfología de los protoescólices de *E. granulatus*

Los estudios de morfología interna de protoescólices realizados mediante microscopía electrónica de barrido por Galindo *et al.* (2002) definieron cuatro regiones morfológicamente distinguibles a lo largo del eje antero-posterior: región del rostellum, región de las ventosas, región del cuello y región del cuerpo (figura 4).

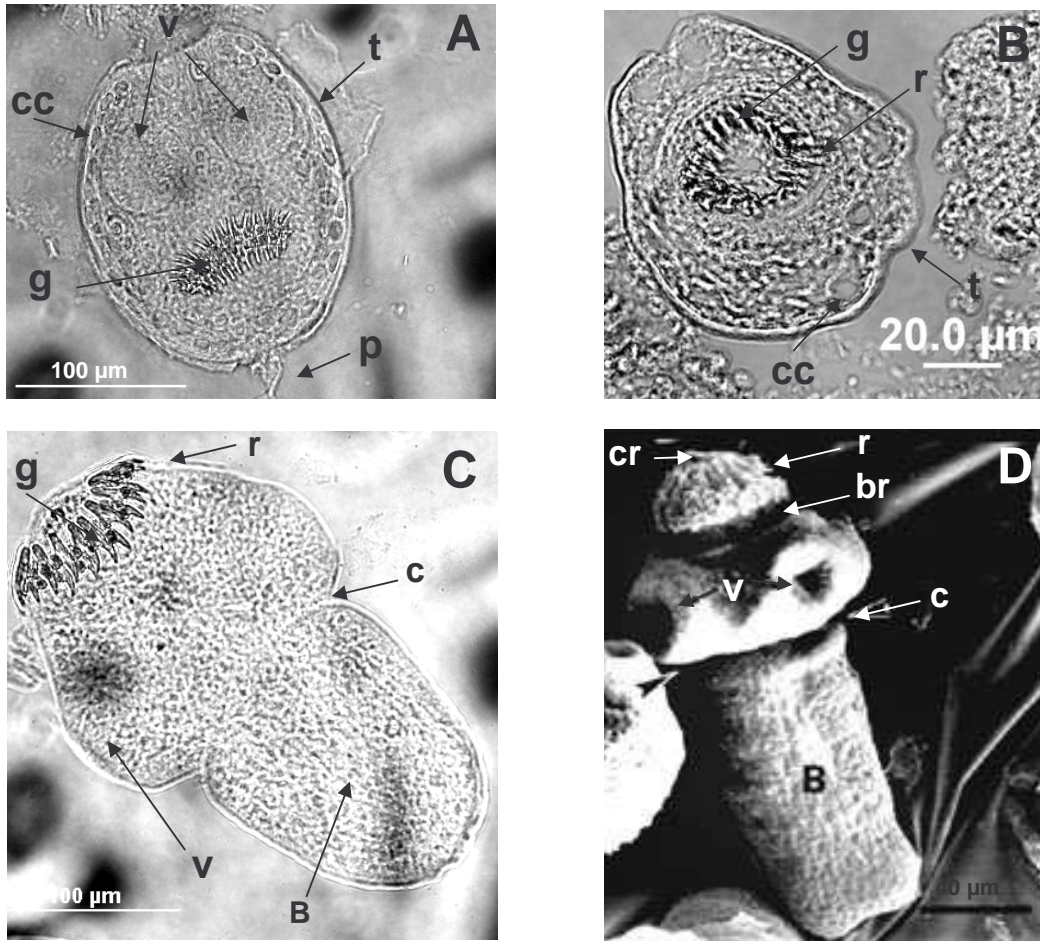


Figura 4. Protoescólices de *E. granulatus*. A, protoescólex invaginado entero microscopía óptica; B, corte de protoescólex invaginado microscopía óptica; C, protoescólex entero evaginado microscopía óptica; D, protoescólex entero evaginado microscopía electrónica de barrido. v: ventosas, cc: corpúsculos calcáreos; t: tegumento; g: ganchos, cr: cono rostellar, r: rostellum, br: base rostellar, c: cuello, p: pedúnculo, B: cuerpo. Panel D: fotografía tomada por Galindo *et al.* (2002).

La región del rostellum comprende el cono rostellar, el rostellum, en el cual se encuentran los ganchos, y la almohadilla o base rostellar. El cono rostellar, el rostellum y los ganchos se encuentran cubiertos por microtrichas. En la región de las ventosas se encuentran cuatro ventosas recubiertas por prolongaciones filamentosas similares a las encontradas en la base rostellar. La región del

cuello es una estructura que une el escólex al cuerpo del protoescólex y corresponde a una zona en donde el parásito ha angostado su tegumento y se ha replegado. La región del cuerpo corresponde a una estructura cilíndrica que abarca aproximadamente el 50% de la longitud total del protoescólex evaginado. En el extremo posterior del cuerpo se encuentra el pedúnculo. Mediante análisis de la estructura celular realizado sobre cortes longitudinales finos se observó que el grosor del tegumento es variable, siendo grueso en la región del rostelo en la zona donde se ubican los ganchos, en cambio en la zona del cono rostelar, base rostelar y ventosas el tegumento es delgado. Posteriormente a partir de la región del cuello el tegumento se engrosa paulatinamente hasta llegar a ser grueso en la región del cuerpo. Las células del cono rostelar son de un solo tipo con prolongaciones citoplasmáticas que varían en longitud y grosor. El territorio celular de la almohadilla rostelar tiene células distribuidas homogéneamente y se observa gran cantidad de estructuras definidas como paquetes de fibras musculares con deposición longitudinal, ubicadas de uno a otro extremo en este territorio. Se observan cuatro tipos celulares, el más abundante corresponde a células musculares, en el citoplasma de estas células, y en forma lateral, se dispone uno o dos paquetes de fibras musculares lisas. El territorio celular de las ventosas también contiene cuatro tipos celulares y al igual que la almohadilla rostelar, presenta una apreciable cantidad de paquetes de fibras musculares orientadas en forma perpendicular al tegumento. En el territorio celular del rostelo-cuello se observa la presencia de corpúsculos calcáreos, ductos colectores, células flamígeras y otros tipos celulares. El territorio celular del cuerpo contiene células flamígeras asociadas a células del ducto que estructuran la red de ductos colectores, corpúsculos calcáreos y paquetes de fibras musculares bajo el tegumento que indicarían la presencia de células musculares en esta zona.

El tegumento de los protoescólices es similar al de adultos y capa germinal de *E. granulosus* (Morseth, 1967, Lascano *et al.*, 1975). Los cestodes carecen de sistema digestivo por lo que absorben todas las sustancias requeridas a través de su cobertura externa o tegumento (figura 5).

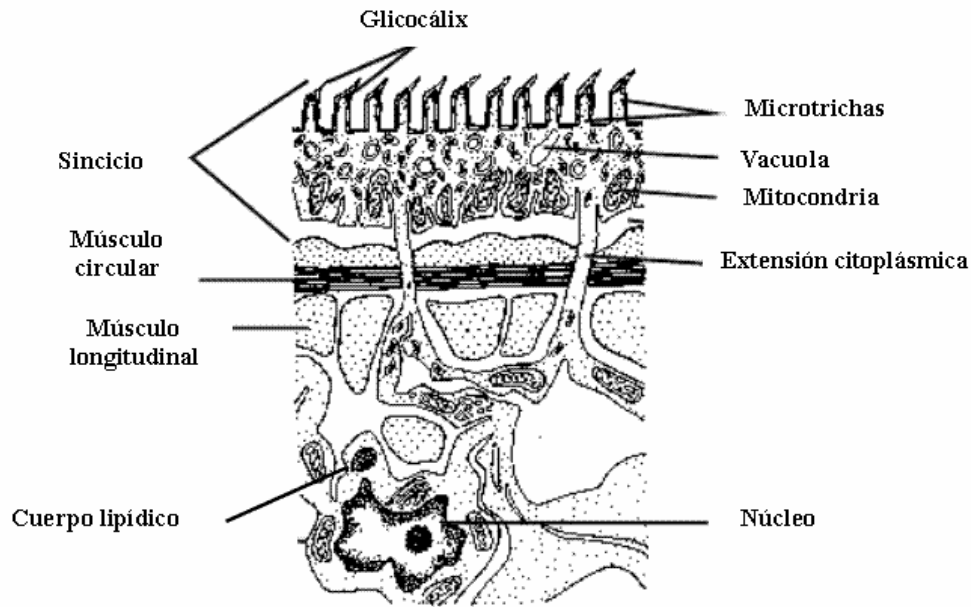


Figura 5. Esquema del tegumento del protoescoléx. Modificado de Morseth, 1967.

La función de absorción puede compararse con la de la mucosa intestinal. El tegumento de los cestodes es una capa sincicial, la membrana plasmática apical de la célula de la mucosa está recubierta por glicocálix compuesto por mucopolisacáridos y glicoproteínas. La composición del glicocálix de *E. granulosus* de genotipo oveja (G1) es significativamente diferente del de genotipo caballo (G4) (Smyth & McManus, 1989). El glicocálix tiene la capacidad de concentrar iones orgánicos e inorgánicos, algunos de ellos servirían para activar enzimas de superficie. Asimismo el glicocálix tiene la capacidad de unir moléculas de alto peso molecular como enzimas digestivas del hospedero aumentando la cinética de absorción de nutrientes. Por debajo del glicocálix se encuentran numerosas microtrichas. Se cree que tienen dos funciones principales, la primera es la de incrementar la superficie de absorción maximizando la cantidad de nutrientes disponibles para el parásito; la segunda es, en el caso de los adultos, la de mantener la localización del parásito en el intestino mediante la flexibilidad de la punta distal de la microtricha (Smyth & McManus, 1989). Por debajo de la capa de microtrichas se encuentra la capa sincicial del tegumento. Esta contiene numerosas vesículas y estructuras membranosas redondeadas electro-densas. En *E. granulosus* se han encontrado seis tipos de vesículas que podrían cumplir diferentes funciones

como contribuir a la formación de microtrichas, ganchos y reparación del tegumento (Bui *et al.*, 1999). El núcleo se encuentra en los cuerpos celulares subtegumentarios, localizados debajo de las capas musculares circular y longitudinal, inmersas entre el tejido del parénquima y la musculatura del mesénquima. Estos cuerpos celulares subtegumentarios también contienen elementos celulares como aparato de Golgi, áreas de almacenamiento de glucógeno y cuerpos lipídicos, que se encuentran conectados con el sincicio externo mediante extensiones citoplasmáticas. La localización de estos importantes elementos celulares lejos de la superficie externa del parásito expuesta al ataque inmunológico del hospedero es una importante adaptación del ciclo de vida del parásito.

Los cestodes son capaces de producir minerales sólidos que se encuentran en los llamados corpúsculos calcáreos (figura 6).



Figura 6. Corpúsculo calcáreo de *Taenia taeniaeformis*. El corpúsculo calcáreo fue descalcificado antes de ser observado al microscopio electrónico. Se muestran las capas internas concéntricas de la matriz (ci) y la capa externa que rodea el corpúsculo (ce). X9000. Figura modificada de Von Brand & Nylén, 1970.

Estudios realizados *in vitro* sobre adultos de *E. granulosus* por Pawlowski *et al.* (1988) sugieren un origen nuclear y citoplasmático de los corpúsculos calcáreos lo que implicaría la co-existencia de al menos dos mecanismos diferentes en su formación. Inicialmente los corpúsculos calcáreos se formarían en el citoplasma de células vacías, a esto le seguiría una deposición gradual de material calcáreo en capas concéntricas dando los corpúsculos calcáreos maduros. Alternativamente la mineralización de los

corpúsculos calcáreos podría darse durante la cariocinesis del núcleo que luego se desarrollaría en un corpúsculo calcáreo maduro. No todos los cestodes comparten este mecanismo de formación de corpúsculos calcáreos, por ejemplo en *Taenia solium* la formación de corpúsculos calcáreos ocurre extracelularmente, en el lumen de los ductos protonefridiales de manera similar a la propuesta para trematodos (Vargas-Parada *et al.*, 1999a). Los corpúsculos calcáreos tienen un tamaño promedio de 12 μm , los de *E. granulosus* llegan a tener 32 μm y representan el 14 % del peso seco del organismo, su número, forma y composición química varía entre diferentes especies de cestodes así como dentro de una misma especie (Smyth & McManus, 1989). Estudios de microscopía electrónica realizados en *Taenia taeniaeformis* muestran que los corpúsculos calcáreos poseen una envoltura compuesta por una capa externa con componentes remanentes de la célula que dio origen al corpúsculo calcáreo. En el interior del corpúsculo calcáreo se encuentran capas concéntricas de material orgánico. El mecanismo de biomineralización de la matriz se denomina “mediado por matriz orgánica” e involucra una estructura sobre la cual los iones son introducidos activamente e inducidos a cristalizarse (Vargas-Parada *et al.*, 1999a). Esta matriz contiene ADN, ARN, fosfatas alcalina, proteínas, varios tipos de lípidos que incluyen glicerol, fosfolípidos y esteroides que probablemente correspondan a colesterol, polisacáridos similares a glucógeno y mucopolisacáridos. Las proteínas son relativamente poco abundantes y provendrían de la célula que dio origen al corpúsculo calcáreo, no encontrándose colágeno, proteína usualmente asociada a procesos de calcificación en vertebrados e invertebrados (Von Brand & Nylen, 1970). Los minerales comúnmente encontrados en los corpúsculos calcáreos son calcio, magnesio, fosfato y carbonato, usualmente organizados en anillos concéntricos.

La función de los corpúsculos calcáreos en el organismo de los cestodes es controversial. Se ha sugerido que podrían actuar movilizando carbonato actuando como “buffer” compensando la gran cantidad de ácidos orgánicos producidos en el metabolismo del tejido del adulto (Smyth & McManus, 1989). Otra sugerencia es que actuarían como reservorio de iones y dióxido de carbono que estarían disponibles cuando la oncosfera penetra al intestino del hospedero y necesita inmediata síntesis de ATP para crecer, transportar

activamente nutrientes y adherirse al intestino. También se sugiere un rol en el metabolismo de los lípidos, reparación de tejidos y balance osmótico. Asimismo se sugiere que podrían ser excretados observándose expulsión de corpúsculos calcáreos a través del tegumento de tetrathyridios de *M. cortii* y *M. vogae* (Vargas-parada *et al.*, 1999b; Etges & Marinakis, 1991). Estudios de organización celular durante el desarrollo de los protoescólices realizados por Martínez *et al.* (2004) muestran que los corpúsculos calcáreos se encuentran ausentes en los brotes que dan origen a los protoescólices pero están claramente presentes, rodeados por pequeños grupos de células, en protoescólices desarrollados. Luego disminuyen significativamente en número cuando éstos se evaginan y se desarrollan a adultos, lo cual sugeriría un rol de importancia de los corpúsculos calcáreos en el desarrollo de los protoescólices y el establecimiento del parásito en el hospedero definitivo. Asimismo, se sugiere un rol inmunológico encontrándose factores anticomplemento en los corpúsculos calcáreos. Estudios de cultivo de protoescólices de *E. granulosus* y *E. multilocularis* realizados por Kassis & Tanner (1976) muestran que el suero de diversas especies de hospederos es capaz de lisar a los parásitos luego de 15 minutos de cultivo. La actividad lítica es inhibida por calentamiento a 56°C, incubación con 0,01 M EDTA ó incubación con veneno de cobra a 37°C lo cual indicaría una actividad de proteínas de complemento. Si se adiciona líquido hidatídico al suero usado en cultivo la lisis de protoescólices disminuye significativamente. Si se filtra el líquido hidatídico empleado éste pierde la capacidad de proteger a los protoescólices de la lisis. La fracción filtrada que retiene la capacidad de proteger de lisis por complemento contiene principalmente corpúsculos calcáreos.

1.3. Genotipos de *E. granulosus*

La variación genética presente en muchas especies de parásitos patógenos para el hombre puede relacionarse muchas veces con diferencias en la epidemiología de la enfermedad y sus manifestaciones clínicas (de Meeûs, 1998). Por tal motivo es importante profundizar los estudios en las variaciones encontradas dentro de *E. granulosus*. Este parásito posee un alto

grado de divergencia genética, encontrándose hasta 10 genotipos (o cepas) descritos (ver una revisión en Jenkins *et al.*, 2005). En la tabla 1 se muestran los genotipos determinados mediante técnicas de biología molecular que incluyen, entre otras, secuenciación parcial de los genes CO1 y ND1 mitocondriales, RFLP del gen ITS1 ribosomal, PCR-SSCP del gen MDH, etc. (para una revisión ver Thompson & McManus, 2001). Como puede observarse, los genotipos de *E. granulosus* difieren en características de importancia biológica y epidemiológica como la infectividad en humanos, período prepatente y la distribución geográfica, entre otras. Recientemente se ha analizado la variabilidad de la proteína Eg95 utilizada para inmunizar al hospedero intermediario, encontrándose que los genotipos G6 y G7 difieren en su secuencia aminoacídica respecto a los genotipos G1 y G2. Estas sustituciones podrían afectar la antigenicidad y por lo tanto la eficacia de la vacuna contra determinados genotipos (Chow *et al.*, en preparación) y refuerzan la importancia de la caracterización de los genotipos de *E. granulosus*.

Existen dos genotipos específicamente adaptados al hospedero oveja, G1 y G2. Sin embargo también pueden infectar otras especies de hospederos, aunque con menor porcentaje de fertilidad de los quistes. El genotipo G1 se encuentra presente en todos los continentes en áreas de cría de ovinos. La presencia de este genotipo coincide con una alta prevalencia de hidatidosis en humanos (Thompson & McManus 2001, Eckert *et al.* 1997). La ubicación de los quistes es principalmente hígado y pulmón (Thompson & Lymbery, 1988). El genotipo G2, tiene una distribución geográfica más acotada, hasta el momento se lo encontró sólo en el estado australiano de Tasmania y en la Argentina (provincia de Tucumán) (Rosenzvit *et al.*, 1999). El período prepatente es significativamente más corto, el adulto desarrolla huevos aproximadamente 7 días antes (39 días post infección) que la cepa oveja (45 días post-infección) (Kumaratilake *et al.*, 1983). El genotipo G3 está definido por técnicas moleculares y no hay estudios que caractericen su infectividad y desarrollo (Thompson, 1995). El genotipo G4 tiene tanto diferencias morfológicas, de desarrollo y metabólicas como de especificidad de hospedador respecto al genotipo G1, infecta sólo a caballos u otros equinos y los datos epidemiológicos sugieren que no es patógena para el hombre (Thompson & McManus, 2001). El

genotipo G5 también difiere en caracteres morfológicos y período prepatente (33-35 días) respecto al genotipo G1 y en la localización de los quistes, que es preferentemente pulmonar. El genotipo G5 se ha caracterizado en tres casos humanos, uno de ellos proveniente de Holanda (Bowles *et al.*, 1992) y dos en Argentina (Gutiérrez *et al.*, 2002). El genotipo G6 infecta al hombre (Rosenzvit *et al.*, 1999) tiene un período prepatente de 40 días produciendo quistes fértiles predominantemente en pulmón (Eckert & Thompson, 1997). Su ciclo de vida es importante en zonas donde se faenan camellos y cabras. El genotipo G7 posee un período prepatente extremadamente corto (34 días) y se cree que podría variar en su capacidad para infectar humanos respecto a G1 ya que en estudios hechos en Polonia donde hay un alto porcentaje de cerdos y perros infectados, se reportan muy pocos casos humanos con esta cepa (Pawlowski *et al.*, 1993; Kedra *et al.*, 1999). El genotipo G8 se encuentra en regiones subárticas de Europa, Asia y Norteamérica, no infecta a ungulados domésticos como el resto de los genotipos sino que afecta a cérvidos silvestres (*Alces alces*), el principal hospedador definitivo es el lobo y la mayoría de los casos humanos reportados son asintomáticos (Thompson & Lymbery, 1988), aunque recientemente un único caso grave fue caracterizado con este genotipo (McManus *et al.*, 2002). El genotipo G9 fue encontrado en humanos provenientes de Polonia pero todavía no se encontraron hospedadores intermediarios naturales con este genotipo (Scott *et al.*, 1997). Por último el genotipo G10 encontrado en cérvidos de Finlandia difiere en varios marcadores moleculares respecto al genotipo G8 y se lo caracterizó como nuevo genotipo (Lavikainen *et al.*, 2003).

Tabla 1. Características de los diferentes genotipos de *E. granulosus*.

Genotipo (cepa)	Hospedador definitivo	Hospedador intermediario	Infectividad en humanos	Período prepatente
G1 (oveja)	perro, zorro, dingo, lobo, chacal, hiena	oveja, cabra, vaca, búfalo, camello, cerdo, macrópodos	sí	45 días
G2 (oveja de Tasmania)	perro	oveja, vaca	sí	39 días
G3 (búfalo)	perro, zorro?	búfalo, vaca?	?	?
G4 (caballo)	perro	caballo, otros equinos	no	mayor que G1
G5 (vaca)	perro	vaca	sí	33-35 días
G6 (camello)	perro	camello, cabra, vaca	sí	40 días
G7 (cerdo)	perro, zorro?	cerdo, jabalí	?	34 días
G8 (cérvido)	lobo, perro	cérvidos	sí	?
G9	?	?	sí	?
G10 (cérvido de Finlandia)	?	cérvidos	?	?

Genotipo: Determinado mediante técnicas moleculares. **?:** no determinado o bajo número de muestras analizadas. Refs.: Bowles *et al.*, 1992; Bowles & McManus, 1993a; Bowles & McManus, 1993b; Bowles & McManus, 1993c; Bowles *et al.*, 1994; Eckert & Thompson, 1997; Scott *et al.*, 1997; Kedra *et al.*, 1999; Rosenzvit *et al.*, 1999; Kedra *et al.*, 2000; Snäbel *et al.*, 2000; Lavikainen *et al.*, 2003.

1.4. Distribución geográfica y epidemiología de *E. granulosus*

La hidatidosis es una enfermedad que presenta distribución cosmopolita. Se la encuentra en todos los continentes, teniendo índices de prevalencia variados. Si bien no hay datos de la prevalencia mundial de la enfermedad, es un problema de salud pública en muchas partes del mundo con alta prevalencia en regiones de Europa, Asia, África, Australia y Sudamérica (figura 7) (Eckert & Deplazes, 2004).

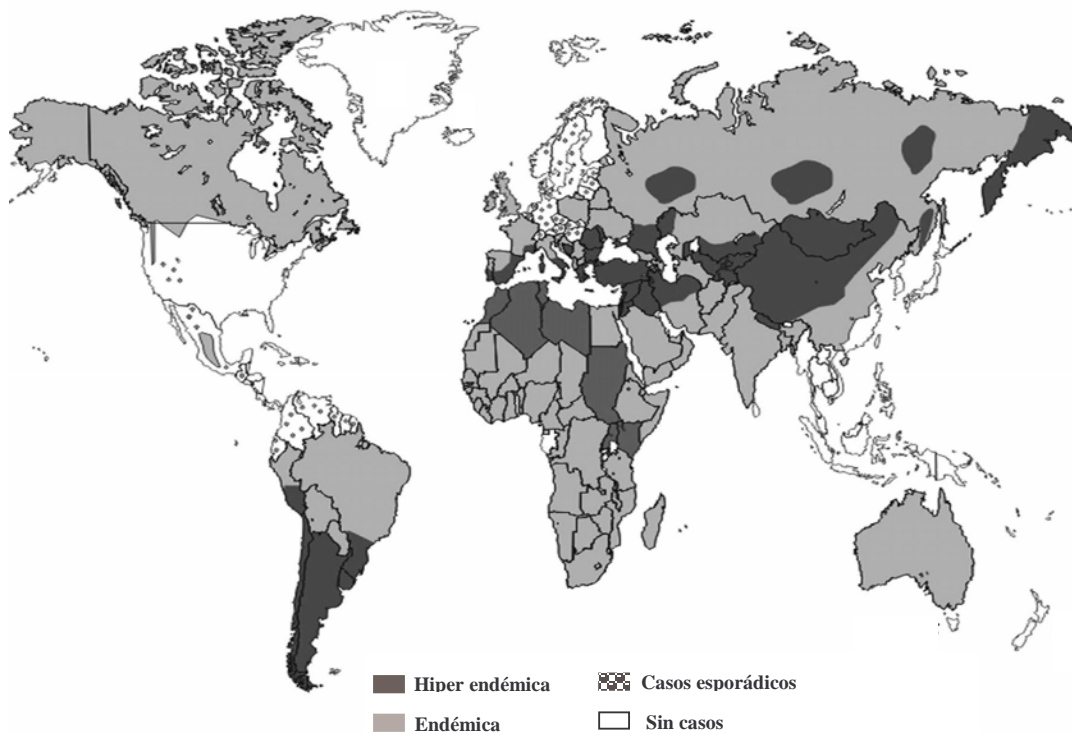


Figura 7. Distribución geográfica global de la infección por *E. granulosus*. Modificado de Eckert & Deplazes, 2004.

En África del Este es altamente endémica entre las tribus nómades pastoriles. La transmisión a humanos se atribuye a factores como la prevalencia del parásito en perros domésticos, comportamiento humano frente a los perros, heterogeneidad del parásito y susceptibilidad de los humanos a la infección (Magambo *et al.*, 2006). Los hospederos intermediarios principales son ovejas, cabras y camellos, encontrándose al menos cuatro genotipos, G1, G4, G5 y G6. En humanos los genotipos encontrados fueron G1 y G6 (Bart *et al.*, 2004). En Asia central la hidatidosis se volvió endémica luego del colapso

de la Unión Soviética, llegando a una incidencia quirúrgica de 10 casos por 100.000. Sin embargo estos datos oficiales subestiman los casos reales, ya que por ejemplo en Uzbekistán en el año 2001 se denunció oficialmente 819 casos quirúrgicos, sin embargo un análisis detallado de los registros hospitalarios revela más de 4000 casos. Los principales afectados son niños y adultos desempleados. Los reservorios de la enfermedad son los perros rurales asociados a la faena de ovejas, con una prevalencia cercana al 25% (Torgerson *et al.*, 2006). En China, desde 1950, fueron reportados cerca de 35.000 casos de hidatidosis humana, sin embargo este número probablemente sea mayor debido a que muchas personas no tienen acceso a tratamiento médico. Estudios ultrasonográficos revelaron una alta prevalencia de la enfermedad en la región este del Tibet. Asimismo se reportan altas tasas de infección en el ganado y perros domésticos (Jenkins *et al.*, 2005). En la región Mediterránea la enfermedad es frecuente y re-emergente en Bulgaria y Gales debido probablemente al fracaso de las campañas de control, siendo G1 el principal genotipo presente en humanos (Romig *et al.*, 2006). En Australia el ciclo de *E. granulosus* se desarrolla principalmente en animales salvajes, siendo el ciclo de transmisión principalmente perpetuado por perros salvajes (dingos) y marsupiales macrópodos (wallabies y canguros). Este ciclo ayuda a mantener el ciclo doméstico, ya que el hospedero definitivo salvaje contamina con heces infectadas el ambiente donde el ganado y los humanos se alimentan. El genotipo encontrado fue el G1 en ambos ciclos (Jenkins, 2006). En América se encuentra la enfermedad a lo largo de todo el continente, desde Alaska a Tierra del Fuego. En Canadá y Alaska el ciclo del parásito es silvestre, siendo el hospedador intermediario el cérvido y el hospedador definitivo el lobo. El hombre adquiere la enfermedad debido a que alimenta con vísceras infectadas a los perros domésticos. El genotipo encontrado es G8. En Sudamérica, dónde es endémica, se operan más de 2000 casos humanos nuevos por año, que incluyen 464 en Argentina (1,42/100.000 habitantes), 367 en Uruguay (12,4/100.000), 573 en Chile (3,4/100.000) y 244 en Perú (2,4/100.000). En el sur de Brasil (Rio Grande do Sul) un estudio realizado entre 1981 y 1999 reveló 712 casos quirúrgicos (Moro & Schantz, 2006). Sin embargo el número de operaciones subestima el número real de personas que tienen la enfermedad, por ejemplo, realizando ensayos de sero-reactividad con

la prueba de doble difusión de Arco5 las prevalencias son: 2050/100.000 en el sur de Argentina y 5800/100.000 en el sur de Brasil (Eckert *et al.*, 2000). Asimismo en áreas rurales y reservas indígenas de la Argentina, provincias de Río Negro, Chubut y Neuquén, se encuentran altos niveles de prevalencia: 6000 a 14.900/100.000 habitantes, detectadas mediante ultrasonografía abdominal (Larrieu *et al.*, 1999).

1.5. Genotipos presentes en la Argentina

En la Argentina, recién en 1999, se determinaron mediante técnicas moleculares 4 genotipos de *E. granulosus* (Rosenzvit *et al.*, 1999). Los genotipos encontrados fueron: G1, G2, G6 y G7. El análisis posterior de 134 aislamientos de *E. granulosus* mediante secuenciación del gen mitocondrial CO1, SSCP-PCR del gen MDH citosólico y Southern blot de un elemento repetido mostró que los quistes hidatídicos encontrados en las diferentes provincias de la Argentina son producidos por los genotipos G1, G2 en oveja, G1, G2 y G5 en vaca, G6 en cabras y G1 y G7 en cerdos (Kamenetzky *et al.*, 2002). Los estudios de fertilidad muestran que el genotipo G1 produce una gran proporción de quistes fértiles (75%) en ovejas mientras que la fertilidad en otros hospederos como vaca y cerdo es menor (20 y 25 % respectivamente). Por otro lado, todos los quistes de vacas con genotipo G5 analizados fueron fértiles. El genotipo G7 se detectó sólo en cerdos con una fertilidad del 62%. Asimismo se analizaron gusanos adultos provenientes de perros y se detectaron todos los genotipos encontrados en hospedadores intermediarios excepto G2. Desafortunadamente no pudieron analizarse perros de la provincia de Tucumán, la única provincia donde se encontró dicho genotipo. Cabe destacar, además, que se detectaron adultos de dos genotipos diferentes, G1 y G6 en un mismo perro. En la Argentina, los casos humanos de hidatidosis son producidos por cuatro de los cinco genotipos encontrados: G1, G2, G5 y G6. La mayoría de ellos de genotipo G1 llegando al 55% de los casos. Sin embargo el genotipo G6 se encontró en una gran proporción de infecciones humanas (34% de los casos). Los genotipos G5 y G2 se encontraron en pocos casos humanos, 9,5 y 1,5 % de los casos, respectivamente. El genotipo G7 no se

detectó en casos humanos a pesar de encontrarse en cerdos y perros. La distribución geográfica de los genotipos puede observarse en el mapa de la figura 8. El genotipo G1 muestra una amplia distribución geográfica, encontrándose en casi todas las provincias analizadas, el genotipo G2 está restringido a la zona noroeste de la provincia de Tucumán. El genotipo G7 fue encontrado principalmente en la región de la Pampa reflejando, probablemente, la mayor abundancia de faena porcina.

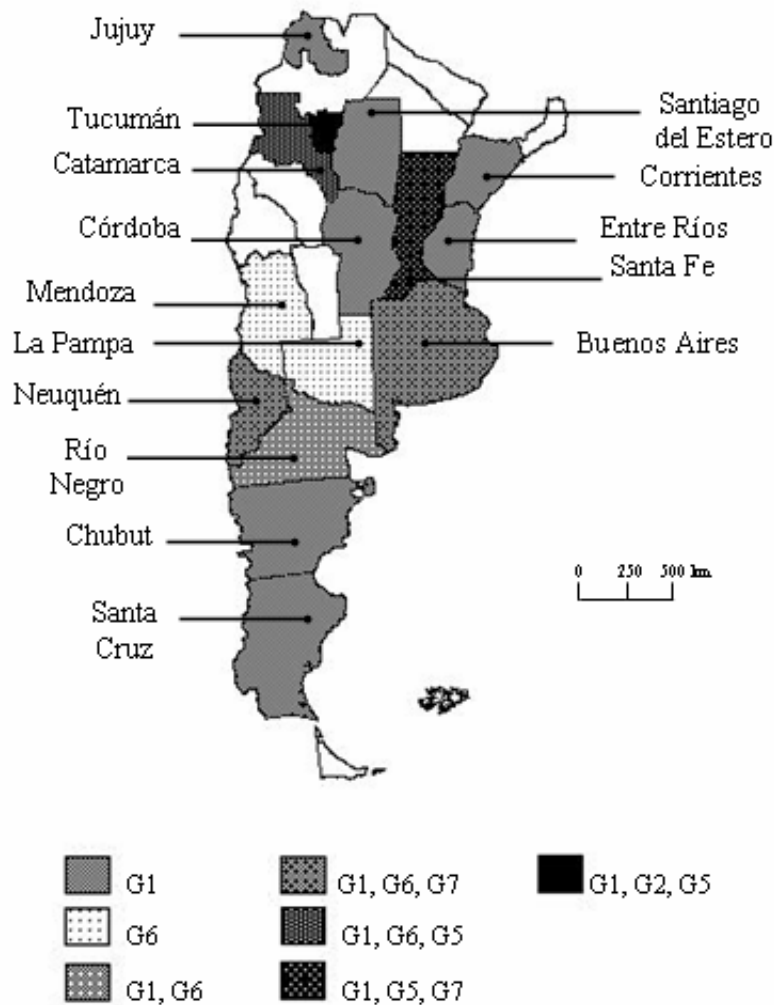


Figura 8. Mapa de la República Argentina. Se indica con diferentes texturas los genotipos presentes en las diferentes provincias. Modificada de Kamenetzky *et al* (2002).

Los resultados obtenidos con cinco marcadores moleculares empleados en nuestro laboratorio y laboratorios colaboradores se muestran en la tabla 2. Puede observarse que los marcadores clasifican en forma coincidente a los genotipos de *E. granulosus*. Por lo tanto, pueden utilizarse de forma complementaria para confirmar genotipos y para analizar las variaciones dentro de las cepas (Kamenetzky *et al.*, 2002; Bartholomei-Santos *et al.*, 2003; Roratto *et al.*, 2006). Los marcadores MDH y los dos microsatélites empleados tienen la ventaja adicional de ser útiles para realizar estudios poblacionales ya que permiten discriminar entre individuos homo y heterocigotas (Haag *et al.*, 1998; Kamenetzky *et al.*, 2002; Bartholomei-Santos *et al.*, 2003; Roratto *et al.*, 2006). La utilidad del marcador mitocondrial CO1 y del microsatélite snRNA U1 fue corroborada posteriormente por Bart *et al.*, (2003) para clasificar aislamientos provenientes de África.

Tabla 2. Muestras analizadas mediante los cinco marcadores moleculares: mitocondrial (CO1), regulatorio nuclear (MDH), elemento repetido nuclear no transcrito (TREG) y microsatélites (Egmsca1 y snRNA U1).

Hospedero	Genotipo CO1	Alelos MDH	Patrón TREG	Alelos Egmsca1	Patrón snRNA U1
Humano, vaca, oveja	G1	A1, A2, A8	NL	CA ₈₋₁₀	o1, o2, o3, o4, o5, o6, o7, o8, o9
Humano, vaca, oveja	G2	A1, A2	NL	CA ₈₋₁₀	o1, o3, o6
Humano, vaca	G5	A3	H	CA ₇ *	b1, b2*
Humano, cabra	G6	A4	L	CA ₇	c
Cerdo	G7	A4	L	-	-

-: no analizado; *muestras de Brasil (Rio Grande do Sul); Patrones TREG: NL, patrón no tándem; H: patrón de banda única; L, patrón en tándem.

El marcador CO1 sería el de elección a la hora de tipificar genotipos, por su sensibilidad en la detección de todos los genotipos existentes y por la disponibilidad, en bases de datos gratuitas, de secuencias de este tipo de casi

todos los organismos conocidos, lo que determina que cada nueva secuencia CO1 obtenida pueda ser evaluada con gran exactitud. Asimismo, el análisis filogenético realizado con este marcador arrojó una distribución de genotipos coincidente con la observada por Obwaller *et al.* (2004) donde las cepas G1 y G2 se clasifican como un cluster mientras que las cepas G6 y G7 forman otro. La cepa G5 queda fuera de estos dos clusters pero cercana al de G6/G7 (figura 9). Es por ello que en las siguientes secciones del trabajo se las considerará como cluster G1/G2, cluster G5 y cluster G6/G7.

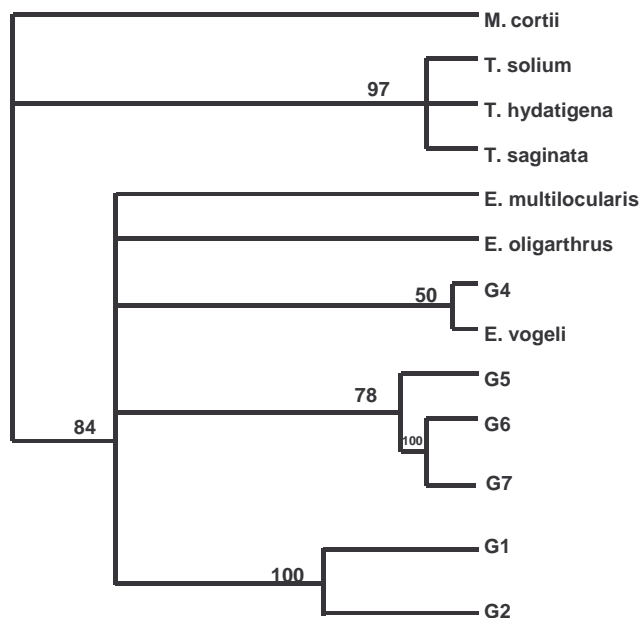


Figura 9. Árbol filogenético obtenido utilizando las secuencias del gen CO1 de los genotipos y especies de *Echinococcus*. El método empleado fue el de máxima parsimonia. Los números en los nodos representa el porcentaje de ocurrencia de clados en 1000 réplicas de *bootstrap* de los datos. El árbol se construyó utilizando el programa PAUP 4.0b8. Modificada de Kamenetzky *et al.* (2002).

Recientemente se reconstruyó la relación filogenética de miembros del género *Echinococcus* mediante la obtención y análisis de los genomas mitocondriales de todas las especies y cepas disponibles (Nakao *et al.*, 2006). Dicho análisis sugiere una revisión en la clasificación de los genotipos de *E. granulosus* que quedarían definidos como: *E. granulosus* sensu stricto (genotipos G1, G2 y G3), *E. equinus* (genotipo G4), *E. ortleppi* (genotipo G5) y *E. canadensis* (genotipos G6, G7, G8, G9 y G10), aunque la pertenencia de

ciertos genotipos en esta última especie se encuentra en discusión. Las demás especies del género serían: *E. oligarthrus*, *E. vogeli*, *E. multilocularis* (Thompson *et al.*, 1995) y la recientemente descrita *E. shiquicus* (Xiao *et al.*, 2005).

1.6. Hidatidosis

Las características de la hidatidosis dependen fundamentalmente del estado biológico del quiste. Generalmente el desarrollo del quiste es lento y la sintomatología aparece después de muchos años. Esta sintomatología no es típica y puede asemejarse a la de cualquier tumoración del órgano afectado (Atías; 1991). El crecimiento del quiste hidatídico puede provocar presión en tejidos adyacentes o inducir otras alteraciones patológicas. La respuesta de los tejidos vecinos al quiste difiere según se trate de vesícula sana, complicada o no viable.

En el hombre es aún desconocido el tiempo mínimo para que se desarrollen protoescólices en los quistes. La importancia de la fertilidad del quiste está dada por el peligro de que se produzca una rotura del quiste espontánea, por un traumatismo, o provocada en forma accidental en el curso de la intervención quirúrgica dando una hidatidosis secundaria. Además la ruptura del quiste puede provocar un shock anafiláctico, los síntomas dependen, entre otros factores, de la localización del quiste. Otra complicación de la enfermedad es la infección que puede producirse por la llegada de gérmenes a través de pequeñas comunicaciones con la vía canalicular, bronquios o conductos biliares, en el caso de que los quistes sean de localización pulmonar o hepática respectivamente. La sintomatología en este caso es fiebre y leucocitosis. La naturaleza crónica de la hidatidosis junto con el gran tamaño que adquiere el quiste hidatídico sólo puede alcanzarse con un complejo control de los procesos inflamatorios del hospedero.

La hidatidosis incluye las siguientes consecuencias socio económicas: costo del diagnóstico, cirugía, hospitalización, drogas, pérdida de días de trabajo, disminución de la calidad de vida y mortalidad. Los casos fatales de hidatidosis tienen un rango de 1-2% (Battelli, 2004). En la región Mediterránea y en Latinoamérica se estima que la duración de la hospitalización va desde 2

semanas a más de un mes en el caso de que haya cirugía. Los costos se ven incrementados debido a que si bien se sigue controlando a los pacientes durante 10 años post diagnóstico/tratamiento y en muchos casos se los medica con albendazol, la reaparición de quistes es cercana al 25% de los casos.

En el ganado las consecuencias socio económicas son las siguientes: reducción en el rendimiento y calidad de carne, leche y lana, reducción de tasa de nacimiento, retardo en crecimiento, costo de eliminación de vísceras contaminadas y animales muertos. Asimismo los costos aumentan si se considera la pérdida de posibilidad de exportación en el caso que se exija animales libres de hidatidosis. En Italia, durante 1982 se calculó en el ganado ovino una pérdida del 7-10% de rendimiento de leche, 5-20% de carne y 10-40% de producción general (Battelli, 2004).

1.7. Diagnóstico de la hidatidosis en humanos

En el hombre, la detección temprana de la enfermedad provee una sustancial mejora en la calidad del manejo y tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de la hidatidosis en humanos es difícil y generalmente tardío, lo que determina que cuando la enfermedad es detectada, se deba recurrir a la cirugía debido a la limitada eficacia de la quimioterapia (McManus *et al.*, 2003). El diagnóstico se basa en la identificación de estructuras quísticas mediante técnicas de imagen (ultrasonografía, tomografía computada, rayos-X). Luego son confirmadas utilizando antígenos específicos mediante las técnicas de arco-5, inmunolectroforesis o inmunoblot (Lightowers & Gottstein, 1995). Asimismo las técnicas inmunológicas utilizadas en ensayos de *screening* usando antígenos crudos incluyen aglutinación en látex, doble difusión, hemoaglutinación indirecta y ELISA entre otras y son de utilidad en estudios epidemiológicos de la hidatidosis en distintas áreas endémicas (McManus *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2003). El líquido hidatídico es la principal fuente antigénica para el inmunodiagnóstico primario de la hidatidosis humana y también para el seguimiento de pacientes bajo tratamiento o luego de la cirugía (Carmena *et al.*, 2006). Sin embargo este extracto presenta algunos problemas, de especificidad, por tratarse de mezclas complejas de antígenos parasitarios y del hospedador, y de sensibilidad, por las bajas concentraciones

de los componentes más antigénicos. Es particularmente problemática la reactividad cruzada con sueros de pacientes infectados con otros helmintos, principalmente *E. multilocularis* y *Taenia solium* (Legatt *et al.*, 1992). A pesar del uso de técnicas específicas y sensibles, el diagnóstico de la hidatidosis tiene hasta un 25% de falsos negativos. Es por ello que es de interés generar antígenos recombinantes para el diagnóstico serológico de la hidatidosis. Además, las muestras naturales proveen por lo general cantidades escasas de material parasitario y ni el cultivo *in vitro* del parásito ni su mantenimiento en animales de laboratorio permiten la obtención de cantidades razonables de antígenos. Otros factores que dificultarían la obtención de ensayos estandarizados es el uso de serotecas, técnicas y antígenos diferentes. Asimismo debe tenerse en cuenta que la variación de las fuentes antigénicas podrían deberse a diferencias intra-específicas (Zhang *et al.*, 2003a).

Las principales proteínas utilizadas en el inmunodiagnóstico son el antígeno 5 (Ag5) (Lightowers *et al.*, 1989) y el antígeno B (Oriol *et al.*, 1971). Ambos han sido exhaustivamente evaluados para el diagnóstico de la hidatidosis, pero como surge de la revisión de Carmena *et al.* (2006) presentan valores de sensibilidad y especificidad discordantes y contradictorios. El Ag5 es una glicoproteína termolábil que en condiciones reductoras se disocia en dos subunidades, una de 38 y otra de 22 kDa, este antígeno se utiliza en el ensayo de arco 5 sin embargo un 10 a 40% de pacientes confirmados por cirugía no presentan anticuerpos anti-Ag5 detectables, además presenta reacción cruzada con anticuerpos generados por otras parasitosis (Schantz & Gottstein, 1986). Asimismo, se ha determinado que los glúcidos presentes en la subunidad mayor son inmunodominantes (Lorenzo *et al.*, 2005a) por lo que su producción como proteína recombinante en *Escherichia coli* carece de valor práctico para el diagnóstico. El potencial diagnóstico del AgB se desarrolla en el ítem 1.11.

1.8. Importancia de las proteínas de secreción

Las proteínas de secreción y de membrana (S/M) de los parásitos están involucradas en un amplio rango de funciones incluyendo la penetración y establecimiento en tejidos del hospedador, modulación de la respuesta inmune

e incorporación de metabolitos del hospedador. Debido a su potencial exposición al sistema inmune del hospedador, las proteínas S/M son candidatos para el mejoramiento de ensayos diagnósticos, desarrollo de drogas anti-parasitarias y descubrimiento de vacunas. Asimismo la profundización de los estudios de variación de estas proteínas permitiría conocer los mecanismos de adaptación de los parásitos en sus hospedadores específicos. Sin embargo no hay mucha información al respecto especialmente en cestodes. En *E. granulosus* se estudiaron varias proteínas S/M con una función importante en la biología del parásito y/o en la aplicación al control de la hidatidosis quística. Algunas de ellas son el Antígeno 5 (Ag5) y el Antígeno B (AgB), citados en el ítem anterior, la proteína EG95 que posee una secuencia señal de secreción y un motivo de anclaje GPI ha sido usada para inmunizar diferentes especies de hospedadores intermediarios (Lightowers *et al.*, 2004) y recientemente se han descrito polimorfismos de secuencia en los genotipos de *E. granulosus* (Chow *et al.*, en preparación) y una de las isoformas de la proteína 14-3-3, secretada por el gusano adulto, también postulada como candidato a vacuna (Siles-Lucas *et al.*, 2003). Asimismo el análisis transcripcional del metacestode reveló que del 11 al 27% de los ADN copia provenientes de protoescólices y pared del quiste contienen putativas secuencias señales amino terminal (Fernández *et al.*, 2002). Asimismo con el objetivo de identificar funcionalmente nuevos genes que codifiquen para proteínas S/M se aplicó la técnica de atrapado de secuencias señal (*signal sequence trap, SST*) en protoescólices y se identificaron varios ADN copias cuyas secuencias aminoacídicas deducidas tienen similitudes con transportadores de aminoácidos, transportadores de intermediarios del ciclo de Krebs, presenilinas, y proteínas involucradas en el transporte vacuolar, además de proteínas secretadas sin homólogos conocidos (Rosenzvit *et al.*, 2006). Es por ello que determinar el grado y tipo de variación de estas proteínas es importante si se desea entender su función biológica y/o mejorar técnicas de control y prevención de la hidatidosis.

1.9. El Antígeno B de *Echinococcus granulosus*

El AgB (Oriol *et al.*, 1971) es una de las principales proteínas de secreción de *E. granulosus*, presente en grandes cantidades en el líquido hidatídico. Esta lipoproteína es polimérica y fuertemente inmunogénica, su masa molecular aparente es de 120-160 kDa y se disocia bajo condiciones reductoras en subunidades de 8/12, 16 y 20/24 kDa., lo que sugiere que se encuentra compuesta por multímeros de 8 kDa (Lightowers *et al.*, 1989). Los primeros estudios moleculares demostraron que el AgB es polimórfico encontrándose 3 genes llamados *AgB1* (Frosch *et al.*, 1994), *AgB2* (Fernández *et al.*, 1996); *AgB3* (Chemale *et al.*, 2001). La estructura general del gen consiste en dos exones flanqueando un intrón. El exón 1 codifica para una secuencia deducida de aminoácidos conteniendo una región hidrofóbica seguida por sitios potenciales de digestión por proteasas lo que sugiere la presencia de un péptido señal correspondiente a una proteína secretada. El intrón es de tamaño y secuencia variable entre subunidades. El exón 2 también es variable en secuencia y tamaño entre subunidades y codifica para una secuencia deducida de aminoácidos que corresponden a la proteína funcional. Paralelamente a los resultados obtenidos en este trabajo se describieron dos genes más: *AgB4* y *AgB5* (Haag *et al.*, 2004) con homología al *AgB2* y *AgB3* respectivamente. Los cinco genes que codifican al AgB poseen un 30-85% de identidad en su secuencia aminoacídica deducida y su masa molecular estimada a partir del procesamiento de la secuencia deducida de aminoácidos es de alrededor de 8 kDa dependiendo de la subunidad y coincide con la determinada a partir de geles de poliacrilamida por Lightowers *et al.* (1989). Por otra parte la secuenciación de péptidos trípticos derivados del AgB nativo muestra que los monómeros de *AgB1* y *AgB2* se encuentran formando parte de los componentes 8, 16 y 24 kDa del AgB presente en el líquido hidatídico (González *et al.*, 1996).

1.10. Variabilidad de las secuencias que codifican al AgB

El análisis de las secuencias genómicas y de ADN copia del AgB realizadas por varios grupos independientes mostró que existen varias secuencias relacionadas a los genes *AgB1* y *AgB2*. La primer secuencia

deducida del ADN copia del *AgB1* difirió en algunos residuos de la secuencia de aminoácidos de la subunidad menor del AgB nativo (Shepherd *et al.*, 1991). Se sugirió entonces que las diferencias encontradas se debían a la existencia de isoformas de la subunidad menor del antígeno que serían expresadas a partir de un gen polimórfico. La secuencia completa del ADN copia del *AgB1* mostró una identidad de 94,3% con la previamente reportada y una variabilidad de hasta el 6% entre secuencias de AgB de hospedadores y orígenes geográficos diferentes (Frosch *et al.*, 1994). Estudios poblacionales de *E. granulosus* que involucraron el análisis de variabilidad de una región del *AgB1* indicaron que la mayoría de las sustituciones nucleotídicas eran no sinónimas sugiriendo la acción de selección positiva sobre estas secuencias (Haag *et al.*, 1998). Asimismo la secuenciación de péptidos trípticos del AgB nativo reveló secuencias que no pudieron relacionarse con las secuencias aminoacídicas del AgB1 ni del AgB2 (González *et al.*, 1996), sugiriendo la existencia de polimorfismo entre diferentes aislamientos, ya que el antígeno utilizado fue el producto de purificación de líquido hidatídico de diferentes quistes, o la posibilidad de existencia de otra subunidad hasta ese momento no descrita. El análisis mediante PCR-SSCP de las variantes amplificadas con *primers* que reconocen al grupo de genes del *AgB1* permitió aislar un nuevo gen, *AgB3*, con 65% de identidad nucleotídica respecto al *AgB1* (Chemale *et al.* 2001). Asimismo en un estudio realizado sobre protoescólex individuales se encontraron variantes ligeramente diferentes de cada gen del AgB, demostrando un alto nivel de polimorfismo entre individuos provenientes de un mismo quiste. Estas variaciones podrían deberse a la presencia de copias distintas en el genoma del parásito o a que esas variantes se generen durante la misma formación de cada protoescólex. En dicho estudio se aislaron además dos nuevos genes, *AgB4* y *AgB5* (Haag *et al.*, 2004).

1.11. Potencial diagnóstico del AgB

El AgB es altamente inmunogénico en infecciones humanas y es ampliamente utilizado en el diagnóstico de hidatidosis quística (Lightowlers & Gottstein, 1995). A pesar de su frecuente utilización en el diagnóstico en humanos la especificidad del antígeno determinada por diferentes grupos de

trabajo mostró resultados contradictorios (Carmena *et al.*, 2006). En la tabla 3 se resumen la sensibilidad y especificidad obtenida por diferentes grupos utilizando AgB nativo, AgB recombinante y péptidos sintéticos derivados de la secuencia del AgB.

Tabla 3. Características principales de los ensayos serodiagnósticos de la hidatidosis humana basados en el uso de AgB nativo, recombinante y péptidos sintéticos.

Antígeno	N° de personas analizadas			Ensayo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Reacción cruzada	Referencia
	Hidatidosis	Otras parasitosis	Sanos					
AgB nativo	210	79	47	IgG4 ELISA	63	81	AE, Cys., Schis.	McVie <i>et al.</i> (1997)
AgB nativo	90	88	28	IgG ELISA	77	86	AE	Barbieri <i>et al.</i> (1998)
AgB nativo	90	86	28	IgG ELISA	77	86	AE	Gonzalez-Sapienza <i>et al.</i> (2000)
AgB nativo	204	53	90	IgG ELISA	73	100	-	Ortona <i>et al.</i> (2000)
AgB nativo	31	87	29	IgG ELISA	77	82	AE, Schis., Tox.	Rott <i>et al.</i> (2000)
AgB nativo	129	65	203	IgG ELISA	60	93	Cys., Tox.	Virginio <i>et al.</i> (2003)
AgB nativo	173	181	29	IgG IB	92	71	AE	Ito <i>et al.</i> (1999)
AgB nativo	87	339	200	IgG IB	60–71	98	AE, Cys.	Poretti <i>et al.</i> (1999)
AgB nativo	204	53	90	IgG IB	73	100	-	Ortona <i>et al.</i> (2000)
rAgB1	210	79	47	IgG4 ELISA	65	91	AE	McVie <i>et al.</i> (1997)
rAgB1	31	87	29	IgG ELISA	55	80	AE, Schis., Tox.	Rott <i>et al.</i> (2000)
rAgB1	129	65	203	IgG ELISA	84	91	Cys.	Virginio <i>et al.</i> (2003)
rAgB1	204	53	90	IgG IB	72	100	None	Ortona <i>et al.</i> (2000)
rAgB2	31	87	29	IgG ELISA	84	98	Schis., Tox.	Rott <i>et al.</i> (2000)
rAgB2	129	65	203	IgG ELISA	93	99	Cys., Tox.	Virginio <i>et al.</i> (2003)
p65	90	88	28	IgG ELISA	34–48	80–97	AE, Onch., Schis., Tox.	Barbieri <i>et al.</i> (1998)
p65	90	86	28	IgG ELISA	44	96	AE, Schis., Tox.	Gonzalez-Sapienza <i>et al.</i> (2000)
p175	90	86	28	IgG ELISA	49	94	AE, Schis., Tox.	Gonzalez-Sapienza <i>et al.</i> (2000)
p176	90	86	28	IgG ELISA	80	93	AE, Schis., Tox.	Gonzalez-Sapienza <i>et al.</i> (2000)
p177	90	86	28	IgG ELISA	38	92	AE, Schis., Tox.	Gonzalez-Sapienza <i>et al.</i> (2000)
pGU4	90	88	28	IgG ELISA	12–18	96–100	AE	Barbieri <i>et al.</i> (1998)
pGU4	90	86	28	IgG ELISA	18	98	AE, Schis., Tox.	Gonzalez-Sapienza <i>et al.</i> (2000)

rAgB1: AgB recombinante subunidad 1; rAgB2: AgB recombinante subunidad 2; p-: péptido sintético; IB: inmunoblot; AE: echinococcosis alveolar; Cys: cisticercosis; Onch: oncocercosis; Schis: esquistosomiosis; Tox: toxocarosis. Tabla tomada y modificada de Carmena *et al.* (2006).

Además de los valores de especificidad y sensibilidad discordantes se reportaron resultados contradictorios con respecto a la reactividad cruzada. Por ejemplo hay resultados que muestran que sueros de pacientes con cisticercosis no reconocen al AgB (Ortona *et al.*, 2000) y otros trabajos que muestran que lo hacen (Virginio *et al.*, 2003). La variación obtenida en diferentes laboratorios puede deberse a: 1) variación en las preparaciones antigénicas debida a la utilización de quistes de diferentes hospedadores y/o genotipos que contengan diferentes isoformas del AgB y; 2) utilización de reactivos diferentes tales como el lote y número de sueros utilizados y las técnicas empleadas en cada caso.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la utilización de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos puede contribuir a la estandarización de los ensayos inmunológicos para la detección de hidatidosis, sin embargo el potencial diagnóstico de la subunidad 2 del AgB parece ser mayor cuando se estudia a la misma como proteína recombinante pero menor cuando se la utiliza como péptido sintético (Gu4, p175 y p177). Esta aparente contradicción puede deberse al panel de sueros utilizados, que no en todos los casos fueron confirmados por cirugía y/o al lote de reactivos utilizados. Para subsanar estos inconvenientes se ha formado la Red Sudamericana de Serología Hidatídica, (RSSH) integrada por laboratorios de Uruguay, Chile, Perú, Brasil y nuestro laboratorio. Esta Red posee antígenos y sueros distribuidos en todos los laboratorios participantes para la correcta estandarización de los ensayos inmunodiagnósticos.

1.12. Localización del AgB en el metacestode de *E. granulosus*

El AgB es relativamente abundante en el líquido hidatídico y las secuencias aminoacídicas de sus subunidades contienen un péptido señal. Estos hechos sugieren que el AgB es una proteína secretada. Los trabajos realizados hasta el presente sobre la localización del AgB son escasos y contradictorios. Yarzabal *et al.* (1977) reportó una localización del AgB en el tegumento de protoescólices y en la sustancia intersticial de las cápsulas prolíferas, no encontrando señal en capa germinal, pared de las cápsulas prolíferas, parénquima ni sistema excretor de los protoescólices. Estudios

inmunohistológicos en el metacestode de *E. granulosus* y *E. multilocularis* realizados por Rickard *et al.* (1977) mostraron una localización del AgB en tegumento, subtegumento y en superficie de corpúsculos calcáreos de los protoescólices. También se lo encontró en capa germinal y laminar. Sin embargo trabajos posteriores realizados por Davies *et al.*, (1978) mediante microscopia electrónica de transmisión localizaron al AgB en superficie anterior de protoescólices y en citoplasma distal y proximal del tegumento de las ventosas. No se encontró el AgB en glándula rostral, tegumento posterior de ventosas, células musculares, células flamígeras, ductos colectores, sistema excretor ni corpúsculos calcáreos. Los trabajos más recientes fueron realizados por Sánchez *et al.* (1991) y Sánchez *et al.* (1993), los autores no encontraron al AgB en tegumento de protoescólices, sólo lo encontraron en parénquima. Asimismo detectaron AgB en capa germinal pero no en la capa laminar. Debido a que los protoescólices muertos no mostraron la presencia de AgB consideran que este antígeno, presente en el líquido hidatídico, es producto de la secreción activa en vez de liberarse por un proceso degenerativo.

Las diferencias encontradas en estos trabajos podrían atribuirse a las técnicas empleadas en cuanto a la purificación de antígenos y la producción de anticuerpos específicos. Es por ello que resulta necesario repetirlos con técnicas actuales de producción de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales para resolver las discrepancias de los resultados obtenidos.

1.13. Función del AgB en la biología del parásito

A pesar de que el AgB es una de las proteínas más estudiadas de *E. granulosus* su función en la biología del parásito permanece indeterminada. La mayoría de los trabajos se concentran en la utilización de la proteína como antígeno de valor diagnóstico. Un único trabajo realizado en 1991 relaciona a la subunidad menor del AgB con la capacidad de inhibir elastasas del tipo serinoproteasas (Shepherd *et al.*, 1991). La misma fracción purificada no fue capaz de inhibir otras serinoproteasas como quimotripsina o tripsina. También se demostró que esta subunidad es capaz de inhibir la quimiotaxis de neutrófilos. Si bien los intentos posteriores de reproducir los experimentos de

inhibición de elastasas fueron infructuosos (G. González, Universidad de Ciencias de Montevideo, comunicación personal), se obtuvieron resultados respecto a la evasión del sistema inmune. Experimentos *in vitro* sugieren que el AgB activa la respuesta celular del hospedador incentivando la proliferación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con hidatidosis (Profumo *et al.*, 1994). Posteriormente, fue demostrado que dichas células en presencia del AgB producirían interleuquinas IL-4 e IL-13 y no IL-12. Este perfil de interleuquinas está relacionado con la respuesta inmune tipo Th2. Los resultados obtenidos *in vitro* fueron confirmados *in vivo* al encontrar elevada cantidad de inmunoglobulinas de las clases IgE e IgG4, específicas contra AgB, en el suero de pacientes con hidatidosis. Esto sugiere que, *in vivo*, el AgB puede estar direccionando la respuesta inmune del hospedador, activando células T y provocando una respuesta del tipo Th2 no protectora como un mecanismo de evasión del sistema inmune. Asimismo, el AgB también es capaz de inhibir el reclutamiento quimiotáctico de células polimorfonucleares (Riganò *et al.*, 2001). Recientemente, Virginio *et al.* (2006) observaron que neutrófilos previamente activados y en determinadas condiciones disminuyen su producción de agua oxigenada, por lo que sugieren un rol inmunomodulador negativo indirecto. Por otro lado, se encontró que ratones que ingieren oncosferas de *E. granulosus* producen muy tempranamente anticuerpos anti AgB (Zhang *et al.*, 2003b). Estos resultados sugerirían que el AgB tiene un rol importante en el establecimiento y/o supervivencia del quiste.

Además, el AgB es homólogo a proteínas pertenecientes a un grupo de proteínas ricas en α -hélice que se ligan a compuestos hidrofóbicos (*helix rich hydrophobic ligand binding proteins*, HLBP), entre ellos lípidos y ácidos grasos (Barrett *et al.*, 1997; Saghir *et al.*, 2000). Hasta el momento los miembros de ésta familia sólo fueron descritos en cestodes, sugiriendo que es una familia específica de este grupo de organismos. Los posibles miembros de esta familia pertenecen a *Moniezia expansa* (Barrett *et al.*, 1997), *T. solium* (Sako *et al.*, 2000), *Taenia crassiceps* (Zarlenga *et al.*, 1994) e *Hymenolepis diminuta* (Saghir *et al.*, 2001). Los cestodes no son capaces de realizar la síntesis *de novo* de la mayoría de sus lípidos, ácidos grasos de cadena larga, colesterol y esteroides, dependiendo por lo tanto del hospedador para la obtención de éstas moléculas (Smyth & McManus, 1989). Las HLBP son expresadas en grandes

cantidades en los parásitos en que fueron descritas pudiendo estar involucradas en la captación de ácidos grasos y lípidos del hospedador o formando parte del mecanismo molecular de metabolización de los mismos. Además de su homología de secuencia, las proteínas pertenecientes a esta familia comparten características estructurales, todas son oligoméricas y se encuentran formadas por subunidades de pequeña masa molecular de entre 7 a 11 kDa. Muchas de ellas son altamente inmunogénicas siendo antígenos potencialmente útiles para el inmunodiagnóstico de las respectivas parasitosis (Saghir *et al.*, 2000; Saghir *et al.*, 2001; Sako *et al.*, 2000). Las dos HLPBs caracterizadas hasta el momento pertenecientes a los parásitos cestodes *H. diminuta* y *M. expansa*, tienen como ligandos ácidos grasos, lípidos y anti-helmínticos (Saghir *et al.*, 2000; Saghir *et al.*, 2001; Barrett *et al.*, 1997; Janssen & Barrett, 1995). La caracterización del AgB como HLPB se realizó con el AgB nativo y dos de las subunidades del AgB: rAgB1 y rAgB2. Las tres proteínas se comportaron de manera similar, uniéndose al derivado fluorescente de ácido palmítico, 16-AP, sin disociarse en ensayos de competencia con otros ácidos grasos incluyendo el ácido palmítico (Chemale *et al.*, 2005). Esta característica la diferencia de las dos HLPBs antes mencionadas sugiriendo que el AgB desarrolló propiedades de unión a ligandos hidrofóbicos particulares característicos del grupo de cestodes al que pertenece *E. granulosus*. Asimismo, las propiedades de unión que muestra el AgB a los ligandos hidrofóbicos ensayados sugieren que la proteína no estaría involucrada en el metabolismo de lípidos sino que actuaría como “buffer” o esponja de compuestos hidrofóbicos tóxicos presentes en el líquido hidatídico.

Por todo lo expuesto anteriormente resulta evidente la necesidad de profundizar en el conocimiento de las características del AgB desde su organización genómica y su perfil de expresión en diferentes linajes y estadios hasta su localización y función en la biología de *E. granulosus*. Esta proteína resulta interesante desde un punto de vista biológico, es decir conocer el rol que cumple en el establecimiento y/o supervivencia del parásito en el ambiente del hospedador y desde un punto de vista práctico conociendo sus capacidades como herramienta diagnóstica y/o protectora.

Objetivo general

Analizar la variabilidad genética y de expresión del antígeno B presente en el parásito cestode *Echinococcus granulosus*.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la variabilidad genética y transcripcional del antígeno B dentro y entre genotipos en el estadio protoescólex de *E. granulosus*.
- 2) Determinar la localización de la expresión de las subunidades del antígeno B en el estadio protoescólex.
- 3) Analizar la expresión del antígeno B en los estadios adulto y oncosfera del parásito.
- 4) Evaluar la capacidad diagnóstica de diferentes subunidades del antígeno B como proteínas recombinantes.

Materiales y métodos

2.1. Materiales y métodos del objetivo 1)

2.1.1. Obtención de material parasitario

Los protoescolices de *E. granulosus* se extrajeron a partir de quistes hidatídicos porcinos, ovinos, caprinos, bovinos o humanos de distintas provincias de la República Argentina. Se denominó aislamiento a los protoescolices provenientes de un único quiste hidatídico. Se determinó la viabilidad de los protoescolices mediante tinción con eosina al 1%. Los quistes hidatídicos analizados fueron ovinos, porcinos, bovinos y humanos. El material obtenido se almacenó en nitrógeno líquido hasta su uso.

2.1.2. Obtención de ADN

Los protoescolices se lavaron con buffer de extracción (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM y EDTA 10 mM) y luego fueron sometidos a tres ciclos de congelamiento en N₂ líquido y descongelamiento. Se incubaron con proteínasa K (100 µg/ml) en buffer de extracción y SDS 0,5%, durante 3 horas a 56°C. Se realizaron extracciones sucesivas con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo (Maniatis *et al.*, 1989) y se precipitó con acetato de sodio y etanol durante toda la noche a 4°C. El precipitado de ácidos nucleicos fue lavado con etanol 70%, resuspendido en Tris-HCl 10 mM, pH 8 y tratado con 20 µg/ml de ribonucleasa A durante 1 hora a 37°C.

En algunos casos el ADN se obtuvo de la interfase de la extracción realizada en la obtención de ARN con el reactivo TRIzol (Gibco, BRL).

La determinación de integridad del ADN se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1-1.2% (p/v) utilizando Tris-Acetato- EDTA (TAE) como buffer de corrida, tinción con bromuro de etidio y observación con luz U.V. La determinación de pureza se realizó, en algunos casos, mediante lectura de la absorbancia a 280 y 260 nm. La cuantificación se realizó por comparación con la fluorescencia producida por cantidades conocidas de ADN luego de realizar electroforesis en gel de agarosa.

2.1.3. Obtención de ARN

El ARN total fue preparado a partir de protoescolices congelados en nitrógeno líquido utilizando el reactivo TRIzol (Gibco, BRL) de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. Cada muestra fue incubada 30 minutos a 37°C con 1 unidad de ADNasa RQ1 libre de ARNasa (Promega).

2.1.4. Análisis del genotipo de *E. granulosus*

La determinación del genotipo se realizó mediante la amplificación del gen CO1 como fue descrito previamente (Kamenetzky *et al.* 2002). La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, que contuvo ADN de cada muestra (10-100 ng), 200 µM de cada dNTP (Pharmacia), 2,5 mM MgCl₂, 50 pmoles de cada primer (CO1F y CO1R) previamente descritos (Bowles *et al.*, 1992) y 1,5 unidades de la enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) en buffer de reacción 1X (Promega). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización (95°C durante 180 s) seguido de 30 ciclos con los siguientes pasos: 95°C durante 60 s (desnaturalización), 55°C durante 60 s (unión de los *primers* al ADN molde), 72°C durante 90 s (extensión), y un paso final de extensión (72°C por 180 s).

2.1.5. Amplificación de los genes AgB2 y AgB4

El par de *primers* utilizado fue el descrito por Fernández *et al.* (1996), los cuales se espera que amplifiquen las secuencias correspondientes al AgB2 y AgB4, AgB2/B4F: 5' ATTTGTGGAGACAATCGC 3' y AgB2/B4R: 5' AGGCAAATCATGTGTCCC 3'. La PCR se realizó en un volumen final de 20µl conteniendo 10-50ng de ADN, 200µM de cada dNTP; 2,5mM MgCl₂, 10 pmol de cada primer y 1 unidad de *Thermus aquaticus* ADN polimerasa en buffer de reacción (Promega). Estos *primers* son complementarios a las regiones 5' y 3' UTR cerca de los codones ATG y TAA respectivamente. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización (95°C durante 180 s) seguido de 35 ciclos con los siguientes pasos: 95°C durante 60 s (desnaturalización), 55°C durante 60 s (unión de los *primers* al ADN molde), 72°C durante 90 s (extensión) y un paso final de extensión (72°C durante 10 minutos).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient 5331 versión 1.2. La especificidad y tamaño de los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa 1-

1.2% (p/v) utilizando TAE como buffer, tinción con bromuro de etidio y observación a luz U.V.

2.1.6. Transformación de bacterias

Se realizó mediante choque térmico. Las bacterias competentes previamente tratadas con CaCl_2 se descongelaron suavemente en hielo durante 5 minutos. Se mezclaron 80 μl de bacterias con 10 μl de solución de ADN proveniente de la ligación, se mezcló suavemente y se dejó en hielo durante 30 minutos sin agitación. Se colocó en un baño a 42°C durante 2 minutos sin agitar y luego se transfirió inmediatamente a un baño de hielo durante otros 2 minutos. Luego, se agregaron 800 μl de medio LB y se incubó una hora y media a 37°C con agitación. Se plaqueó en LB-agar con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IPTG (0.5mM) y X-gal (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

2.1.7. Clonado y análisis mediante polimorfismo de conformación simple cadena (SSCP)

Los productos de amplificación provenientes de la PCR realizada con *primers* de AgB2/B4 se extrajeron de geles de agarosa (QIAEX II Gel extraction kit, Qiagen) y se clonaron en pGem-T Easy Vector System 1 (Promega). De cada aislamiento se recolectaron 20 a 40 colonias y se analizó la presencia del inserto AgB2/B4 mediante PCR-colonia. Cada colonia se sembró en una placa de 96 pocillos conteniendo 100 μl de medio de cultivo *super broth* LB en presencia de ampicilina (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó toda la noche a 37°C . Luego, 0,5 μl de cada pocillo conteniendo el cultivo de toda la noche se utilizó como molde en reacciones de PCR. Las condiciones de PCR fueron las mismas que en el ítem 2.1.5 con el agregado de un primer ciclo de 95°C durante 5 min para la lisis de bacterias.

El análisis por SSCP se realizó con los productos obtenidos por PCR-colonia, éstos se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C en un volumen de buffer conteniendo 95% formamida, y los colorantes: *xylene cyanol* (0,25%) y azul de bromofenol (0,25%) e inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 minutos para conservar el producto en forma de simple cadena. Luego los productos de PCR desnaturalizados se sometieron a electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida conteniendo 10% acrilamida: bisacrilamida

(49: 1), 10% de glicerol y fueron sometidos a electroforesis a 200 V por 3hs a 4°C en buffer Tris-borato-EDTA (TBE). Al terminar la corrida electroforética se visualizaron las bandas realizando tinción argénica de los geles.

2.1.8. Secuenciación

Se secuenciaron productos de PCR purificados mediante reactivos comerciales (Spin CombiPack, Pharmacia y QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN) o a partir de plásmidos recombinantes correspondientes a cada patrón de SSCP purificados por métodos convencionales (Maniatis *et al.*, 1989). Las reacciones de secuenciación se realizaron en un volumen final de 7 μ l, se agregaron 2 μ l de mezcla de reacción (Big Dye mix, Applied Biosystems), 30 pmoles de uno de los *primers* en cada tubo y el ADN correspondiente. La secuenciación de productos de PCR se realizó utilizando 30-100 ng de ADN mientras que para secuenciar plásmidos se utilizó 400 ng de ADN. El programa utilizado fue 80 ciclos de: 95°C durante 10 s, 50°C durante 5 s y 60°C durante 4 minutos en el termociclador Eppendorf Mastercycler gradient 5331 versión 1.2. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM, Modelo 377, ABI150, versión 3.0 (Perkin Elmer). Para cada producto de PCR o plásmido se secuenciaron las dos hebras.

2.1.9. Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL X versión 1.81. Para la determinación del genotipo CO1 se alinearon los productos obtenidos con secuencias patrones (366 o 391 bp) de los genotipos previamente publicados G1-G8 (Bowles *et al.*, 1992; Kamenetzky *et al.*, 2000; Kamenetzky *et al.*, 2002). Para el agrupamiento de las secuencias del AgB los alineamientos fueron analizados mediante el método de parsimonia usando el programa PAUP* versión 4.0b4a y los métodos de UPGMA y *Neighbor-joining* usando el programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Los árboles fueron obtenidos mediante 1000 réplicas de *bootstrap*, la adición de secuencias fue al azar con 5 repeticiones. La diversidad nucleotídica (π_N), la cual estima el número promedio de sustituciones entre dos secuencias, se determinó mediante el programa DNAsp versión 3.51 (Rozas & Rozas, 2001). El análisis de selección fue realizado comparando la tasa de sustituciones sinónimas y no

sinónimas usando el método de Nei & Gojobori (1986) con la corrección de Jukes-Cantor, mediante el programa MEGA 2.1. El error estándar se determinó mediante 1000 réplicas de *bootstrap*. Los tests de selección utilizados, test de Fisher exacto y test Z, se realizaron utilizando el mismo programa. El test de neutralidad de Tajima se realizó con el programa DNAsp versión 3.51. Las secuencias aminoacídicas deducidas se obtuvieron mediante el programa ExpPASy (Expert Protein Analysis System) provisto por el Instituto Suizo de Bioinformática ([Swiss Institute of Bioinformatics, http://kr.expasy.org](http://kr.expasy.org)). El análisis de los posibles sitios de *splicing* se realizó manualmente buscando todos los posibles sitios de *splicing* descritos (Bursset *et al.* 2001; Thanaraj & Clark, 2001).

2.1.10. Análisis de transcritos

Se alinearon todas las variantes diferentes de AgB obtenidas a partir de los genotipos G1 y G7 y se diseñaron *primers* para amplificar mediante PCR el ADN copia. La secuencia de los *primers* usados fue, ExpAgB2/B4F: 5' GGATCCTTCGTGGCCGTCGTTCAAGC 3' y ExpAgB2/B4R: 5'GTCGACAAATCATGTGTCCCGACGCA 3'. La síntesis de la primera cadena se realizó con ARN total de cada aislamiento, 100 pmol de primer ExpAgB2/B4R, 350 unidades de enzima Transcriptasa reversa M-MLV (Promega), 2,5 mM de cada dNTP (Amersham Biosciences) y 1 unidad del inhibidor de ARNasa RNAsin (Promega) en buffer de reacción (Promega). La mezcla fue incubada 1 hora a 35 °C y luego la enzima fue inactivada a 95°C durante 5 minutos. Para distinguir entre los productos de ADN copia de aquellos que podrían generarse por una eventual contaminación con ADN genómico se diseñaron los *primers* antes mencionados flanqueando a la región del intrón de la secuencia genómica correspondiente. De esta manera el ADN genómico contaminante generaría un producto de amplificación de mayor tamaño que el que genera el ADN copia. Asimismo, en cada ensayo de RT-PCR se incluyó un tubo que no contenía transcriptasa reversa como control negativo. La reacción de PCR, el clonado y el análisis mediante PCR-SSCP se realizó como se mencionó anteriormente.

2.1.11. Diseño de *primers* gen-específicos

Para el diseño de *primers* que amplifiquen cada subunidad de AgB de manera específica se alinearon todas las secuencias descritas de AgB obtenidas en el objetivo 1 y las depositadas previamente en el Genbank (Frosch *et al.*, 1994; Haag *et al.*, 2004; Arend *et al.*, 2004; Muzulin *et al.*, 2007; banco de ADN copia disponibles en <http://zeldia.cap.ed.ac.uk/Lopho/LophoDB.php>). Se determinó manualmente las regiones que contuvieran diferencias entre subunidades y se utilizó el programa Primer Express Software versión 2.0 (Applied Biosystems) para el diseño óptimo de los *primers*. Se eligió el par de *primers* correspondiente a cada subunidad que contuviera en su extremo 3' al menos dos diferencias con las demás subunidades. De este modo cada par de *primers* específico amplificaría todas las variantes descritas correspondientes a una subunidad y no amplificaría las variantes pertenecientes a las demás subunidades. En el caso de los *primers* AgB2 se verificó que amplifiquen las variantes correspondientes al AgB2 del cluster G1/G2, como a las pertenecientes a los clusters G5 y G6/G7. La secuencia de los *primers* puede verse en la tabla 4. Los alineamientos utilizados para diseñarlos se encuentran en el apéndice.

Tabla 4. Secuencia de los *primers* usados en la amplificación gen-específica del AgB.

Gen amplificado	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
<i>AgB1</i>	5' CGTCTCATTCGTTGGTGGTTACTCAG 3'	5' GGATCACGTTCTCGAAGARGTACTTC 3'
<i>AgB2</i>	5' TGTGGAGACAATYGCATAATGAGGACYTAC 3'	5' AYCACYTGCCCCAYGYGYGCT 3'
<i>AgB3</i>	5' TCGCTYTGCTYTCGTYTCA 3'	5' CACTTTGSAARAAGTGCTTA 3'
<i>AgB4</i>	5' ATAATGAGGACYTACATCCTT 3'	5' AAGTCCCGAAATTTCGCYCA 3'
<i>AgB5</i>	5' TCGCTCTGGCTCTCGTCTCA 3'	5' CCCTTCGGAAGAAGTCCTTG 3'
<i>actina</i> *	5' GTTGTGCTATGTGGCACTCGACT 3'	5' CAATCCAGACAGAGTATTTGCGTTC 3'

* *primers* publicados por Zhang *et al.* (2003c)

2.1.12. Amplificación de AgB gen específica

Las PCR AgB gen-específicas se realizaron en un volumen final de 20µl, 200µM de cada dNTP (Amersham Biosciences), 2.5mM MgSO₄, 10 pmol de cada primer, y 0,1 unidad de *High-Fidelity* Taq ADN polimerasa en buffer de reacción (Invitrogen) y el volumen correspondiente de ADN molde. Las

condiciones fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización (95°C durante 180 s) seguido de 35 ciclos con los siguientes pasos: 95°C durante 60 s (desnaturalización), 55°C durante 60 s (unión de los *primers* al ADN molde), 72°C durante 90 s (extensión) y un paso final de extensión (72°C durante 10 minutos). Para la determinación de la cantidad y calidad del ARN utilizado se realizaron reacciones de PCR con *primers* específicos para el gen de actina (número de acceso al Genbank L07773, ver secuencia de los *primers* en tabla 4), se utilizaron las mismas condiciones de PCR pero con 25 ciclos de amplificación. Controles negativos: 1) ARN de cada estadio tratado de idéntica forma pero sin el agregado de enzima retrotranscriptasa y 2) reacción de PCR sin el agregado de ADN molde.

2.2. Materiales y métodos del objetivo 2)

2.2.1. Hibridación *in situ*

El plásmido recombinante correspondiente al ADN copia de la variante cEgB1v4 (figura 13) se linealizó mediante digestiones enzimáticas y se sintetizaron *in vitro* sondas de ARN antisentido marcadas con digoxigenina. Las ribosondas fueron visualizadas y cuantificadas. La sonda sentido utilizada como control negativo se obtuvo a partir de plásmidos conteniendo el gen EgP3G2 (Camicia *et al.*, datos no publicados). Por otra parte, se procedió a la preparación del material histológico: protoescolices y vesículas hijas de quistes hidatídicos de origen bovino fueron fijados en paraformaldehído 4% y procesados para su posterior inclusión en parafina. Los cortes de 5-7µm se montaron en portaobjetos gelatinizados y se usaron en los ensayos de hibridación según Freire *et al.* (2004). Las secciones de parásitos fueron desparafinadas y rehidratadas en concentraciones decrecientes de metanol/PBS: 100, 75, 50 y 25% conteniendo 0,1% Tween 20 (PBST). Luego de dos lavados de 10 min en PBST, fueron incubados con proteinasa K (1 µg/ml in PBST) durante 15 min, lavados dos veces con PBST, durante 5 min y re-fijados en 4% paraformaldehído en PBST conteniendo 0,1% glutaraldehído durante 20 min y lavados dos veces con PBST. Los cortes fueron incubados a 65 °C por 10 min para inactivar la enzima fosfatasa alcalina endógena y prehibridados a 50 °C durante 2 hs en solución de hibridación [50%(v/v)

formamida desionizada; 1,3 × SSC pH 5,3; 5 mM EDTA; 50 µg/ml ARNt de levadura; 0,2% Tween 20; 0,5% CHAPS, 100 µg/ml heparina]. La hibridación se realizó durante toda la noche en cámara húmeda a 50 °C con 2 ng/µl de la sonda de ARN marcada desnaturalizada (95°C, 3 min) en 50 µl de solución de hibridación. Luego los cortes se lavaron dos veces en 2 X SSC, 50% formamida, luego una vez en 1 X SSC, 50% formamida, pH 7,2, a 50 °C 20 min cada vez y luego dos veces en 1xSSC a temperatura ambiente durante 15 min. Por último se lavaron dos veces en MAB-T [0,1% Tween 20 en MAB (100 mM ácido maleico; pH 7,5; y 150 mM NaCl)] durante 10 min y bloqueados con MAB conteniendo 1% BSA (MAB-B) durante 30 min, seguido de MAB-B con 5% (v/v) de suero de oveja inactivado por calor (solución de bloqueo) durante 2 hs. Luego los cortes fueron incubados toda la noche a 4 °C con anticuerpo anti digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim), diluído 1/500 en solución de bloqueo. Luego de lavar con MAB-T, los cortes fueron lavados dos veces con buffer de revelado (100 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl; pH 9,5; 50 mM MgCl₂ y 0,1% Tween 20) e incubados con *Nitro Blue Tetrazolium* y 5-bromo-4-cloroindol-3-yl fosfato (NBT/BCIP) en el mismo buffer. Luego de la aparición de color, los cortes fueron lavados dos veces en PBST, fijados en 4% paraformaldehído en PBS durante 30 min y montados bajo un cubre objetos usando 70% (v/v) de glicerol. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el laboratorio de la Dra. Cora Chalar, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

2.2.2. Obtención de antígenos

Líquido hidatídico de ovejas (LHo) y líquido hidatídico de cerdos (LHc): se obtuvieron por aspiración de quistes fértiles, clarificado por centrifugación y dializado contra H₂O destilada toda la noche a 4°C, liofilizado y resuspendido en 0,01 volúmenes de PBS.

rAgB: se subclonaron las regiones codificantes cEgB2G1v4 (proteína B2) y cEgB4G7v20 (proteína B4) (figura 13) en el vector de expresión pET22 (Novagen) utilizando las bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) codon plus (Stratgene). Se realizaron cultivos de 1 litro inducidos durante 4 hs. con IPTG 0.1 mM. Las bacterias fueron colectadas y los extractos bacterianos fueron sonicados y resuspendidos en un buffer conteniendo 8 M Urea, pH 8. Luego de

centrifugar a alta velocidad, el sobrenadante fue sembrado en columnas de Níquel-Agarosa (BIO-RAD). Se realizaron 2 lavados a pH 8 y un lavado a pH 6.3. La elución de la proteína de interés se realizó a pH 4.5. La cantidad, calidad y pureza de las proteínas recombinantes se determinó mediante geles de SDS-PAGE al 20% en condiciones reductoras e inmunoblots con suero estándar anti-*Echinococcus* producido por el *National Institute of Biological Standards and Controls* (NIBSC). La proteína B1 recombinante fue provista por la Red Sudamericana de Serología Hídática (RSSH).

2.2.3. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales anti AgB

El antígeno LHo y la proteína rAgB2 fueron enviadas al laboratorio de la Dra. Adriane Vaz (Universidad de San Pablo, Brasil) y utilizadas para la producción de anticuerpos monoclonales en ratones. Brevemente, ratones BALB/c fueron inmunizados por vía subplantar con 20µg de LHo (10µg/pata trasera) ó 5µg de rAgB2 (2,5µg/pata trasera). Cada dosis (10 ó 5µg) de antígeno fue diluida en 25µl de solución salina y mezclada con 25µl de adyuvante de Freund (se inyectaron 50µl por pata). Después de 15 días fue repetida la dosis, pero preparada con adyuvante incompleto de Freund. Treinta días después de la primera dosis fue dada la última dosis preparada en solución salina y luego de 3 días fueron retirados los linfo nodos poplíteos para realizar la fusión. Los sobrenadantes de los clones fueron analizados en ensayos de inmunoblots con LHo como antígeno. Aquellos que reconocieron las bandas correspondientes al antígeno B fueron seleccionados para su expansión en líquido ascítico. Se caracterizó el isotipo de cada MAb. Una vez recibidos los MAbs en nuestro laboratorio fueron caracterizados en función de su reconocimiento a las proteínas rAgB1, rAgB2 y rAgB4 mediante inmunoblot. Se seleccionaron dos anticuerpos para su uso posterior, anticuerpo Monoclonal anti B1 (MAb B1) isotipo IgG1 y anticuerpo Monoclonal anti B2/B4 (MAb B2/B4) isotipo IgG2a. Asimismo se utilizó el monoclonal anti AgB1 EB7 previamente descrito por González-Sapienza & Cachau, (2003) y gentilmente cedido por el Dr. Gualberto González-Sapienza, Facultad de la República, Montevideo.

2.2.4. Inmunoblot

Se separaron los antígenos mediante geles de SDS-PAGE al 20% en condiciones reductoras. Se transfirieron los antígenos LH (10µg/calle), rAgB (3µg/calle) o los extractos de bacterias inducidas a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon con PBS- 5% de leche descremada durante 2 horas. Se lavaron las membranas 3 veces con PBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo correspondiente. Luego de lavar se incubó con suero anti-IgG humana 1/3000 ó con anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa dilución 1/1000 (Sigma) y se reveló con H₂O₂ y diaminobenzidina (0,012g/20 ml de PBS).

2.2.5. Inmunolocalización en protoescolices *in toto*

Se lavaron los protoescolices enteros 5 veces con PBS y se realizaron diferentes métodos de fijación:

1) En fresco: se deshidrataron los parásitos sobre un portaobjetos y se mantuvieron en un ambiente seco entre 18-25 °C hasta su uso.

2) Paraformaldehído: se incubaron los parásitos con una solución de paraformaldehído al 4% durante toda la noche, luego se deshidrataron en concentraciones de alcohol/PBS crecientes, 25%, 50%, 70%, 95% y 100% ,15 minutos cada vez. Para la recuperación de antígenos se re-hidrataron en concentraciones de alcohol decrecientes y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, en Tris-HCl 1mM pH 8, se dejó enfriar 1 minuto y se repitió el proceso 4 veces. Se incubó con NH₄Cl 25 mM durante 10 min para disminuir la autofluorescencia.

3) Metanol/acetona: se incubaron los parásitos con una solución 1:1 de metanol acetona pre-enfriada a -20 °C durante 10 minutos a -20 °C. Se lavaron 3 veces con PBS y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

4) Acetona: ídem anterior pero en solución 100% acetona.

La morfología de los parásitos fue controlada bajo microscopio óptico luego del proceso de fijación. Posteriormente en los casos necesarios se rehidrataron los parásitos y se incubaron con solución de bloqueo [BSA 1% (v/v); saponina 0,1% (v/v); suero normal bovino 3% (v/v) en PBS] durante toda la noche a 4°C; sin lavar, sólo retirando el exceso de solución de bloqueo se

incubaron toda la noche a 4°C con el MAb correspondiente diluido 1/50 en solución de bloqueo. Luego de lavar 3 veces con PBS-0,1% saponina se incubaron 1 hora con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FITC (Sigma) dilución 1/200. Para los ensayos de co-localización se incubaron los parásitos con MAb B1 dilución 1/2 y MAb B2/B4 dilución 1/10 y se revelaron con anticuerpo monoclonal anti IgG1-ficoeritrina junto con anticuerpo monoclonal IgG2a-FICT (Becton Dickinson) dilución 40µg/ml. Los parásitos fueron montados en un portaobjetos con medio de montaje conteniendo DAPI y observados en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Como controles negativos se utilizaron parásitos sin incubación con MAb ó incubados con MAb anti proteína no relacionada al AgB (MAb anti cruzipaína de *Trypanosoma cruzi*) gentilmente cedido por el Dr. Gerardo Mirkin, Facultad de Medicina, UBA. Para los experimentos de co-localización se realizaron controles de especificidad de los anticuerpos anti isotipo incubando el MAb B1 con el anticuerpos anti IgG2a-FICT y el MAb B2/B4 con el anticuerpos anti IgG1-ficoeritrina.

Los resultados que se muestran en este trabajo son los correspondientes al método de fijación 4). Los demás métodos de fijación dieron como resultado una señal de menor intensidad (métodos, 1 y 3) o nula (método 2).

2.2.6. Inmunolocalización en cortes de protoescólices

Para las inmunolocalizaciones sobre cortes de protoescólices se desparafinaron y rehidrataron los preparados como se describió en el ítem 2.2.1: Los parásitos fueron fijados con el método 4) del ítem 2.2.5, y se procedió con el protocolo de inmunolocalización descrito en dicho ítem.

2.3. Materiales y métodos del objetivo 3)

2.3.1. Obtención de material parasitario

La obtención de material parasitario de protoescólices se realizó igual que en el ítem 2.1.1. Los parásitos adultos y los huevos se recolectaron a partir de perros infectados experimentalmente con protoescólices viables. Los huevos fueron tratados con pepsina, pancreatina y bilis de oveja para activar a

las oncosferas (Li *et al.*, 2004). El material obtenido se almacenó en nitrógeno líquido hasta su uso. Este material fue provisto por el Dr. Wenbao Zhang, *Queensland Institute of Medical Research*, Australia.

2.3.2. Análisis de expresión estadio específica

Para la síntesis de la primera cadena de ADN a partir de oncosferas, adultos y protoescólices se determinó la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} del ARN obtenido. Luego, 2µg de ARN tratado con ADNasa se retrotranscribieron utilizando SuperScript II (Invitrogen) y *primer* oligo dT₍₁₈₎.

La amplificación de cada subunidad del AgB se realizó mediante reacciones de PCR con *primers* subunidad específicos y las condiciones de PCR descritas en los ítems 2.1.11 y 2.1.12. Como control de la cantidad y calidad de ARN se amplificó el gen de actina de *E. granulosus* (tabla 4). Se realizaron reacciones de PCR amplificando el gen de actina con diluciones seriadas de ADN copia y diferente número de ciclos hasta obtener productos de amplificación cuya intensidad correspondiera a una curva lineal. Para la amplificación de los genes del AgB se eligieron aquellas diluciones que dieran un producto de amplificación del gen de actina similar. Los productos de amplificación se cuantificaron de manera relativa con programas específicos (Quantity One).

2.3.3. Clonado, secuenciación y análisis

Se realizaron igual que los ítems 2.1.8 y 2.1.9. Los productos de PCR se purificaron con reactivos que aumentan la eficiencia de purificación de fragmentos pequeños (kit GeneClean Mermaid, BIO101). El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante alineamientos con las secuencias patrones del *AgB* obtenidas en este trabajo y aquellas disponibles en el GenBank.

2.3.4. Inmunoblots del AgB en los estadios adulto y oncosfera

Se separaron los antígenos mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE al 20% en condiciones reductoras. Se transfirieron los antígenos LH (10µg/calle), AgB recombinante (1µg/calle), extracto de protoescólices

(40µg/calle) o extracto de adultos y oncosferas (100µg/calle) a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon con PBS- 0,1% Tween - 5% de leche descremada durante 2 horas. Se lavaron las membranas 5 veces con PBS- 0,1% Tween y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo correspondiente. Luego de lavar 5 veces con PBS- Tween 0,1% se incubó con suero anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa a la dilución correspondiente (Sigma) durante 1 hora y se reveló con los reactivos del kit *ECL Plus Western Blotting* (GE).

2.4. Materiales y Métodos para el objetivo 4)

2.4.1. Inmunoblot con AgB recombinante

Se recolectaron sueros y quistes de 36 pacientes con hidatidosis. Se purificó el ADN del quiste y se determinó la cepa mediante secuenciación del gen mitocondrial CO1 como se describe en los ítems 2.1.1, 2.1.2 y 2.1.4. Como control positivo se utilizó el suero estándar anti- *Echinococcus* provisto por el Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Controles (NIBSC, Gran Bretaña). Se purificaron los antígenos B2 y B4 descritos en el ítem 2.2.2 y se realizaron geles de SDS-PAGE de manera que queden 2µg/calle de proteína recombinante. Se procedió como en el ítem 2.2.4.

2.4.2. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

El estudio involucró a seis laboratorios de cinco países: Laboratorio coordinador de la Red, Departamento de Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay; Laboratorio de Biología Molecular de Cestodes, Centro de Biotecnología, UFRGS, Brasil; Unidad de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile; Instituto Nacional de Salud y Departamento de Microbiología, Universidad de Perú, Perú; y Argentina (nuestro laboratorio), conformando la Red Sudamericana de Serología Hidatídica (RSSH).

Los antígenos utilizados en el ELISA fueron: líquido hidatídico bovino (LHb), obtenido por aspiración aséptica de quistes fértiles bovinos en laboratorio coordinador en Uruguay; líquido hidatídico ovino (LHo), descrito en el ítem 2.2.2 y dos subunidades del AgB, B1 y B2, como proteínas recombinantes (Virginio *et al.*, 2003), obtenidas como proteínas de fusión a

glutación S-transferasa (GST) y purificadas por afinidad y liberación de la GST por clivaje con trombina en el laboratorio de Brasil.

Se recolectaron sueros prequirúrgicos de 59 pacientes con hidatidosis confirmada por cirugía (extracción del quiste hidatídico del órgano afectado) de los cinco países involucrados. Se utilizaron sueros de pacientes con las siguientes patologías: hidatidosis alveolar (n=10), cisticercosis (n=20), esquistosomiosis (n=8), fasciolosis (n=7) y triquinosis (n=10) y sueros de pacientes normales (n=15). Los sueros fueron preservados en 0,05% azida de sodio y guardados a -20 °C hasta su uso. Los antígenos y sueros fueron enviados al laboratorio coordinador, codificados al azar y re-enviados a los laboratorios de la Red.

Para diseñar el tamaño y composición de la seroteca se consideró realizar un buen balance entre representatividad y volumen de trabajo. Asimismo, para reducir la complejidad del estudio y facilitar el análisis a doble ciego, se utilizó un protocolo de ELISA en común. Para disminuir las fuentes de variación en los ensayos, se utilizaron los mismos reactivos de bloqueo, anticuerpo secundario y las mismas placas de ELISA en los seis laboratorios participantes.

Se sensibilizaron placas de máxima absorción (Greiner Microlon) toda la noche a 4 °C con 4 µg /ml de antígeno recombinante (B1 ó B2) y 25 µg /ml para el LH bovino (LHb) en buffer carbonato/bicarbonato de sodio 0.1M pH 9,2. Se utilizaron 100 µl de solución por pocillo. Luego de la sensibilización, el buffer fue reemplazado por solución de bloqueo (5% leche descremada en PBS) y las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y lavadas con PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T). Los sueros se diluyeron 1:200 en PBS-T con 5% de leche descremada y se sembraron por triplicado. Luego de 90 minutos de incubación a 37°C se lavaron las placas 3 veces con PBS-T. El suero anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Sigma) se utilizó en dilución 1:3000 (100µl por pocillo). Se reveló con H₂O₂ y ABTS en buffer citrato 50 mM pH 4.0 (100µl por pocillo), las absorbancias se midieron a 405 nm. El valor de corte se determinó de 2 formas. En un caso se lo definió como la absorbancia promedio de los sueros normales más 3 desvíos estándar. Este método es el comúnmente usado. Alternativamente se construyeron curvas de eficacia diagnóstica con el método *receiver operating characteristic* (ROC) utilizando el programa TG-ROC

versión 050298e-EXCEL97 (Greiner-M, 1995). Este método no considera un único valor de corte sino que determina la sensibilidad y especificidad del ensayo en función de todos los valores de corte posibles calculados con las absorbancias de los sueros normales y los sueros con hidatidosis, construyendo curvas que representan el desempeño diagnóstico para cada valor de corte hipotético. La decisión de tomar un valor de corte determinado queda supeditada a la necesidad de contar con un diagnóstico más sensible y/o específico. La Red determinó el valor de corte tal que la suma del valor de sensibilidad y especificidad sea la mayor.

Usando los dos criterios mencionados los sueros de pacientes con hidatidosis fueron clasificados como verdaderos positivos (vp) o falsos negativos (fn) en base a que el valor de absorbancia sea mayor o menor que el valor de corte determinado previamente. Asimismo los sueros de pacientes con otras parasitosis fueron clasificados como falsos positivos (fp) o verdaderos negativos (vn) de la misma forma. Las siguientes definiciones se utilizaron para calcular los parámetros diagnósticos correspondientes: sensibilidad (%) = $vp \times 100 / (vp + fn)$ y especificidad (%) = $vn \times 100 / (vn + fp)$.

Resultados

3.1. Objetivo 1) Determinar la variabilidad genética y transcripcional del antígeno B dentro y entre genotipos en el estadio protoescólex de *E. granulosus*.

3.1.1. Aislamiento de variantes genómicas del AgB

Los marcadores moleculares independientes empleados en trabajos previos permitieron clasificar de manera consistente los genotipos de *E. granulosus* coexistentes en la Argentina. Debido a que la mayoría de estos genotipos infectan al hombre, resulta interesante determinar la variación en otros genes implicados en la supervivencia del parásito. Es por ello que se analizó el nivel de variación de los genes del AgB presentes en quistes de diferentes genotipos. Se analizaron de 1 a 2 quistes de cada genotipo y se amplificó por PCR los genes *AgB2/AgB4* utilizando el par de *primers* derivados de la secuencia *AgB2* (Fernández *et al.*, 1996). El tamaño del fragmento amplificado fue el esperado, 390 bp, en todos los aislamientos analizados. Se clonaron todos los productos obtenidos a partir de cada aislamiento, se amplificaron los insertos de entre 30 a 40 clones y se analizaron los productos de PCR mediante la técnica de SSCP. Se observaron varios patrones de SSCP diferentes para cada genotipo analizado (figura 10). Para validar la técnica de PCR-SSCP, se secuenciaron dos a cinco clones independientes, representativos de cada patrón observado. No se encontraron diferencias de secuencia nucleotídica en clones con el mismo patrón de SSCP. Se obtuvieron un total de 24 secuencias genómicas relacionadas al AgB (tabla 5). Estas secuencias se agruparon en alguno de los dos genes anteriormente descritos *AgB2* ó *AgB4* (Fernández *et al.*, 1996; Haag *et al.*, 2004), por lo tanto se las denominó *EgB2* o *EgB4* seguido del genotipo (G1-7) y número indicando el tipo de variante después de una "v". Todas las variantes que comparten el mismo número luego de la "v" tienen idéntica secuencia nucleotídica. En cada genotipo se encontró un gran número de variantes relacionadas al AgB. La mayoría de las variantes encontradas en el cluster G1/G2 pertenecen al gen *AgB2*, sólo una secuencia de los 70 clones analizados correspondió al gen *AgB4*. En cambio en los clusters G5 y G6/G7 se encontraron ambas secuencias estando *AgB4* en mayor número de clones. La variante v4 fue la más frecuente, encontrándose en 41 clones del cluster G1/G2. La secuencia de esta variante es idéntica a la primera secuencia correspondiente al *AgB2* publicada

(Fernández *et al.*, 1996). Los aislamientos provenientes de un mismo cluster de genotipos comparten más variantes que aquellos provenientes de diferentes clusters. Por ejemplo, la variante v4 se encuentra presente en todos los aislamientos de G1/G2 analizados y la v15 en todos los aislamientos de G6/G7. Las diferencias nucleotídicas encontradas entre variantes ocurren en las mismas posiciones en secuencias amplificadas en reacciones de PCR independientes y muchas de ellas son compartidas por aislamientos diferentes. Asimismo, la mayoría de las mutaciones encontradas se detectaron en dos de las regiones del gen (intrón y exón 2). Los resultados obtenidos son coincidentes con dos trabajos previos (Fernández *et al.*, 2002; Haag *et al.*, 2004) que describen la presencia de secuencias de *AgB* con sustituciones nucleotídicas siendo algunas de ellas idénticas a las encontradas en este trabajo.

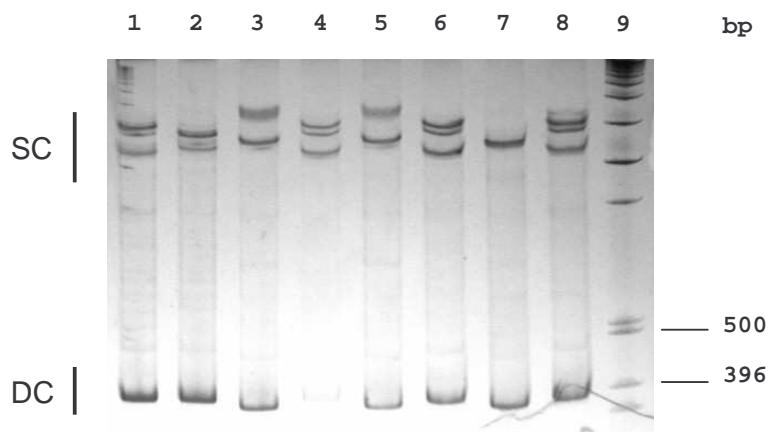


Figura 10. Ensayo de PCR-SSCP del *AgB*. Los genes del *AgB* fueron amplificados por PCR y clonados. A partir de cada aislamiento se aislaron entre 30 a 40 colonias y se identificó la presencia del inserto mediante PCR-colonia. Cada producto de PCR fue desnaturalizado y sembrado en una calle diferente de un gel de poliacrilamida. Los patrones de simple cadena observados son: A (calles 1, 4, 6 y 8); B (calle 2); C (calle 3 y 5) y D (calle 7). Marcador de tamaño calle 9. Se secuenciaron de 2 a 5 clones de cada patrón. SC: Simple cadena de ADN, DC: Doble cadena.

Tabla 5. Análisis genómico del AgB de *Echinococcus granulosus* mediante PCR-SSCP y secuenciación. Genotipo, origen de la muestra, número de clones analizados por quiste, variantes genómicas y número de clones de cada variante de un total de 249 analizados.

Genotipo	Origen de la muestra	Total de clones analizados	Número de clones	Variante
Oveja (G1)	ADN quiste 1	40	12	<i>EgB2G1v9*</i>
			12	<i>EgB2G1v8</i>
			10	<i>EgB2G1v4*</i>
			4	<i>EgB2G1v6*</i>
			1	<i>EgB2G1v7*</i>
			1	<i>EgB4G1v20⁺</i>
			17	<i>EgB2G1v4*</i>
Oveja de Tasmania (G2)	ADN quiste 2	30	7	<i>EgB2G1v1*</i>
			2	<i>EgB2G1v2</i>
			2	<i>EgB2G1v3*</i>
			2	<i>EgB2G1v5*</i>
			14	<i>EgB2G2v4*</i>
Cerdo (G7)	ADN quiste 3	30	7	<i>EgB2G2v12</i>
			7	<i>EgB2G2v13*</i>
			1	<i>EgB2G2v10</i>
			1	<i>EgB2G2v11</i>
			18	<i>EgB4G7v20⁺</i>
			11	<i>EgB2G7v15</i>
			1	<i>EgB4G7v22</i>
Camello (G6)	ADN quiste 4	30	29	<i>EgB4G7v20⁺</i>
			4	<i>EgB4G7v24</i>
			3	<i>EgB2G7v18</i>
			2	<i>EgB2G7v15</i>
			1	<i>EgB4G7v23</i>
			1	<i>EgB2G7v19</i>
			19	<i>EgB4G6v20⁺</i>
Vaca (G5)	ADN quiste 5	40	14	<i>EgB2G6v15</i>
			1	<i>EgB2G6v16</i>
			1	<i>EgB2G6v17</i>
			32	<i>EgB2G5v14</i>
Vaca (G5)	ADN quiste 6	35	12	<i>EgB4G5v21</i>
			12	<i>EgB4G5v21</i>
Total: 249				

Notas: * Variantes genómicas codificantes para la misma proteína AgB2. + variantes genómicas que codifican para la misma proteína AgB4.

3.1.2. Análisis de las variantes nucleotídicas del AgB

Las tres regiones del gen del AgB muestran diferentes niveles de variación. En el exón 1, correspondiente a la secuencia señal, sólo se encontraron 5 sitios polimórficos, mientras que el exón 2 presenta 67. La distribución de polimorfismos a lo largo del gen no es al azar (figura 11). Se realizó un análisis filogenético mediante el método de máxima parsimonia, utilizando las 24 secuencias encontradas junto con secuencias relacionadas al AgB de otras especies del género *Echinococcus* y el genotipo G8 de *E. granulosus* (Números de acceso al Genbank: AY324065 a AY324085). Como grupos externos (*outgroups*) se utilizaron las secuencias de antígenos de *T. crassiceps* y *T. solium* relacionados al AgB (Zarlenga *et al.*, 1994, Chung *et al.*, 1999, Saghir *et al.*, 2000). Como puede verse en la figura 12, las secuencias de AgB halladas pueden asignarse a tres grupos: uno contiene a todas las secuencias relacionadas al gen *AgB4*, otro contiene las relacionadas al *AgB2* y el último contiene secuencias relacionadas al *AgB2* pero que al ser analizadas como se describe en los ítems 3.1.4 y 3.1.6, fueron clasificadas como posibles pseudogenes y por lo tanto denominadas *AgB2p*. Las secuencias relacionadas al *AgB4* se encontraron en todos los clusters de genotipos mientras que las secuencias relacionadas al *AgB2* se encontraron en el cluster G1/G2 y las relacionadas al *AgB2p* en los clusters G5 y G6/G7.

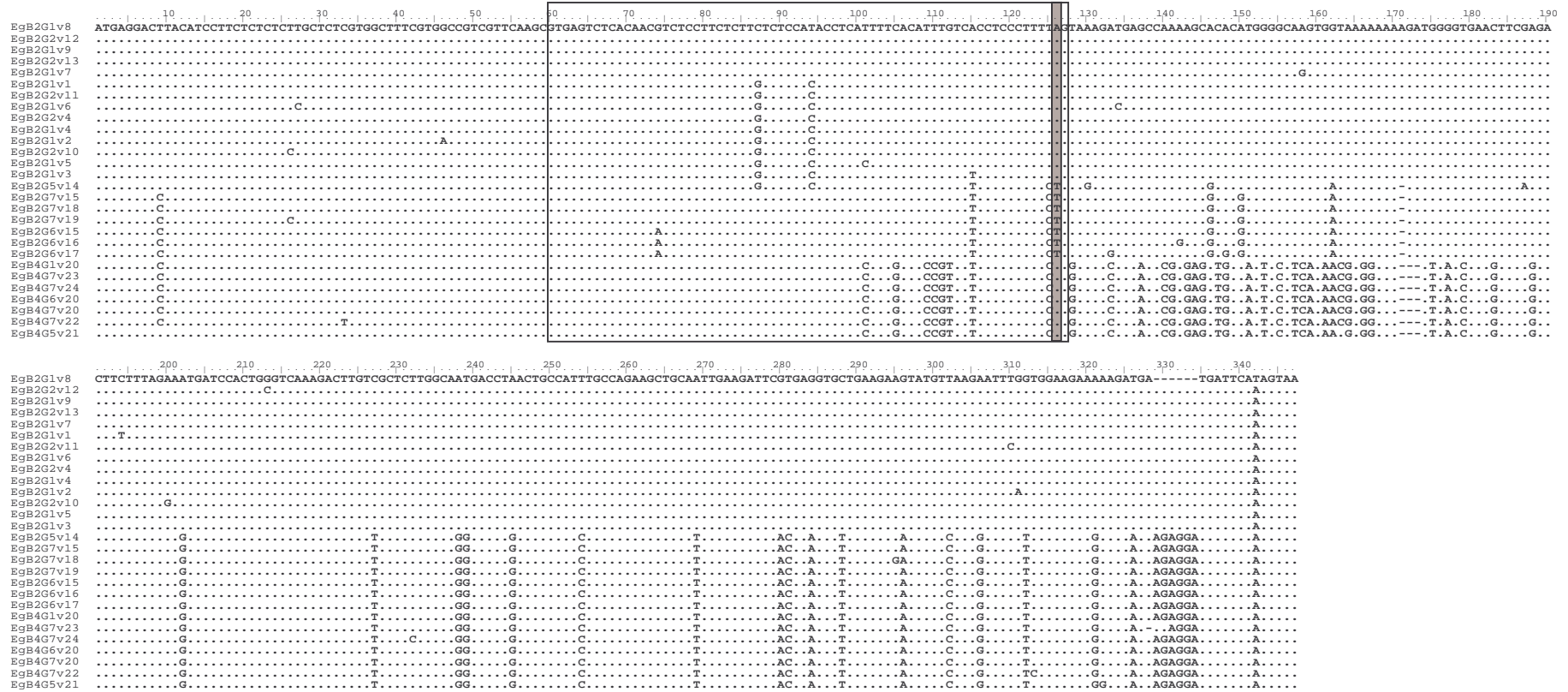


Figura 11. Alineamiento de todas las variantes genómicas de AgB2 y AgB4 de clusters G1/G2, G5 y G6/G7 de *E. granulosus*. Los códigos son los mismos que en la tabla 5. Los puntos indican nucleótidos idénticos a la variante EgB2G1v8. Se encuentra recuadrada la secuencia del intrón, el cuadro gris indica la sustitución en el sitio de splicing presente en las secuencias *AgB2p*. Exón 1: posición 1 a 59. Exón 2: posición 128 a 347. El alineamiento fue realizado mediante el programa Clustal X 1.81.

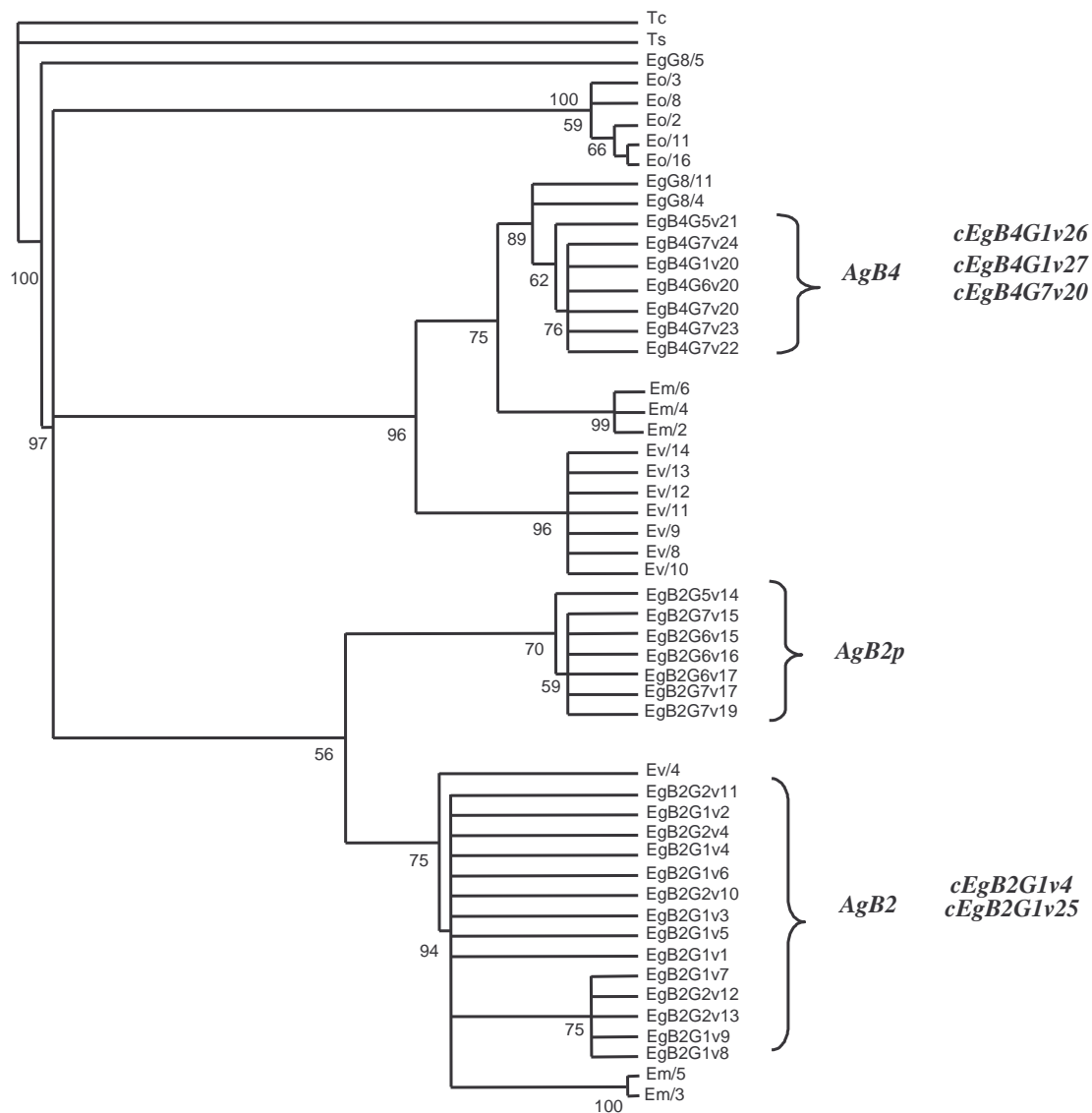


Figura 12. Árbol filogenético obtenido utilizando el método de máxima parsimonia sobre los datos de las secuencias genómicas de los clusters de genotipos G1/G2, G5 y G6/G7 de AgB2 y AgB4 y las secuencias de *E. vogeli*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* y *E. granulosus* genotipo G8 (Números de acceso del Genbank: AY324065 a AY324085). Los números en los nodos indican el porcentaje de ocurrencia de los clados en 1000 réplicas *bootstrap* de los datos. Los taxa representados son: Ts, *T. solium*; Tc, *T. crassiceps*; Ev, *E. vogeli*; Em, *E. multilocularis*; Eo, *E. oligarthrus*; EgG8, *E. granulosus* genotipo G8; seguidos del número de clon; Eg, *E. granulosus* (ver códigos en la tabla 5). Los tres grupos de secuencias, AgB2, AgB2p y AgB4, y las variantes de ADN copia relacionadas a cada grupo se indican a la derecha. Los números en los nodos representan el porcentaje de ocurrencia de clados en 1000 réplicas de *bootstrap* de los datos. El árbol se construyó utilizando el programa PAUP 4.0b8.

3.1.3. Análisis de diversidad nucleotídica e identidad aminoacídica

Para cuantificar la variabilidad en los tres grupos de secuencias de AgB se realizaron análisis de diversidad nucleotídica e identidad aminoacídica. Analizando cada grupo por separado se observa un gran nivel de conservación de todas las regiones del gen del AgB (tabla 6), obteniéndose valores bajos de diversidad nucleotídica y altos de identidad aminoacídica. Por el contrario, si se consideran las secuencias pertenecientes a dos grupos distintos, por ejemplo, todas las secuencias relacionadas al *AgB2* junto con todas las relacionadas al *AgB2p*, la diversidad nucleotídica del intrón y del exón 2 aumentan aproximadamente 10 veces respecto al nivel de diversidad antes mencionado. Esta diversidad refleja las diferencias en las secuencias de *AgB2* encontradas en los clusters, *AgB2* en G1/G2 por un lado, y *AgB2p* en G5 y G6/G7 por otro. Asimismo, cuando se analizan juntos los grupos de secuencias *AgB2* y *AgB4* la identidad aminoacídica observada es sólo de 69% en el exón 2, región del gen correspondiente a la porción secretada de la proteína a la cual codifica. La presencia de estos dos grupos, *AgB2* y *AgB4* en un mismo cluster, G1/G2, podría conferir un mayor repertorio antigénico para estos genotipos.

Tabla 6. Diversidad nucleotídica (π_N) con la desviación estándar (SD) e identidad aminoacídica (AI) de los genes del AgB. Se indican los diferentes clusters de genotipos de *E. granulosus* donde fueron encontrados.

Gen	Cluster		Exón 1	Intrón	Exón 2
<i>AgB2</i>	G1/G2	π_N (SD)	0,0073 (0,0032)	0,0188 (0,0030)	0,0053 (,0011)
		AI	90 %	--	96 %
<i>AgB2p</i>	G5, G6/G7	π_N (SD)	0,0097 (0,0043)	0,0168 (0,0058)	0,0091 (0,0028)
		AI	--*	--	--*
<i>AgB4</i>	G1/G2, G5, G6/G7	π_N (SD)	0,0097 (0,0043)	0	0,0053 (0,0019)
		AI	100 %		94 %
<i>AgB2 + AgB2p</i>	G1/G2, G5, G6/G7	π_N (SD)	0,0135 (0,0028)	0,0416 (0,0042)	0,0499 (0,0074)
		AI	--*	--	--*
<i>AgB2 + AgB4</i>	G1/G2, G5, G6/G7	π_N (SD)	0,0137 (0,0029)	0,0708 (0,0079)	0,1024 (0,0156)
		AI	90%	--	60%
<i>AgB2p + AgB4</i>	G1/G2, G5, G6/G7	π_N (SD)	0,0093 (0,0032)	0,0649 (0,0067)	0,0752 (0,0068)
		AI	--*	--	--*

Nota: **AgB2p* serían pseudogenes.

3.1.4. Análisis de secuencias aminoacídicas deducidas

Sólo 11 secuencias aminoacídicas pueden ser deducidas de las 24 variantes genómicas del AgB encontradas. Esto se debe a que muchos de los cambios nucleotídicos se encuentran en el tercer nucleótido del codón involucrado en el cambio, resultando en la mayoría de los casos sustituciones sinónimas. Una de las 11 variantes proteicas más representada corresponde al AgB2, encontrándose en los tres quistes correspondientes al cluster G1/G2 mientras que otra variante proteica correspondiente al AgB4 fue la más representada en el cluster G6/G7 (ver nota al pie de la tabla 5). Las secuencias aminoacídicas deducidas correspondientes al grupo *AgB2p* no se utilizaron para este análisis. Este grupo de genes posee una sustitución en la posición 126, una transversión A/T, afectando el sitio aceptor de *splicing*, esta sustitución se encontró en productos de reacciones de PCR independientes utilizando como molde ADN de un quiste genotipo G5, un quiste genotipo G6 y dos quistes genotipo G7. El gen *AgB2p* podría sufrir diferentes procesos: 1) que no ocurra el *splicing*, generándose un codon de terminación prematuro; 2) que se utilice el dinucleótido TG como sitio aceptor de *splicing*. Aunque en muy baja proporción se ha descrito la posibilidad de que la secuencia GT-TG funcione como señal de *splicing* no canónica (Bursset *et al.*, 2000; Soong *et al.*, 2002 y el sitio del proyecto genoma de *Arabidopsis thaliana* [http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/Arabidopsis_nonconsensus_splice_sites.shtml]), sin embargo, la secuencia aminoacídica deducida resultante de dicho *splicing* daría un péptido de 38 aminoácidos con baja homología al AgB y 3) que se utilice como sitio aceptor algún dinucleótido AG río abajo del sitio aceptor original, generándose en la mayoría de los casos codones de terminación prematuros o péptidos cortos.

Independientemente del proceso que sufran los genes *AgB2p* probablemente correspondan a pseudogenes, los cuales tienen una estructura general similar al gen funcional AgB2 pero no pueden ser traducidos a una proteína funcional. Para determinar con certeza cuál es el proceso que realmente ocurre sobre los genes de *AgB2p* se realizaron análisis de transcripción (ver ítems 3.1.6.1 y 3.1.6.3).

3.1.5. Sustituciones sinónimas y no sinónimas

Para analizar si existe presión de selección ejercida en los genes del AgB, se compararon las tasas de sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) de cada grupo de secuencias. Se asume que existe algún tipo de selección actuando sobre un determinado grupo de genes si d_S es significativamente diferente de d_N . En particular, si d_S es significativamente mayor a d_N se considera la existencia de selección purificadora, es decir selección en contra de variación a nivel aminoacídico. En el caso del grupo de secuencias de *AgB2p* se consideró el sitio TG (nucleótidos 126-127, figura 11) como aceptor de *splicing*. El menor d_N se encontró en los grupos *AgB2* y *AgB4* (tabla 7). Asimismo sólo en estos grupos de secuencias la relación d_N/d_S fue menor a 1. Particularmente, en el grupo de secuencias correspondiente a *AgB2*, se observó una significativa desviación de la neutralidad ($p < 0.05$, Z-test) sugiriendo que la selección purificadora actúa sobre este grupo de genes del AgB. Se encontró el mayor valor de d_N en el grupo de secuencias *AgB2p* y la relación d_N/d_S fue mayor a 1, sin embargo la hipótesis de neutralidad no pudo ser rechazada con el test exacto de Fisher ni con el test de Tajima.

Tabla 7. Comparación entre sustituciones no sinónimas (d_N) y sustituciones sinónimas (d_S) en las secuencias del AgB.

	N ^a	d_N (S.E.) ^b	d_S (S.E.) ^c	d_N / d_S
<i>AgB2</i>	13	0,003 (0,001)	0,015 (0,006)	0,18*
<i>AgB2p</i>	6	0,013 (0,004)	0,005 (0,005)	2,6
<i>AgB4</i>	5	0,006 (0,003)	0,011 (0,008)	0,54

*Se rechaza hipótesis de neutralidad ($p < 0.05$, Z-test, selección purificadora).

^a Número de secuencias por grupo.

^b Número de mutaciones no sinónimas por cada sitio no sinónimo, calculado usando el método de Nei & Gojobori (1996), entre paréntesis: el error estándar estimado mediante 1000 réplicas de *bootstrap*.

^c Número de mutaciones sinónimas por cada sitio sinónimo, calculado como en pie de página b.

Los códigos de los grupos de secuencias del *AgB* son los mismos que en la figura 12.

3.1.6. Análisis de transcripción de las variantes del AgB

3.1.6.1. Análisis transcripcional mediante SSCP-PCR

Para analizar el patrón de transcripción de los genes del AgB en el estadio larval de *E. granulosus*, se realizaron reacciones de RT-PCR seguidas de clonado y PCR-SSCP sobre ARN de protoescolices de quistes de los genotipos G1 y G7. Se obtuvieron 6 variantes diferentes de ADN copia (tabla 8), la mayoría de ellas correspondientes a alguna de las variantes genómicas

encontradas (tabla 5). Las variantes de ADN copia encontradas en la mayoría de los clones fueron las mismas que las encontradas en alta frecuencia en el análisis genómico. Asimismo, coincidentemente con el análisis genómico, los quistes pertenecientes al mismo genotipo comparten variantes de ADN copia. Se observaron transcritos correspondientes al *AgB2* en los dos quistes de genotipo G1 analizados, la mayoría de ellos correspondientes a la secuencia *cEgB2G1v4* que tiene la misma secuencia aminoacídica deducida que la secuencia *AgB2* reportada por Fernández *et al.* (1996). En este genotipo sólo se encontraron dos clones conteniendo secuencias correspondientes al grupo *AgB4*. En el genotipo G7 sólo se encontraron ADNs copia relacionados al *AgB4*, con una identidad aminoacídica de 88 % respecto a las secuencias de ADN copia de *AgB4* presentes en el genotipo G1. Por otro lado, si se comparan las dos proteínas más representadas en los genotipos G1 y G7 se observa que la identidad aminoacídica entre el *AgB4* de G7 y el *AgB2* de G1 es de 68%. De acuerdo con lo observado en el análisis genómico, ningún ADN copia analizado correspondió a secuencias relacionadas al grupo *AgB2p* lo que sugiere que este grupo de secuencias no se transcribe en el genotipo G7. No puede descartarse un sesgo producido por la técnica empleada que involucra la amplificación de los genes *AgB2* y *AgB4* con un mismo juego de *primers*. Si la abundancia de transcritos iniciales de cada gen es significativamente diferente se corre el riesgo de perder las variantes menos frecuentes, que en este caso podrían ser las del *AgB2p*. Es por ello que se realizaron ensayos con *primers* gen específicos (ver ítem 3.1.6.3).

Tabla 8. Análisis de expresión del AgB de *E. granulosus* mediante PCR-SSCP y secuenciación. Genotipo, origen de la muestra, número total de clones, número de clones con cada variante de ADN copia y las variantes obtenidas de un total de 90 clones analizados.

Genotipo	Origen de la muestra	Total de clones analizados	Nº de clones	Variantes
Oveja (G1)	ARN quiste 1	20	19	<i>cEgB2G1v4</i> *
			1	<i>cEgB2G1v25</i>
	ARN quiste 8	20	18	<i>cEgB2G1v4</i> *
			1	<i>cEgB4G1v26</i>
Cerdo (G7)	ARN quiste 4	20	1	<i>cEgB4G1v27</i>
			19	<i>cEgB4G7v20</i> ⁺
	ARN quiste 9	30	30	<i>cEgB4G7v28</i> ⁺
		Total: 90		

Nota: * variantes de ADN copia que codifican para la misma proteína AgB2. + variantes de ADN copia que codifican para la misma proteína AgB4.

Cuando todas las variantes de ADN copia son alineadas se observa que la región N-terminal del AgB es la más variable. Las variantes proteicas codificadas por el grupo de clones *cEgB2* y el grupo *cEgB4* tienen un 30% de identidad aminoacídica en dicha región (posiciones 8 a 30) mientras que la región central posee un 85 % de identidad (posiciones 31 a 68) (figura 13). Cabe destacar que la región N-terminal de las subunidades secretadas del AgB nativo muestran una concentración de epítopes para el reconocimiento de anticuerpos humanos (González-Sapienza *et al.*, 2000). Asimismo se observa que los péptidos SDPLGQK y LGEIR previamente encontrados en el AgB nativo por (González *et al.*, 1996), pertenecerían a las subunidades de AgB4 (recuadrados en rojo en la figura 13), lo que sugiere que la/s proteínas codificadas por *AgB4* forman parte de la proteína nativa. La identidad aminoacídica entre las variantes de AgB encontradas es menor a la observada en antígenos relacionados al AgB presentes en *T. crassiceps* y *T. solium* (74 % idénticos en la región N-terminal). También se observa variación en la región carboxi-terminal del AgB, las proteínas AgB4 del genotipo G7 tienen un tramo de seis glutamatos entre las posiciones 72 a 80 mientras que las proteínas AgB2 poseen sólo dos.

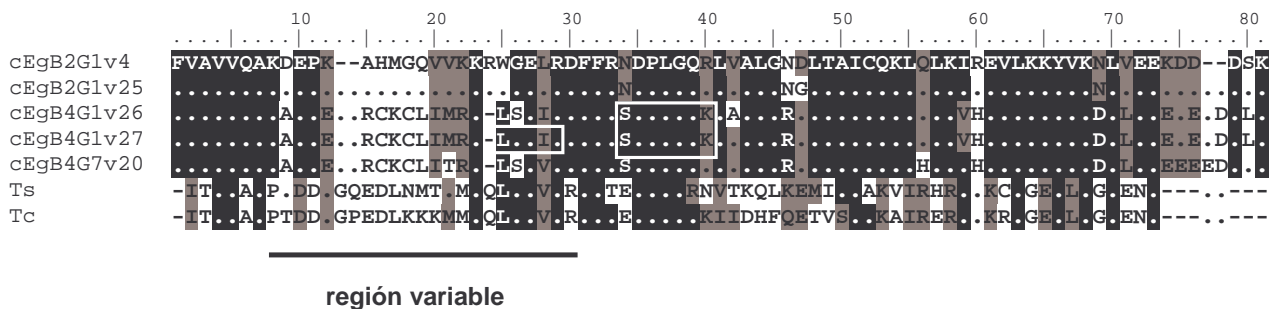


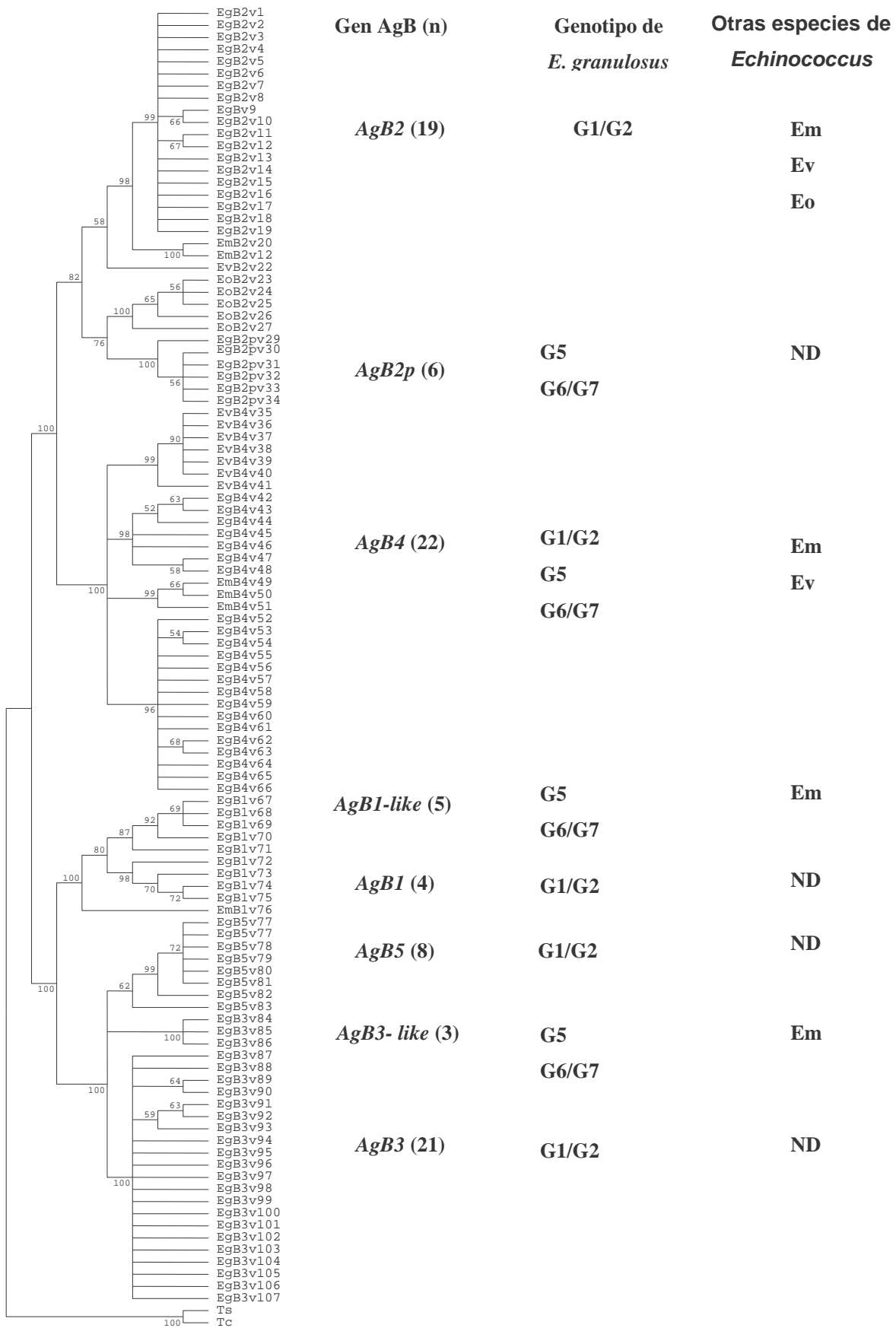
Figura 13. Análisis transcripcional del AgB a partir de protoescólices de los genotipos G1 y G7 de *E. granulosus*. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas obtenidas por análisis de RT-PCR. Se alinearon además dos proteínas pertenecientes a la misma familia del AgB: Ts, *T. solium*; Tc, *T. crassiceps*. La región variable N-terminal se encuentra subrayada (posiciones 8 a 30). Se recuadran los péptidos encontrados en el AgB nativo por González *et al.* (1996). Los puntos indican aminoácidos idénticos respecto a la variante *cEgB2G1v4*. Los residuos idénticos se sombrearon en negro y las sustituciones conservadas en gris. Los códigos son los mismos que en la tabla 8. El alineamiento se realizó con el programa Clustal X 1.81.

3.1.6.2. Análisis comparativo con otros miembros de la familia del AgB

Mediante la técnica de PCR-SSCP utilizando los *primers* descritos por Frosch *et al.* (1994) y seguida de secuenciación, también se analizó la

variabilidad del grupo de secuencias del *AgB* correspondientes a los genes *AgB1*, *AgB3* y *AgB5* (Muzulin *et al.*, 2007). Estos datos sumados a los expuestos anteriormente revelan que los clusters de genotipos G1/G2, G5 y G6/G7 de *E. granulosus* presentes en la Argentina contienen al menos 42 secuencias relacionadas con el *AgB*, muchas de las cuales no han sido reportadas previamente. Estas, junto a las depositadas en bancos de datos suman 101 secuencias diferentes (Frosch *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1996; Haag *et al.*, 2004; Arend *et al.*, 2004; secuencias de ADN copia disponibles en <http://zeldia.cap.ed.ac.uk/Lopho/LophDB.php>). Varias de estas secuencias sólo presentan diferencias en la región correspondiente al intrón del *AgB*, por lo tanto de las 101 reportadas, 88 corresponden a variantes de ADN copia. Para estudiarlas en conjunto, las secuencias de ADN copia fueron analizadas mediante métodos filogenéticos y demostraron agruparse en los cinco genes previamente descritos (*EgAgB1-5*), observándose además nodos diferenciales entre los clusters de genotipos G5, G6/G7 y el cluster G1/G2 correspondientes a los genes *AgB1*, *AgB2* y *AgB3*. Las secuencias relacionadas con el *AgB5* sólo fueron detectadas en el cluster G1/G2. También se encontraron diferencias en el número de variantes de cada gen presentes en cada genotipo (figura 14). En otras especies del género *Echinococcus* también se observan secuencias relacionadas al *AgB* y presentan variantes de las mismas, sin embargo no puede compararse el nivel de variabilidad encontrado en *E. granulosus* con el del resto de los miembros del género *Echinococcus* debido a que no se realizó un estudio exhaustivo en cada especie (Haag *et al.*, 2005).

El análisis por PCR-SSCP de transcritos correspondientes a los cinco genes muestra que los protoescolices del genotipo G1 transcriben todas las subunidades mientras que en el genotipo G7 no se observan transcritos correspondientes a *AgB2* ni a *AgB5* (figura 15). La identidad aminoacídica entre todos los genes encontrados en estos dos genotipos tiene un rango de 33 a 85% por lo que la falta de expresión de algunos genes sugiere la existencia de diferencias antigénicas que podrían indicar una función de evasión del sistema inmune en cada hospedador específico. Aún más, las subunidades son variables en la región de aminoácidos 27 a 34 (figura 15 A y B) correspondiente a la secuencia EVKYFFER del *AgB1* descrita como inmunodominante (González-Sapienza & Cachau, (2003).



leyenda en hoja siguiente

Figura 14. Árbol filogenético obtenido por el método de *Neighbor-joining* utilizando las regiones codificantes del AgB de *Echinococcus sp.* Las variantes del AgB se agruparon en los genes y el pseudogen previamente descritos. Cada secuencia está indicada por el taxón (Eg, Em, Ev o Eo), subunidad del gen (B1-B5) y un número luego de una "v" que representa las diferentes variantes. Se indica la presencia y número de cada subunidad. Las especies representadas son: Eg, *E. granulosus*; Ev, *E. vogeli*; Em, *E. multilocularis*; Eo, *E. oligarthrus*. Las secuencias utilizadas como *outgroups* son: Ts, *T. solium*; Tc, *T. crassiceps* (Números de acceso al Genbank AF076609 y U07150, respectivamente). ND: no determinado. Los números en los nodos representa el porcentaje de ocurrencia de clados en 1000 réplicas de *bootstrap* de los datos. El árbol se construyó utilizando el programa MEGA 2.1.

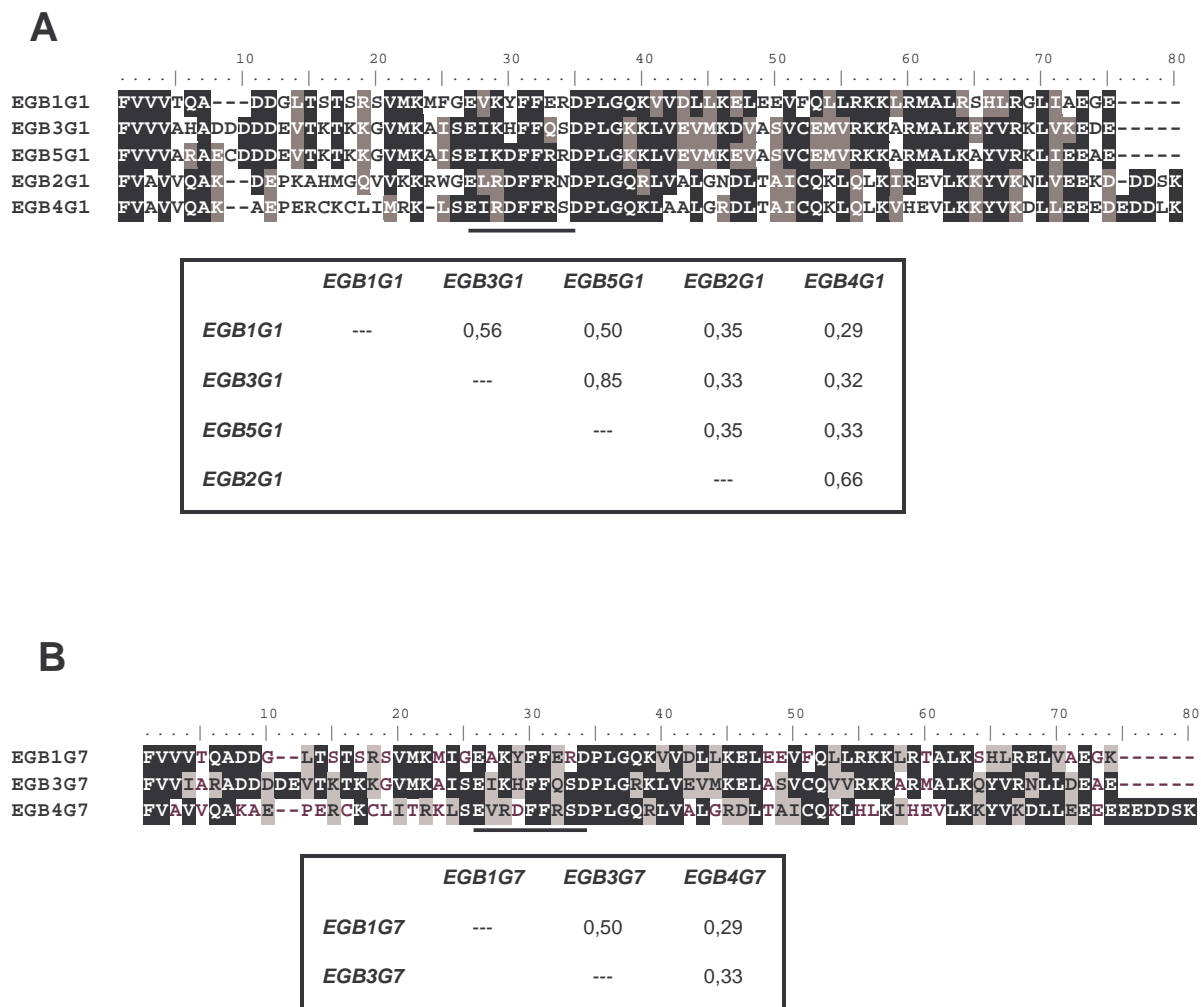


Figura 15. Análisis transcripcional de los genotipos G1 y G7 de *E. granulosus*. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas obtenidas por análisis de RT-PCR. En las matrices se muestra la identidad aminoacídica de a pares de secuencias. Los residuos idénticos se indican en negro y las sustituciones conservadas en gris. Se muestra subrayada la región inmunodominante (**EVKYFFER**, aminoácidos en negrita son los involucrados en la unión al anticuerpo), según el análisis de González-Sapienza & Cachau, (2003). El alineamiento se obtuvo utilizando el programa Clustal X 1.81. A: secuencias representativas del genotipo G1. B: secuencias representativas del genotipo G7

3.1.6.3. Análisis de transcripción mediante RT-PCR con *primers* específicos de subunidad

Para determinar si la ausencia de expresión de los genes AgB2 y AgB5 en el genotipo G7 se debe a un sesgo de la técnica de PCR-SSCP se diseñaron *primers* específicos de cada subunidad. Para ello se realizaron búsquedas de secuencias en bases de datos específicas (LophoDB) y generales (Genbank) y se alinearon junto con las secuencias obtenidas en el ítem 3.1.1. Mediante múltiples alineamientos, construcción de árboles filogenéticos y observaciones manuales se agruparon las secuencias encontradas en los cinco genes descritos. Se eliminaron las secuencias redundantes y se realizó un último alineamiento sólo con variantes diferentes (ver figuras en el apéndice). Los criterios utilizados para el diseño de *primers* fueron los siguientes:

- 1) complementariedad con zonas conservadas de todas las variantes dentro de cada gen.

- 2) *primer* “forward” sobre exón 1, *primer* “reverse” sobre exón 2, de manera de discriminar por tamaño los fragmentos resultantes de la amplificación del ADN copia de aquellos que pudieran surgir de una eventual contaminación con ADN genómico.

En los casos que fue necesario se diseñaron *primers* degenerados. En la figura 16 se muestra un esquema de los productos esperados.

Antígeno B

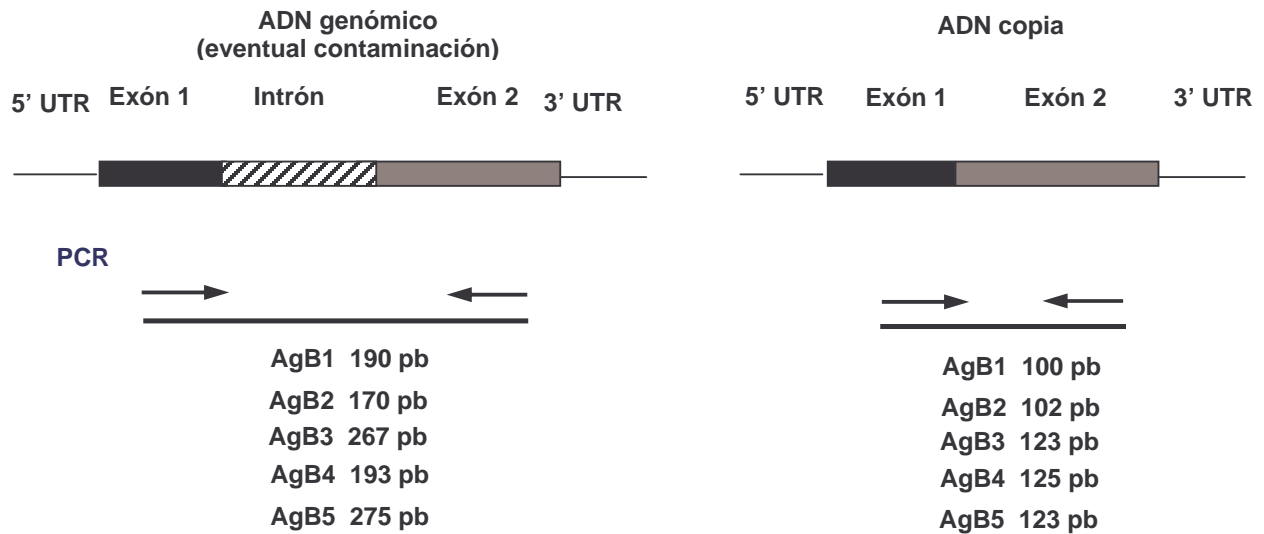


Figura 16. Esquema del gen y el ADN copia del *AgB*. Se indican los productos esperados con los *primers* específicos diseñados para cada subunidad. Las flechas simbolizan los *primers* utilizados.

La especificidad de los *primers* fue evaluada mediante PCRs empleando como molde los insertos genómicos correspondientes a cada gen clonados en el vector pGEM-T. Como se observa en la figura 17 cada par de *primers* reconoce específicamente al gen o genes para el que fue diseñado.



Figura 17. Determinación de especificidad de *primers*. Los productos de PCR con *primers* específicos fueron sembrados en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y observados a la luz UV. Calles 1, 7, 13, 19 y 25 ADN plasmídico conteniendo el inserto *EgB1* como templado; 2, 8, 14, 20 y 26 ADN plasmídico conteniendo el inserto *EgB2*; 3, 9, 15, 21 y 27 ADN plasmídico conteniendo el inserto *EgB2p*; 4, 10, 16, 22 y 28 ADN plasmídico conteniendo el inserto *EgB3* como templado; 5, 11, 17, 23 y 29; ADN plasmídico conteniendo el inserto *EgB4*; 6, 12, 18, 24 y 30 ADN plasmídico conteniendo el inserto *EgB5*; en todos los casos se utilizó 5 ng de ADN. Calles 1-6 *primers* AgB1; calles 7-12 *primers* AgB2; calles 13-18 *primers* AgB3; calles 19-24 *primers* AgB4; calles 25-30 *primers* AgB5. Marcador de peso molecular 50bp.

Los resultados de las PCR con *primers* subunidad específicos sobre ARN total de protoescólices de los genotipos G7 y G1, se muestran en la figura 18.

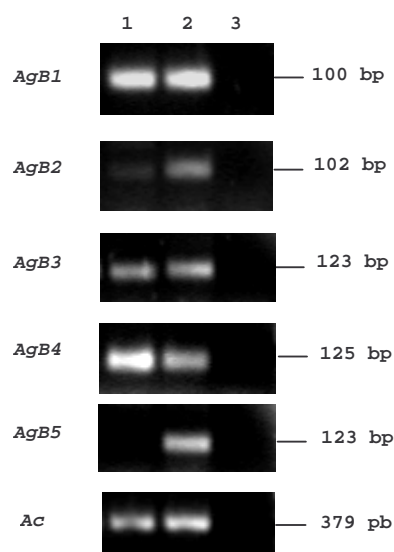


Figura 18. Análisis de transcripción del AgB mediante *primers* gen específicos. ARN total de protoescólices de genotipo G7 y G1 fueron sometidos a RT-PCR utilizando *primers* gen AgB-específicos. De arriba hacia abajo: productos de amplificación obtenidos con los *primers* específicos para *AgB1*, *AgB2*, *AgB3*, *AgB4*, *AgB5* y *actina* (AC). Calle 1, protoescólices genotipo G7; calle 2, protoescólices genotipo G1; calle 3, control sin el agregado de enzima retrotranscriptasa. Los productos de amplificación del AgB obtenidos fueron purificados y secuenciados

El *AgB2* parece expresarse en baja proporción en protoescólices de genotipo G7. La baja intensidad del producto amplificado sugiere que el transcripto *AgB2* se encuentra en menor proporción en el genotipo G7 que en el genotipo G1, lo que explicaría su ausencia en el análisis de transcripción realizado por PCR-SSCP. Además puede observarse que el *AgB5* no se amplificó con los *primers* específicos. La ausencia de *AgB5* en protoescólices de genotipo G7 es esperada ya que tampoco pudo amplificarse a partir de ADN genómico de parásitos de genotipo G7 (Muzulin *et al.*, 2007).

Con el objetivo de determinar si el transcripto obtenido a partir del genotipo G7 con los *primers* correspondientes al *AgB2* codificaría para una proteína funcional se secuenció el producto obtenido (*cEgB2/B2pG7*). El alineamiento con la secuencia genómica *AgB2p* representativa del genotipo G7 (*EgB2G7v15*) revela que el transcripto aislado posee 5 nucleótidos menos que lo esperado para una secuencia correspondiente al exón 2 del *AgB2* (recuadro de figura 19). La secuencia faltante incluye la señal AG canónica como

aceptora de *splicing*. Este tipo de procesamiento del transcrito provoca un cambio del marco de lectura que daría un codón de terminación prematuro. Cabe aclarar que los *primers* utilizados no permiten discriminar entre *AgB2* y *AgB2p*.

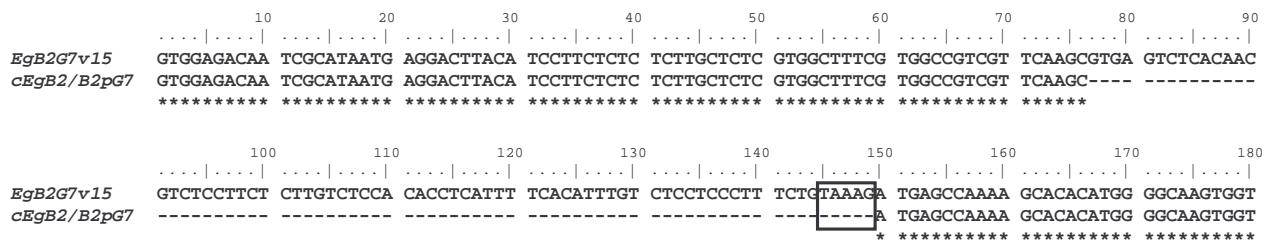


Figura 19. Análisis transcripcional del *AgB2/AgB2p* del genotipo G7. Alineamiento de la secuencia obtenida de ADN copia generado con *primers* gen específicos para *AgB2* y *AgB2p* con una variante genómica del *AgB2* del genotipo G7 (*EgB2G7v15*). Los asteriscos indican nucleótidos idénticos a la secuencia *EgB2G7v15*. Se encuentra recuadrada la secuencia faltante en el transcrito obtenido del genotipo G7 (*cEgB2/B2pG7*). Exón 1: posición 1 a 76; intrón: posición 77 a 144, exón 2: posición 145 a 180. El alineamiento fue realizado mediante el programa Clustal X 1.81.

Estos resultados indicarían que los pocos transcritos correspondientes al *AgB2* del genotipo G7 no resultan en una proteína funcional. Sin embargo no puede descartarse que ocurran otros procesos de procesamiento de este transcrito (ver ítem 3.1.4). Transcritos correspondientes al *AgB2* con pérdidas de hasta 45 nucleótidos fueron descritos para el genotipo G1 (Arend *et al.*, 2004).

3.2. Objetivo 2) Determinar la localización de la expresión de las subunidades del AgB en el estadio protoescólex

3.2.1. Hibridación *in situ* del AgB

Mediante la técnica de hibridación *in situ* sobre cortes histológicos del metacestode de *E. granulosus* y utilizando como sonda una secuencia común a los genes *AgB2* y *AgB4*, se observó que la expresión de los antígenos *AgB2/B4* se encuentra en el tegumento que recubre a los protoescólices (figura 20). Estos hallazgos son coherentes con los trabajos que sugieren que la proteína se localiza en el tegumento del parásito (Yarzabal *et al.*, 1977; Rickard *et al.*, 1977) y en particular muestran la localización de la expresión de los genes *AgB2* y *AgB4*.

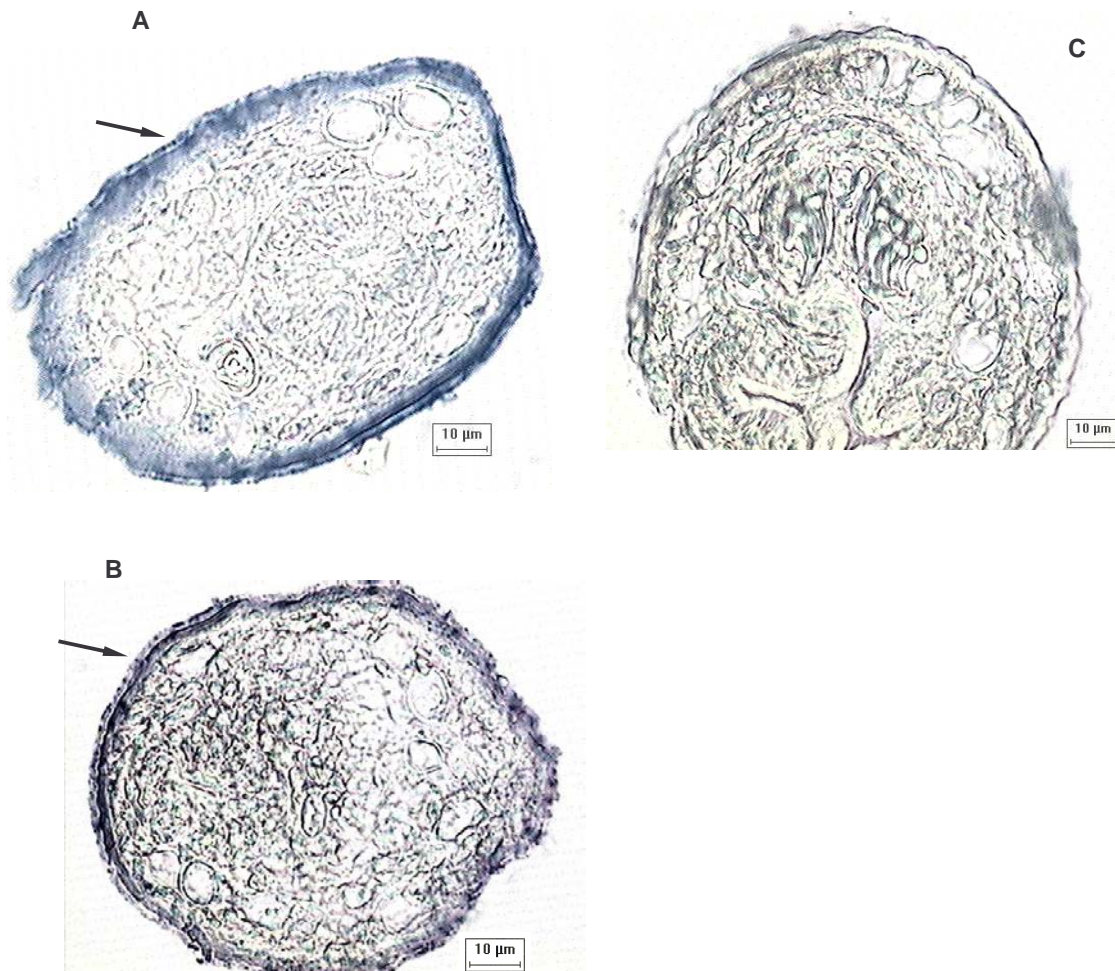


Figura 20. Hibridación *in situ* sobre cortes de protoescolices utilizando ribosondas marcadas con digoxigenina; A) y B) sonda antisentido AgB; C) sonda sentido 3g2 como control negativo. Las flechas indican la señal observada. 40X.

3.2.2. Producción de AgB recombinantes

Para la obtención de anticuerpos monoclonales necesarios para los ensayos de inmunolocalización y los ensayos serológicos (ver ítem 3.4) se clonaron, expresaron y purificaron las secuencias codificantes de las subunidades AgB2 (clon *cEgB2G1v4*) y AgB4 (clon *cEgB4G7v20*). Como primera estrategia se intentó clonar las proteínas AgB2 y AgB4 en vectores previamente utilizados para la expresión del AgB (Rott *et al.*, 2001). Si bien la proteína rAgB2 pudo expresarse, la proteína rAgB4 no mostró ningún clon inducido. Los plásmidos recombinantes recuperados luego de los intentos de inducción mostraron cambios nucleotídicos con respecto al inserto original. Posteriormente se evaluaron diferentes duplas de vectores - cepas de bacterias. Sólo se muestran los resultados obtenidos con el vector pET22b, el

único en que se pudo expresar el rAgB4. El tamaño de las proteínas recombinantes esperado es de aproximadamente 8 kDa y múltiplos de 8kDa, sin embargo en los geles de SDS-PAGE no pudieron detectarse bandas de inducción apreciables. Sólo se detectó una banda muy tenue en los clones correspondientes al rAgB2 que podría corresponder al dímero del AgB (ver flecha en figura 21, calle 8).

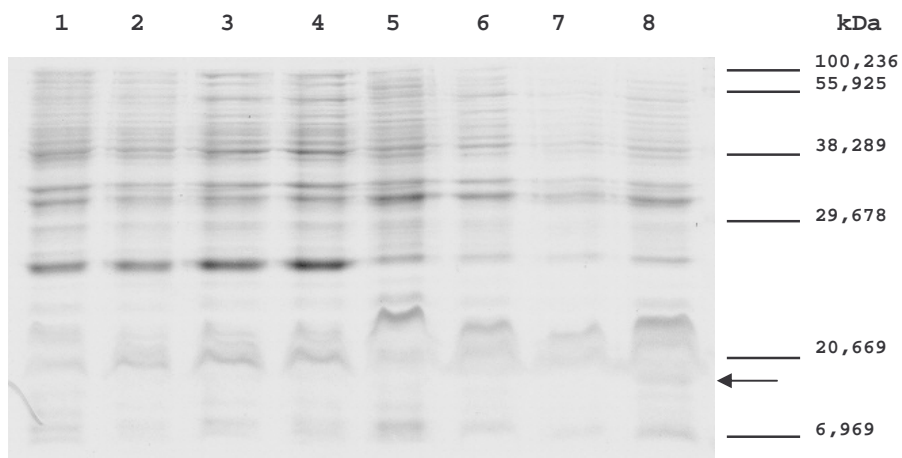


Figura 21. Expresión de rAgB2 y rAgB4. Las regiones codificantes correspondientes a los clones AgB2 (clon cEgB2G1v4) y AgB4 (clon cEgB4G7v20) fueron ligadas al vector de expresión pET22 (Novagen) y utilizadas para transformar bacterias *E. coli* BL21 codon plus (Stratgene). Se seleccionaron los clones conteniendo el inserto en marco de lectura correcto. La inducción se realizó con 1mM de IPTG. Los extractos bacterianos se separaron en geles SDS-PAGE 20% en condiciones reductoras y se tiñeron con *Coomassie blue*. Se analizaron diferentes temperaturas y tiempos de inducción. Calles 1-4 clones AgB4; calles 5-8 clones AgB2. Calle 1 y 5 bacterias no inducidas; calles 2 y 6 inducción a 30 °C O.N.; calles 3 y 7 37 °C, 2 horas; 4 y 8 37°C 4 horas. Se señala con una flecha la banda de inducción.

Para optimizar las condiciones de inducción se probaron diferentes concentraciones de IPTG como inductor y se realizaron inmunoblots para la búsqueda de clones inducidos (figura 22).

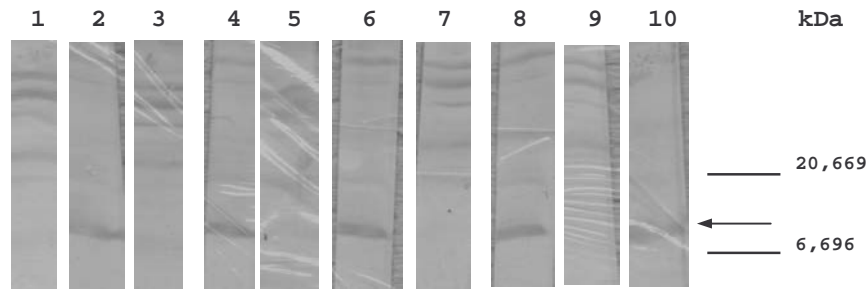


Figura 22. Inmunoblot de extracto de bacterias inducidas transformadas con genes del AgB. Las regiones codificantes para AgB2 (clon cEgB2G1v4) y AgB4 (clon cEgB4G7v20) fueron purificadas y ligadas al vector de expresión pET22 (Novagene) y utilizadas para transformar bacterias *E. coli* BL21 codon plus (Stratagene). Se seleccionaron los clones conteniendo el inserto en marco de lectura correcto. Se indujo a las bacterias conteniendo los plásmidos recombinantes a 37°C durante 4 hs y se evaluaron diferentes concentraciones de IPTG. Los extractos bacterianos fueron separados en geles de SDS-PAGE al 20% en condiciones reductoras y transferidos a filtros de nitrocelulosa. Calles 1-6 clones AgB4; calle 7-10 clones AgB2. Calles 1,2, 7 y 8: 0,5 mM IPTG; calles 3, 4, 9 y 10: 1 mM IPTG, calles 5 y 6: 2 mM IPTG. Calles 1, 3, 5, 7 y 9 proteína incubadas con suero humano normal 1/200. Calles 2, 4, 6, 8 y 10 proteínas incubadas con suero estándar anti-*Echinococcus* (NIBSC) 1/200. El antisuero utilizado fue anti IgG humana conjugada con peroxidasa 1/3000 y revelado con DAB.

De esta forma pudieron detectarse clones que expresan una proteína del tamaño esperado para el monómero del AgB, que es reconocida por el suero anti- *Echinococcus* y no por suero humano normal. Las distintas concentraciones de IPTG analizadas no resultaron en una inducción significativamente diferente por lo que se decidió realizar los experimentos de inducción a gran escala en presencia de IPTG 1mM. Las proteínas recombinantes presentes en los extractos bacterianos fueron purificadas por columnas de afinidad. Para la obtención de 150µg de proteína recombinante debieron inducirse 3 litros de cultivo. La cantidad de bandas observadas luego de purificar las proteínas recombinantes indicaría que éstas se purifican como monómeros, dímeros y trímeros (figuras 23 y 24), en concordancia, el auto ensamblaje de los monómeros rAgB1, rAgB2 y rAgB3 fue recientemente descrito (Monteiro *et al.*, 2006).

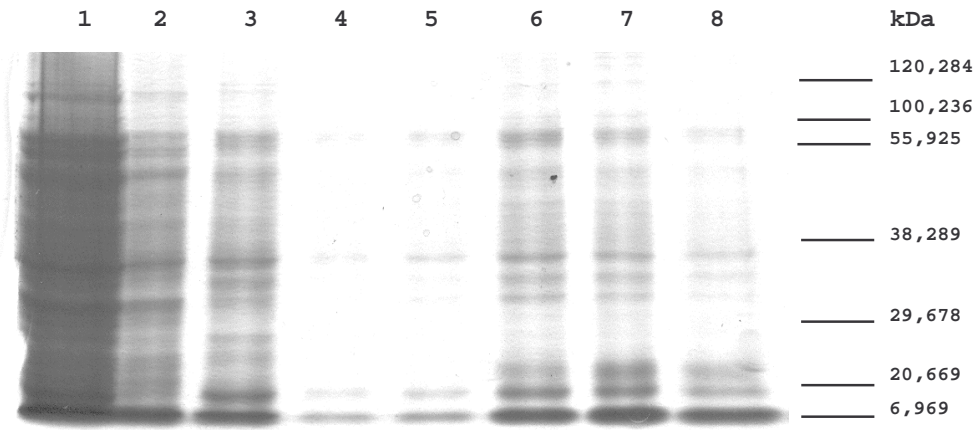


Figura 23. Proteínas AgB4 purificadas por columna de afinidad. Gel SDS-PAGE 20% teñido con *Coomassie blue*. Se realizaron cultivos a gran escala, se indujeron con IPTG 1mM, 37 °C durante 4 hs y se purificaron por columnas de afinidad. Calles: 1: extracto bacteriano sonicado antes de pasar por columna; 2, sobrante de la columna; 3; lavados; 4, primera elución; 5 segunda elución; 6, tercera elución; 7 cuarta elución; 8, quinta elución.

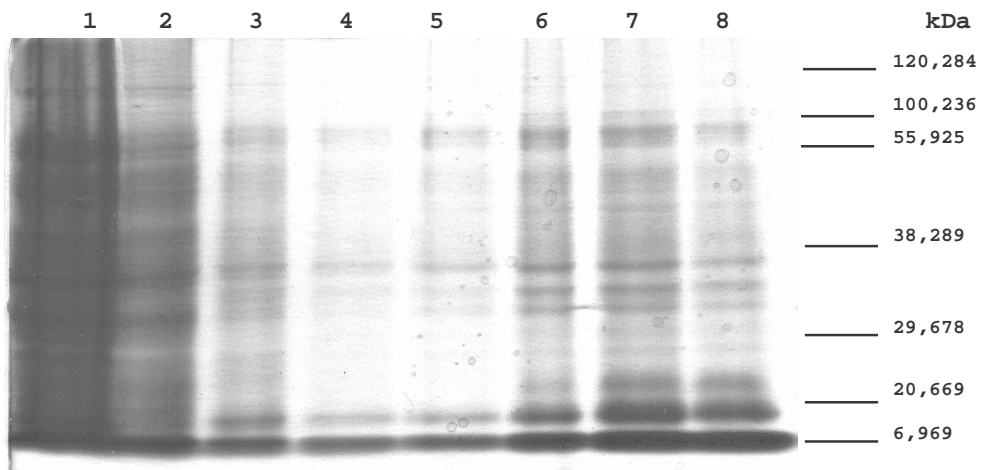


Figura 24. Proteínas AgB2 purificadas por columna de afinidad. Gel SDS-PAGE 20% teñido con *Coomassie blue*. Se realizaron cultivos a gran escala, se indujeron con IPTG 1mM, 37 °C durante 4 hs y se purificaron por columnas de afinidad. Calles: 1: extracto bacteriano sonicado antes de pasar por columna; 2, sobrante de la columna; 3; lavados; 4, primera elución; 5 segunda elución; 6, tercera elución; 7 cuarta elución; 8, quinta elución.

Para corroborar estos resultados se realizaron inmunoblots (figura 25). Las proteínas recombinantes se obtuvieron en forma de monómeros, dímeros y trímeros siendo reconocidos por suero estándar anti-*Echinococcus*, dando un patrón de bandas del tamaño esperado.

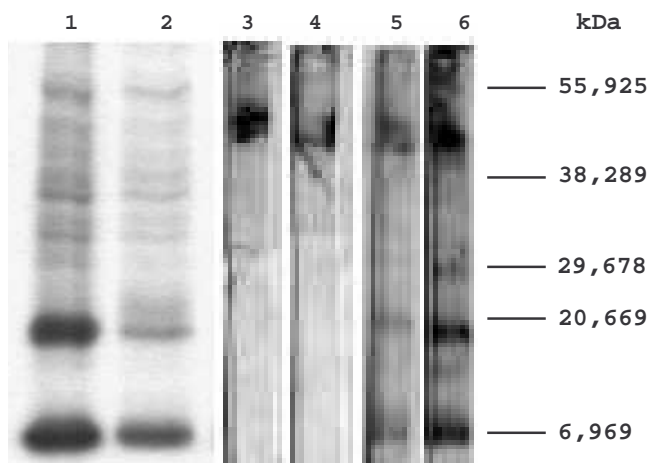


Figura 25. Gel de SDS-PAGE e inmunoblot del AgB recombinante. Las proteínas rAgB2 y rAgB4 purificadas por columna de afinidad (calles 1 y 2) fueron sembradas en un gel SDS-PAGE 20% y se tiñeron con *Coomassie blue*. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con suero humano normal (calles 3 y 4) ó suero estándar anti-*Echinococcus* (NIBSC) (calles 5 y 6) dilución 1/200. El antisuero utilizado fue anti IgG humana conjugada con peroxidasa 1/3000 y revelado con DAB. Calles 1, 3 y 5 proteína rAgB4; calles 2, 4 y 6 proteína rAgB2.

3.2.3. Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron inmunizando ratones con LHo y rAgB2 obtenido. Luego de la fusión, se realizó el rastreo mediante inmunoblots evaluando la capacidad de los clones de reconocer al AgB presente en LHo. Los clones elegidos fueron expandidos en líquido ascítico. Los anticuerpos monoclonales así obtenidos fueron caracterizados en cuanto a su capacidad de reconocer LHo, rAgB2, rAgB4 obtenidos en nuestro laboratorio y el rAgB1 provisto por la RSSH. En la figura 26 se muestra que los dos anticuerpos seleccionados reconocen al monómero, dímero y trímero de AgB presentes en LHo. Con respecto a las proteínas recombinantes, el anticuerpo monoclonal denominado MAb B1 solo reconoce al rAgB1 y el anticuerpo monoclonal denominado MAb B2/B4 reconoce principalmente a la proteína rAgB2 y en menor medida al rAgB4.

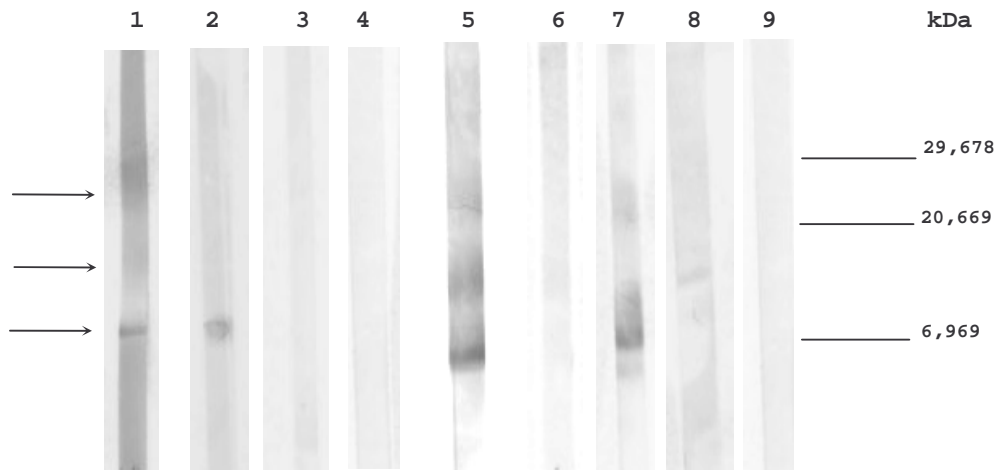


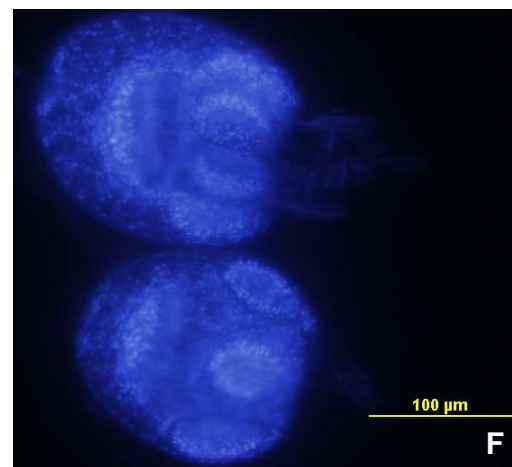
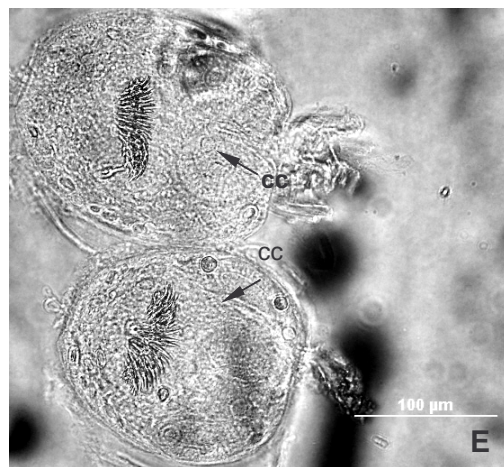
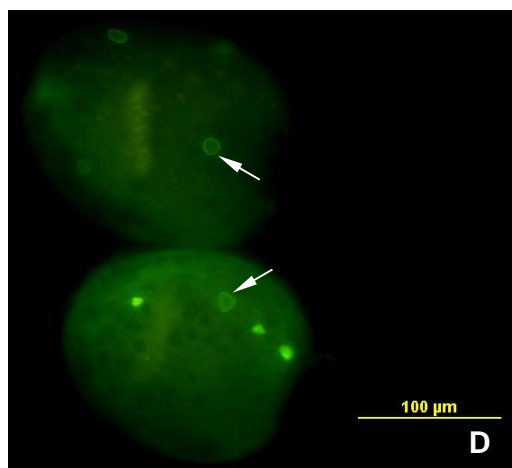
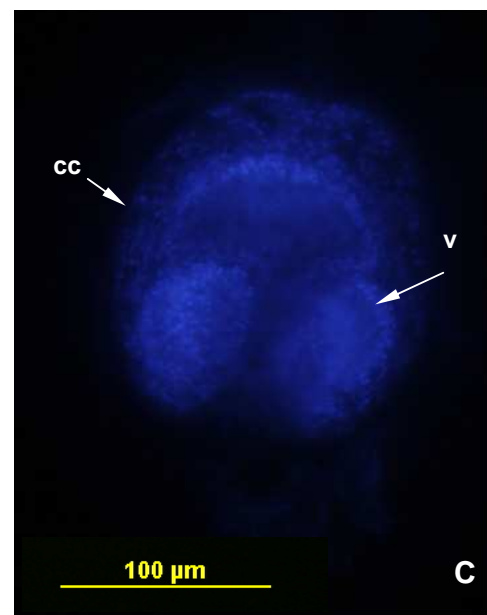
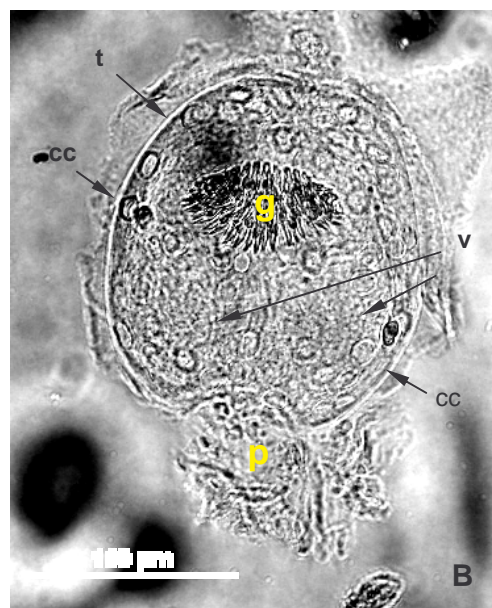
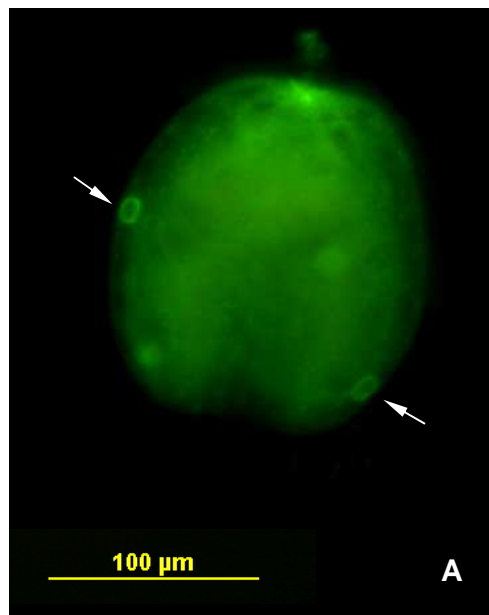
Figura 26. Especificidad de los anticuerpos monoclonales anti AgB. Inmunoblot realizado con las proteínas LHo (calles 1,5 y 9); AgB1 (calles 2 y 6); AgB2 (calles 3 y 7) y AgB4 (calles 4 y 8). Se sembraron 10 μ g de LHo por calle y 3 μ g de las proteínas recombinantes por calle. Calles 1- 4: MAb B1 1/200; calles 5-8: MAb B2/B4 1/200. Calle 9: MAb anti proteína "Sex lethal" de *D. melanogaster* 1/200 (control negativo). Las flechas indican al monómero, dímero y trímero del AgB. El anticuerpo secundario utilizado fue anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa 1/1000 y revelado con DAB. El rAgB1 fue producido por la RSSH.

3.2.4. Inmunolocalización del AgB en protoescólex

Los anticuerpos monoclonales anti AgB generados se utilizaron en ensayos de inmunofluorescencia sobre protoescólices enteros de los genotipos G1 y G7. Se evaluaron diferentes métodos de fijación (ver materiales y métodos). Los anticuerpos policlonales anti tropomiosina (Esteves *et al.*, 2003) ó anti 3G2 de *E. granulosus* (Camicia *et al.*, en preparación) utilizados como control dieron la señal esperada con todos los métodos de fijación (datos no mostrados). Sin embargo los anticuerpos anti AgB empleados sobre protoescólices deshidratados ó fijados con acetona:metanol dieron una señal de baja intensidad y los fijados con paraformaldehído no dieron señal alguna. Los protoescólices fijados con acetona produjeron señales apreciables. Los resultados que se muestran en las figuras se obtuvieron fijando a los parásitos con acetona pura. El MAb B1 dio una señal en "anillos" que pueden atribuirse a la capa externa de los corpúsculos calcáreos (figuras 27 y 28). No todos los corpúsculos calcáreos dieron señal. No se observó señal en tegumento ni ventosas. No se observaron diferencias en la localización de la señal ni en la proporción de corpúsculos calcáreos marcados entre los dos genotipos analizados. El MAb B2/B4, coincidentemente con los ensayos de hibridación *in situ*, mostró señal en la superficie que rodea al protoescólex invaginado. Asimismo se observó señal en la superficie apical del protoescólex

evaginándose, en el escólex del parásito totalmente evaginado, en la región que rodea a las ventosas. También presentó una señal en “anillo” correspondiente a la capa externa de los corpúsculos calcáreos (figuras 29 y 30). Esta última localización no fue observada en los ensayos de hibridación *in situ* debido quizás a diferencias en la sensibilidad de ambas técnicas. Con este monoclonal tampoco se observaron diferencias entre genotipos.

Con ambos anticuerpos monoclonales se observó además una señal puntual refringente diferente a la observada en corpúsculos calcáreos que no pudo asociarse a ninguna estructura del protoescólex (panel D figura 27 y panel A figura 30). Esta señal no se observó en los controles realizados (figura 31 y 32).



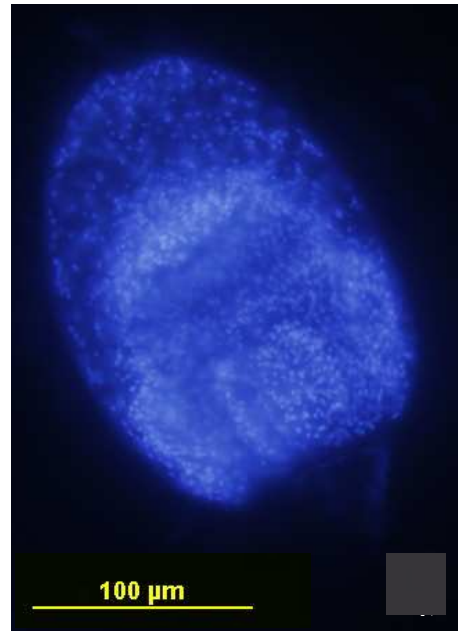
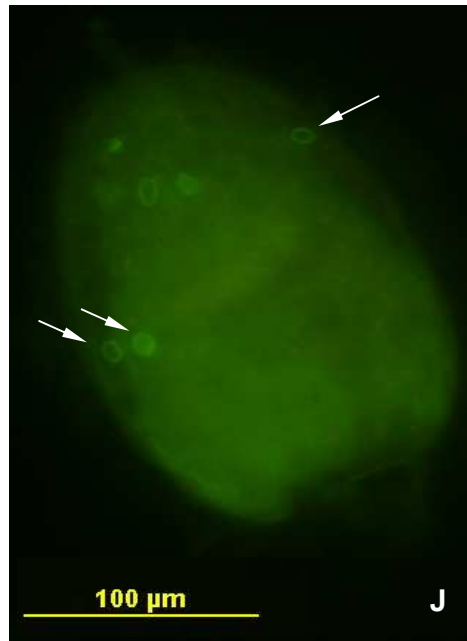
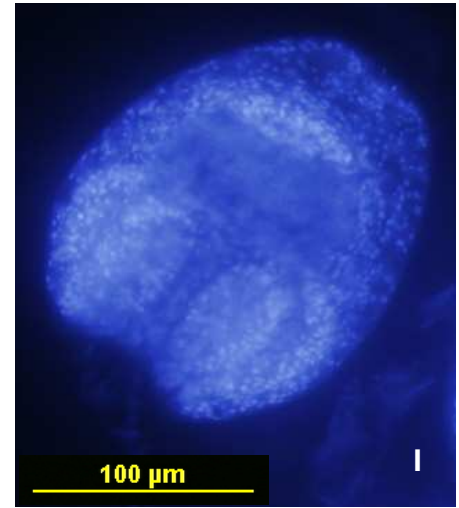
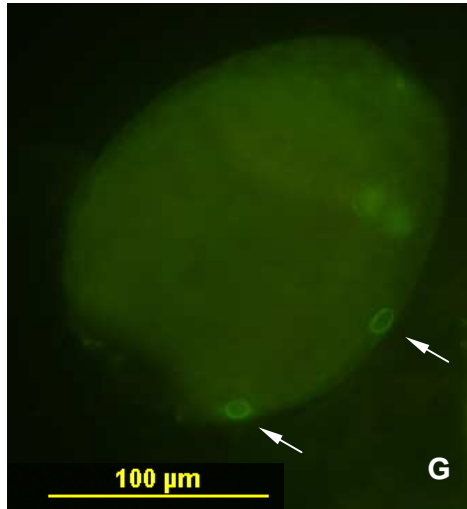


Figura 27. Inmunolocalización del AgB1 en protoescólices de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona e incubados en soluciones conteniendo saponina y el anticuerpo monoclonal MAb B1. La detección se realizó con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Paneles A-D-G-J: se muestra la señal de FICT observada en corpúsculos calcáreos (cc). Paneles B-E-H-K: se señalan algunos de los corpúsculos calcáreos que dieron señal positiva, en panel B se señalan corpúsculos calcáreos (cc), ganchos (g), pedúnculo (p), ventosas (v) y tegumento (t). Paneles C, F, I, L, se muestra tinción de nuclear con DAPI, en panel C se señalan las zonas sin núcleos que corresponden a los corpúsculos calcáreos y los núcleos del territorio celular de las ventosas. Las fotografías se tomaron con un aumento de 400X.

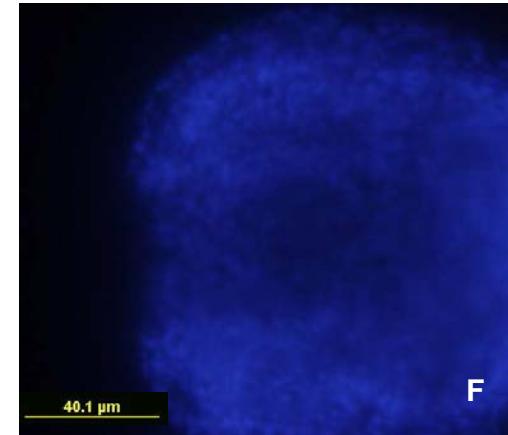
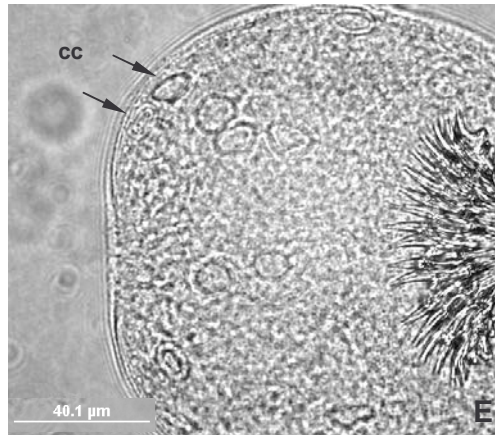
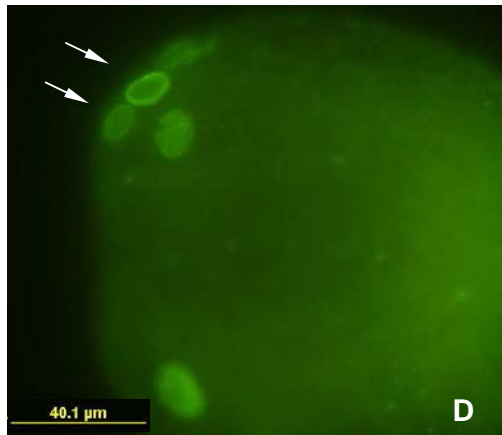
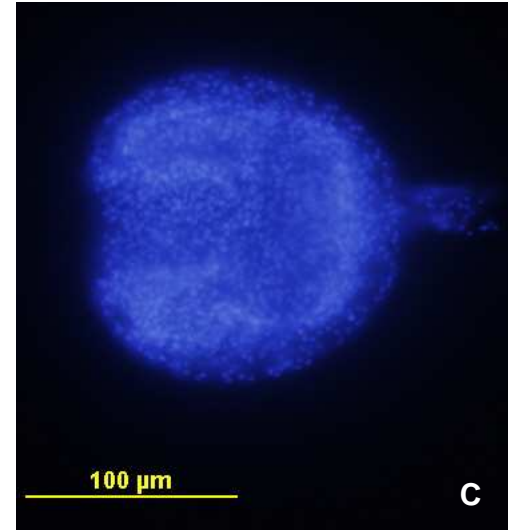
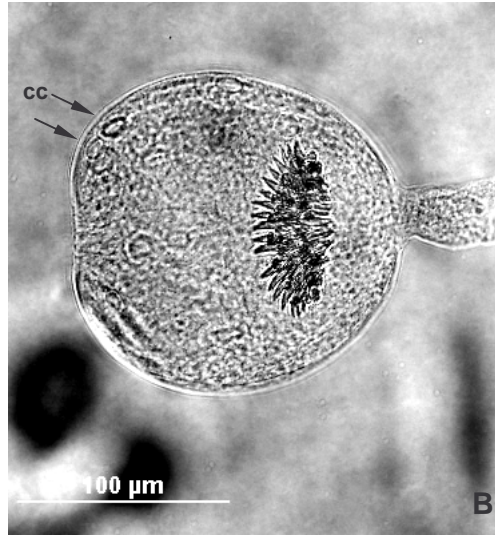
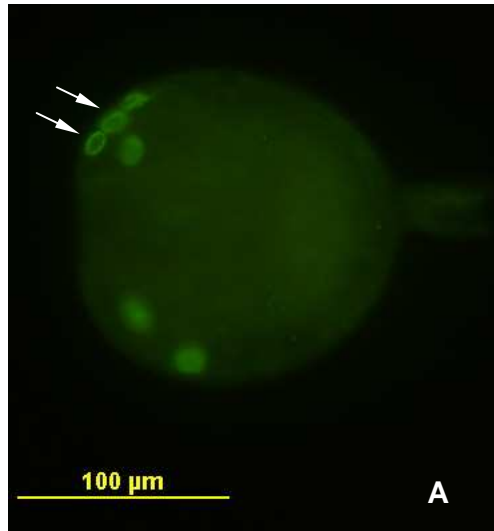
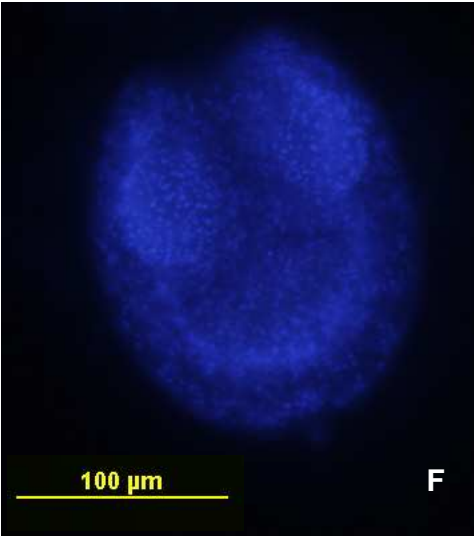
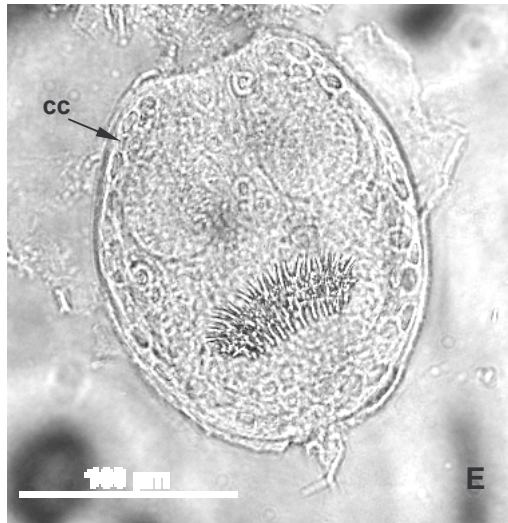
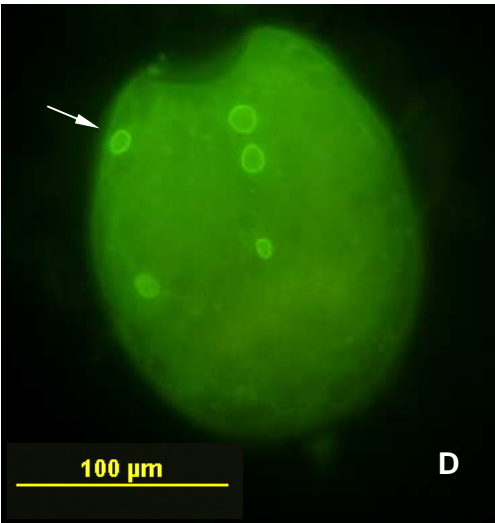
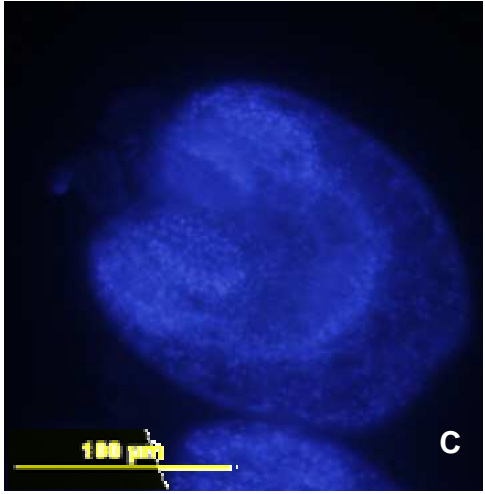
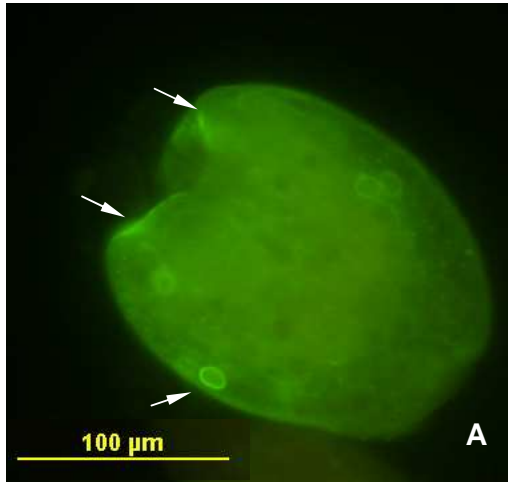


Figura 28. Inmunolocalización del AgB1 en protoescólices de origen porcino genotipo G7. Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona e incubados en soluciones conteniendo saponina y el anticuerpo monoclonal MAb B1. La detección se realizó con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Paneles A-D: se muestra la señal de FICT observada en corpúsculos calcáreos (cc). Paneles B-E: se señalan algunos de los corpúsculos calcáreos que dieron señal positiva. Paneles C, F: se muestra tinción de nuclear con DAPI. Paneles D, E y F detalle (1000 X) de paneles A, B y C (400X).



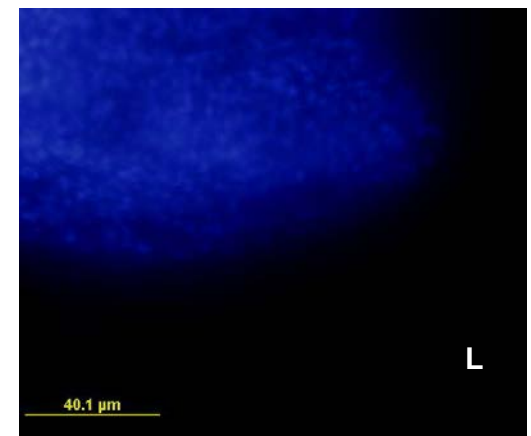
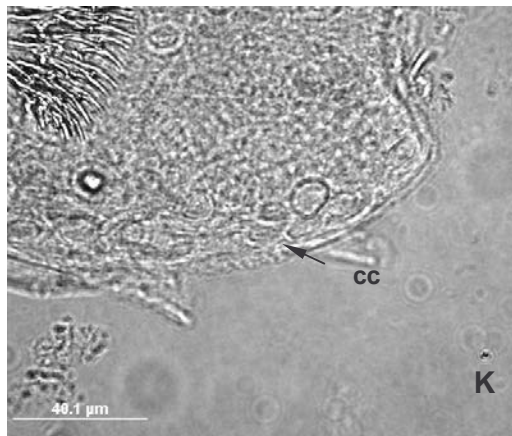
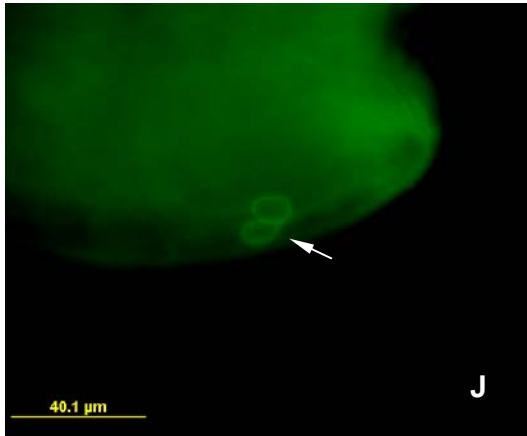
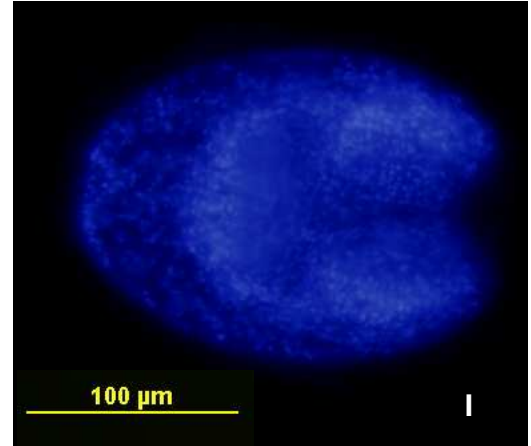
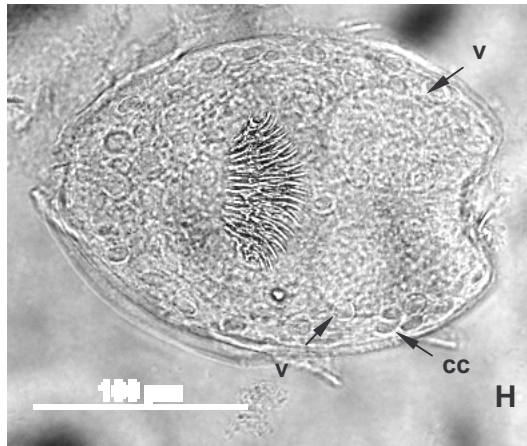
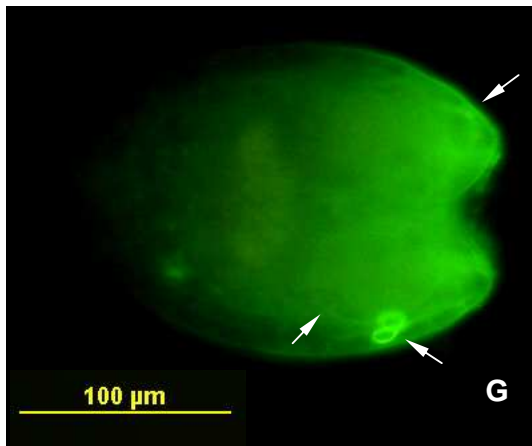
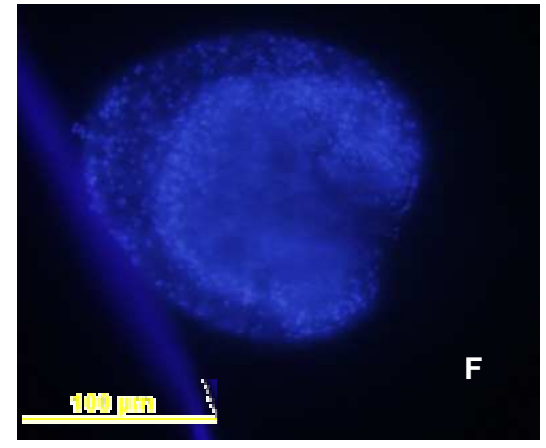
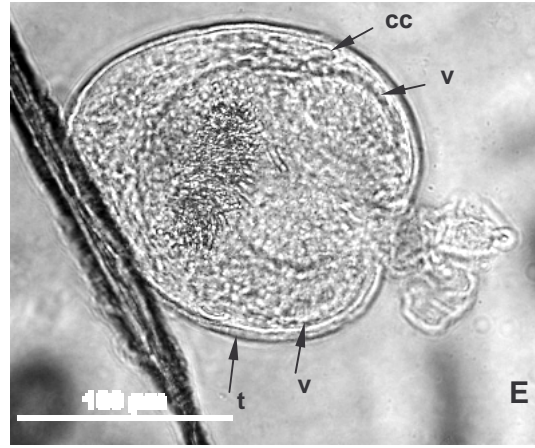
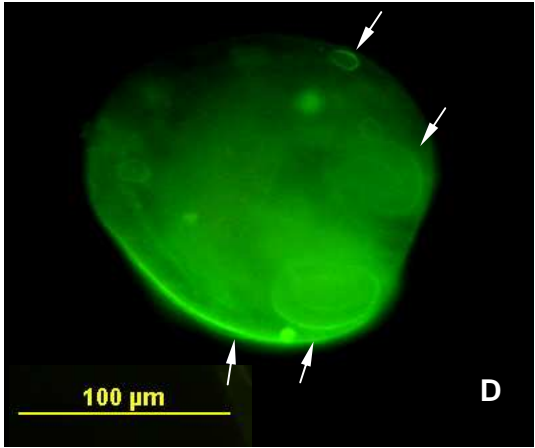
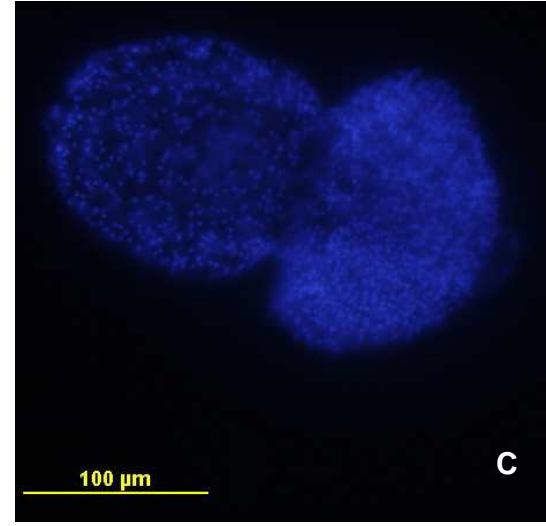
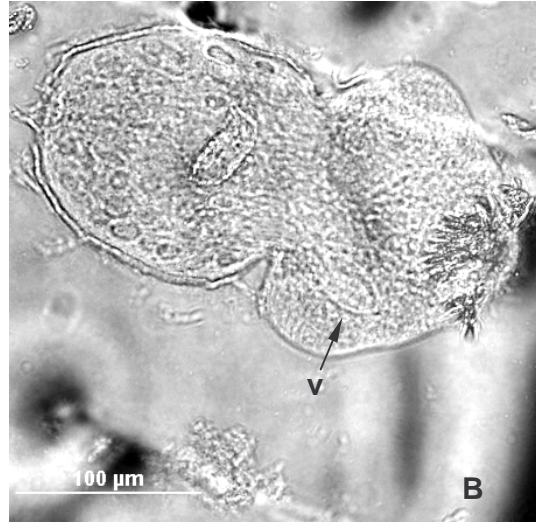
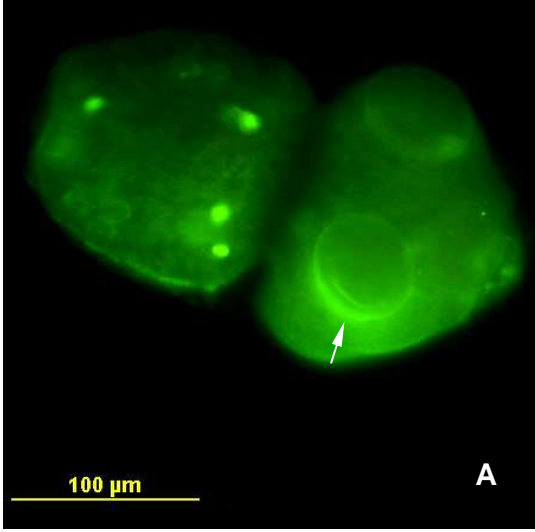


Figura 29. Inmunolocalización del AgB2/B4 en protoescólices de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona e incubados en soluciones conteniendo saponina y el anticuerpo monoclonal MAb B2/B4. La detección se realizó con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Paneles A-D-G-J: se muestra la señal de FICT observada en corpúsculos calcáreos (cc), ventosas (v) y tegumento (t). Paneles B-E-H-K: se señalan algunos de los corpúsculos calcáreos que dieron señal positiva, ventosas y tegumento. Paneles C, F, I, L, se muestra tinción de nuclear con DAPI. Paneles J, K y L detalle (1000 X) de paneles G, H y I (400X).



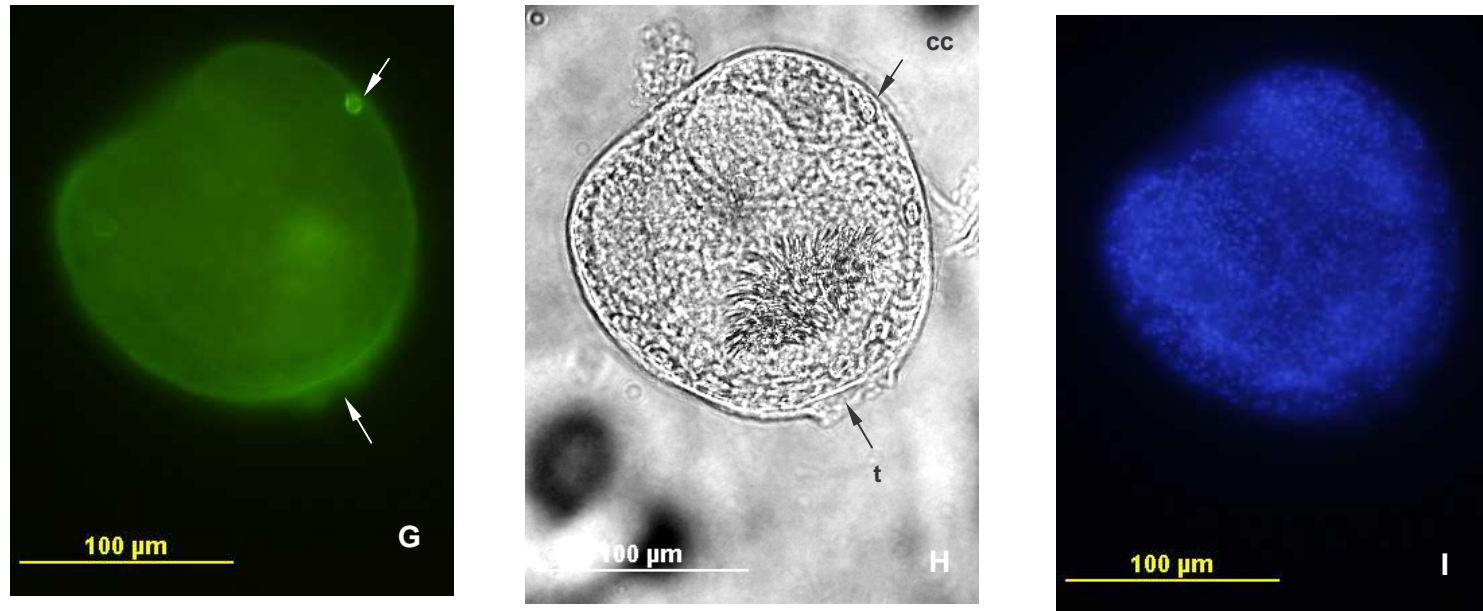


Figura 30. Inmunolocalización del AgB2/B4 en protoescolices de origen porcino genotipo G7. Los protoescolices enteros fueron fijados en acetona e incubados en soluciones conteniendo saponina y el anticuerpo monoclonal MAb B2/B4. La detección se realizó con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Paneles A, D, G: se muestra la señal de FICT observada en corpúsculos calcáreos (cc), ventositas (v) y tegumento (t). Paneles B, E, H: se señalan algunos de los corpúsculos calcáreos que dieron señal positiva, ventositas y tegumento. Paneles C, F, I se muestra tinción de nuclear con DAPI. Paneles A- C protoescolix evaginado, paneles D-I protoescolix invaginados. Aumento 400X

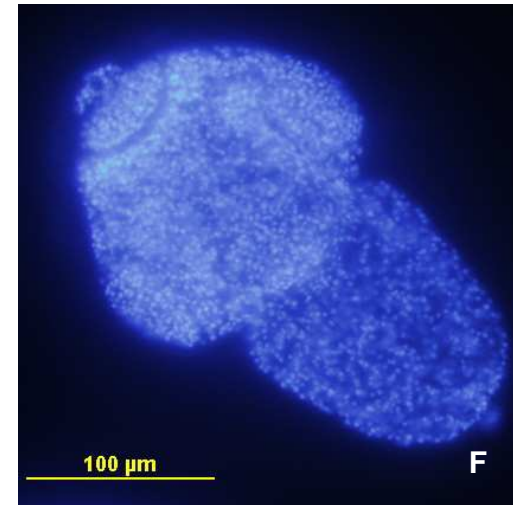
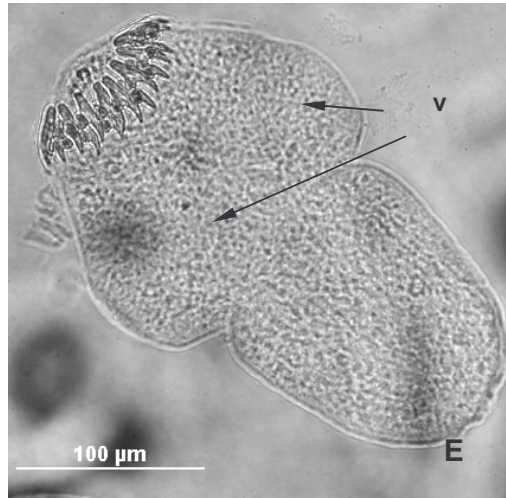
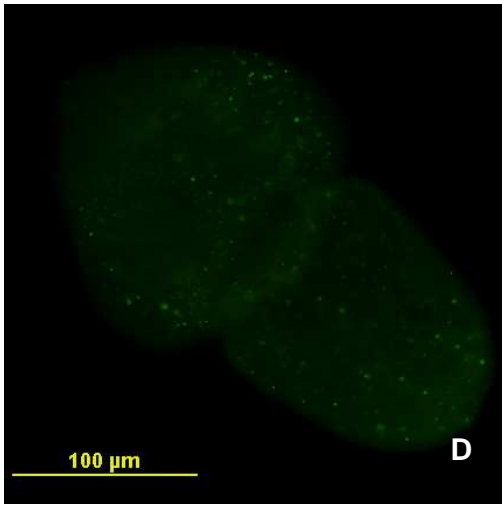
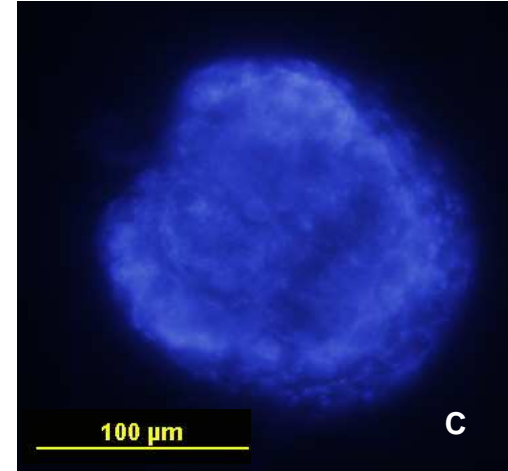
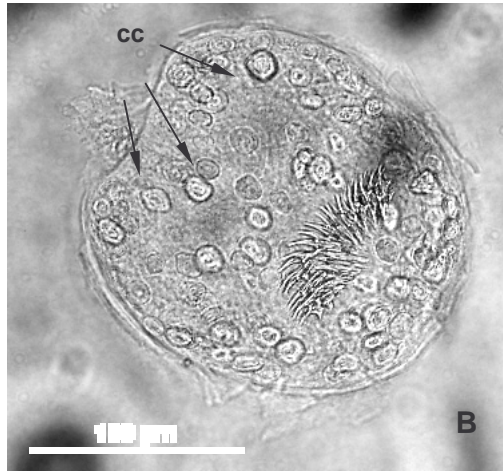
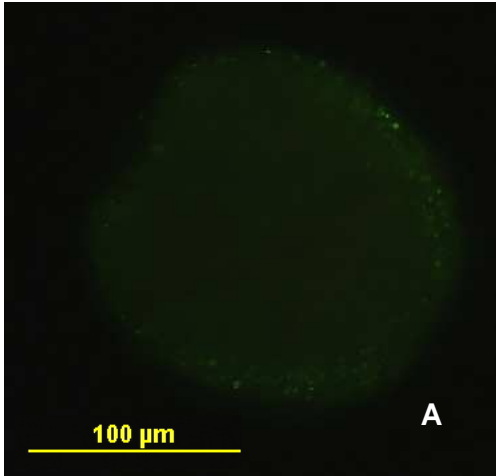


Figura 31. Controles negativos de las inmunolocalizaciones del AgB en protoescólices de origen ovino genotipo G1 (paneles A, B y C); y de origen porcino genotipo G7 (D, E y F). Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona e incubados en soluciones conteniendo saponina y el anticuerpo monoclonal anti cruzipaína de *T. cruzi* proteína no relacionada al AgB. La detección se realizó con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Paneles A-D: se muestra la señal negativa para FICT. Paneles B-E: se señalan los corpúsculos calcáreos y las ventosas que no dieron señal. Paneles C, F se muestra tinción de nuclear con DAPI. Paneles A, B y C protoescólex invaginado, paneles D, E y F protoescólex evaginado. Aumento 400X

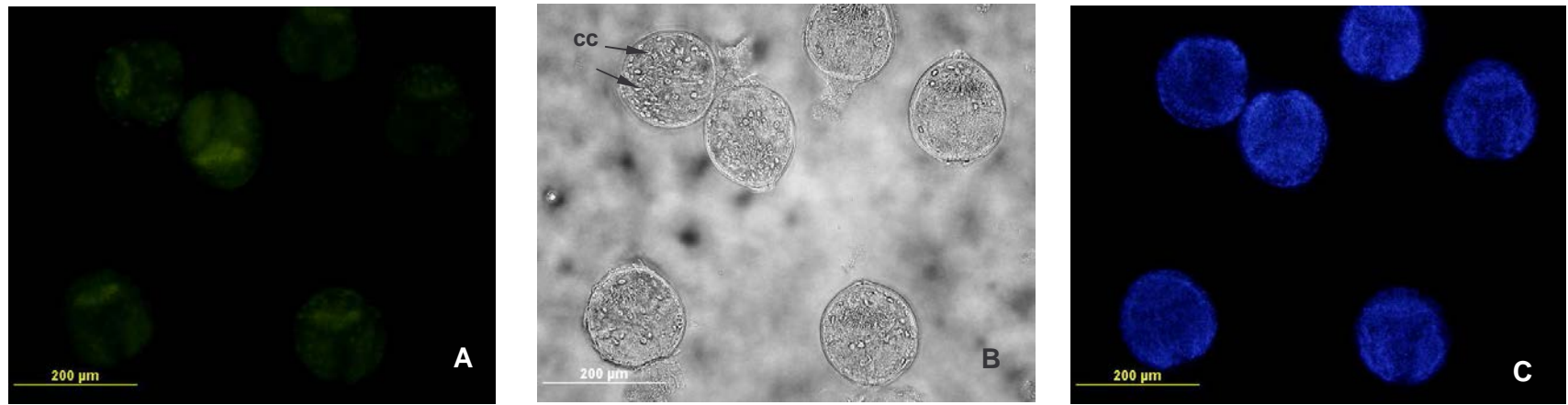


Figura 32. Controles negativos de las inmunolocalizaciones del AgB en protoescólices de origen porcino genotipo G7. Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona. La reacción se realizó únicamente con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Panel A: se muestra la señal negativa para FICT. Panel B: se señalan los corpúsculos calcáreos que no dieron señal. Panel C: se muestra tinción de nuclear con DAPI. Aumento 100X

Para corroborar a localización diferencial de las subunidades del AgB se realizaron co-localizaciones utilizando la información del isotipo de cada MAb utilizado. El MAb B1 de isotipo IgG1 fue detectado con un anticuerpo monoclonal anti IgG1 conjugado a ficoeritrina (rojo) y el MAb B2/B4 de isotipo IgG2a fue detectado con anticuerpo monoclonal anti IgG2a conjugado con FICT (verde) sobre los mismos parásitos. Los resultados mostrados en las figuras 33 y 34 confirman los resultados obtenidos previamente. Las proteínas AgB2 y AgB4 se localizan en corpúsculos calcáreos y tegumento que rodea al parásito, además se pudo observar una intensa señal en tegumento de ventosas y almohadilla rostelar. El AgB1 sólo se localizó en corpúsculos calcáreos. La superposición de imágenes tomadas con filtros para cada uno de los fluorocromos utilizados permitió detectar 4 tipos de corpúsculos calcáreos coexistiendo en un mismo protoescoléx: los que poseen sólo AgB1, los que poseen sólo AgB2/B4, los que contienen todos o los que no contienen ninguno (figura 33 panel C). Se analizaron parásitos de los genotipos G1 y G7 obteniéndose idénticos resultados. Los controles negativos sin anticuerpo primario no dieron señal (figura 35). Asimismo se realizaron controles de la especificidad de los monoclonales anti isotipo realizando incubaciones del MAb B1 con el anticuerpo anti IgG2a y el MAb B2/B4 con el anticuerpos anti IgG1. Como era de esperar en estos controles no se observó señal (datos no mostrados).

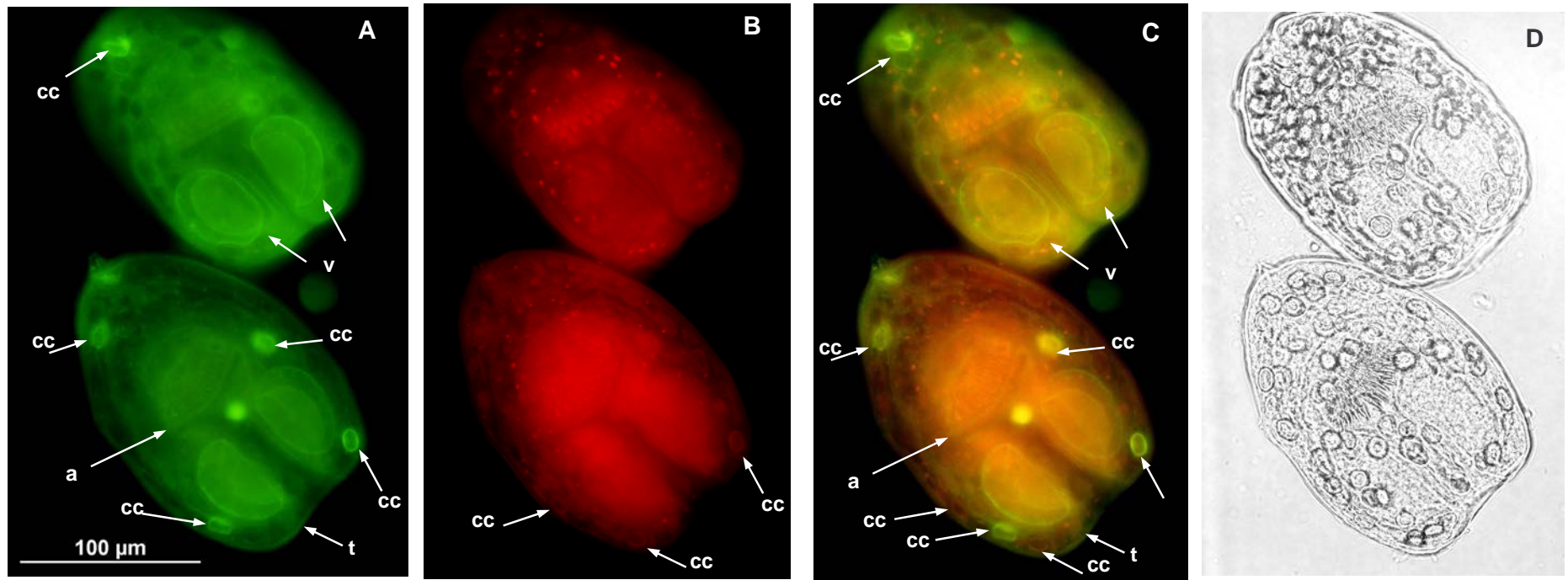


Figura 33. Inmunolocalización del AgB1y AgB2/B4 en protoescólices de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona e incubados en soluciones conteniendo saponina y los anticuerpos monoclonales MAb B1 y MAb B2/B4. Para la detección del AgB2/B4 se utilizó el anticuerpo anti IgG2a de ratón conjugado con FICT (panel A). Para la detección del AgB1 se utilizó el anticuerpo anti IgG1 de ratón conjugado con ficoeritrina (panel B). Panel A: se señalan corpúsculos calcáreos (cc), almohadilla rostral (a), ventosas (v) y tegumento (t) con señal positiva. Panel B: se señalan corpúsculos calcáreos (cc) con señal positiva. Panel C: superposición de paneles A y B. Panel D: luz visible. Las fotografías se tomaron con aumento de 400X.

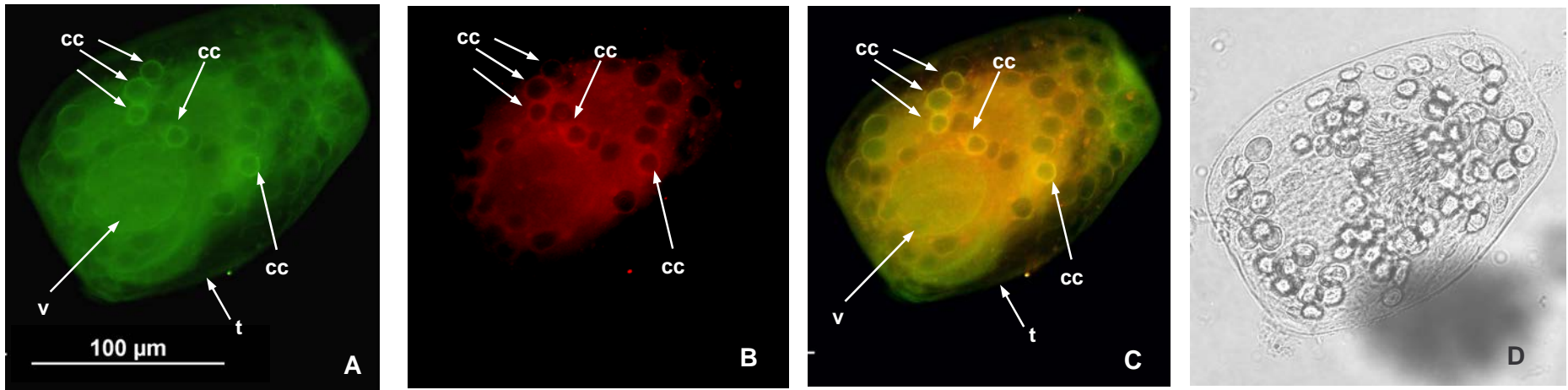


Figura 34. Inmunolocalización del AgB1y AgB2/B4 en protoescólices de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona e incubados en soluciones conteniendo saponina y los anticuerpos monoclonales MAb B1 y MAb B2/B4. Para la detección del AgB2/B4 se utilizó el anticuerpo anti IgG2a de ratón conjugado con FICT (panel A). Para la detección del AgB1 se utilizó el anticuerpo anti IgG1 de ratón conjugado con ficoeritrina (panel B). Panel A: se señalan algunos de los corpúsculos calcáreos (cc), ventosa (v) y tegumento (t) con señal positiva. Panel B: se señalan algunos corpúsculos calcáreos (cc) con señal positiva. Panel C: superposición de paneles A y B. Panel D: luz visible. Las fotografías se tomaron con aumento de 400X.

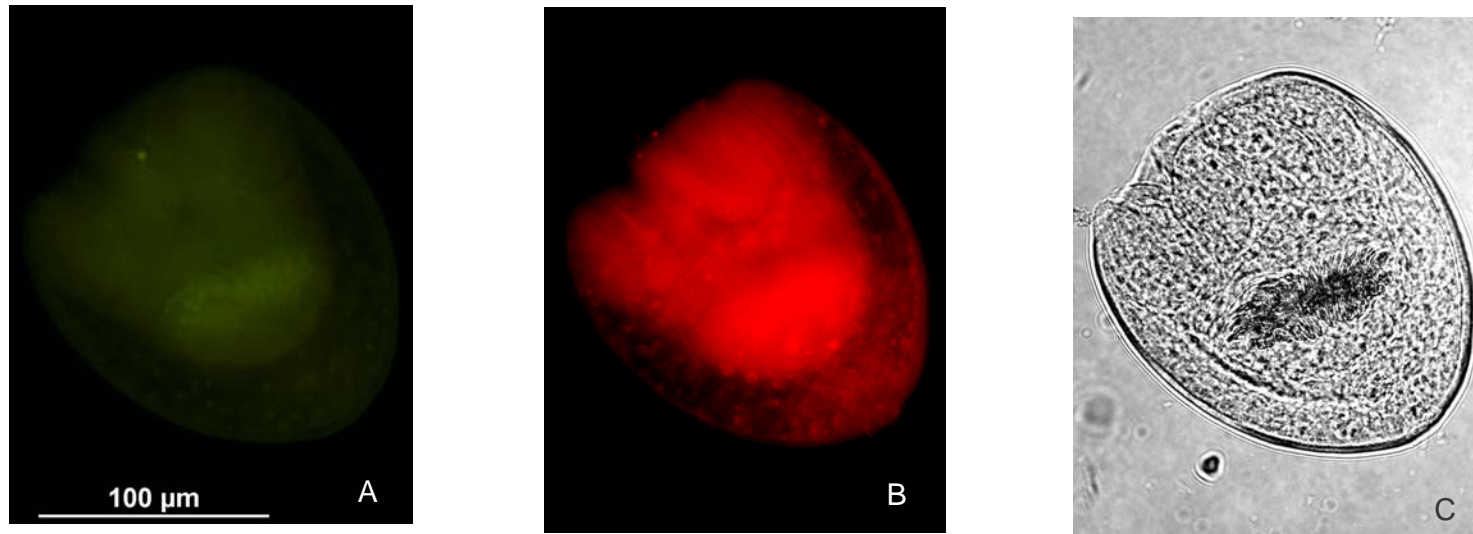
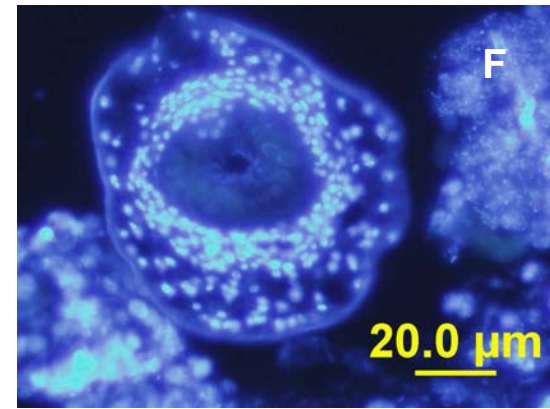
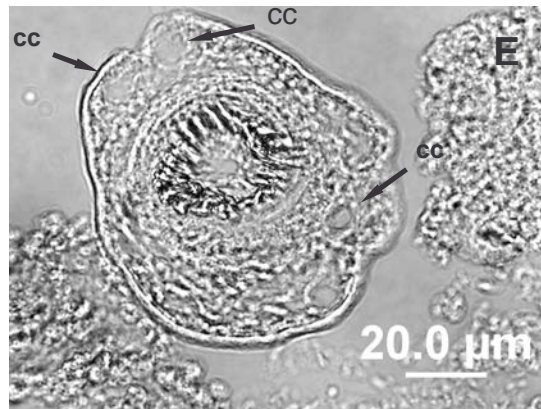
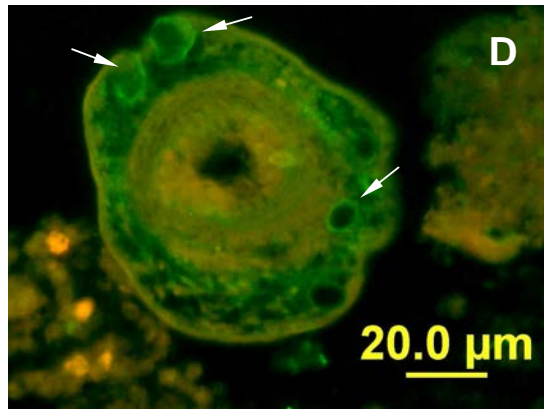
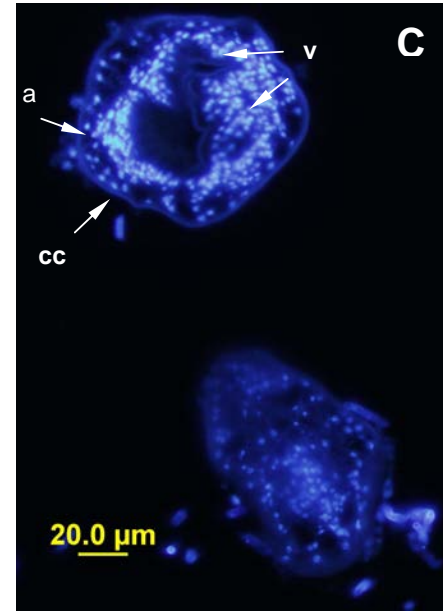
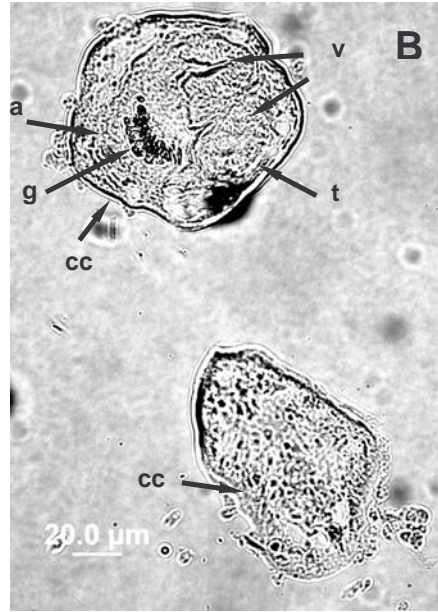
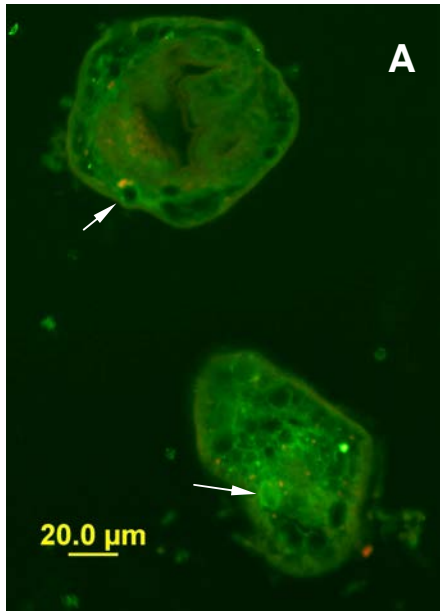


Figura 35. Controles negativos de las co-localizaciones del AgB en protoescólices de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices enteros fueron fijados en acetona. La reacción se realizó sin anticuerpo primario en presencia de los anticuerpos secundarios anti IgG1-ficoeritrina y anti IgG2a-FICT. Panel A: se muestra la señal negativa para FICT. Panel B: señal negativa para ficoeritrina. Panel C: luz visible. Aumento 400X

Asimismo se realizaron cortes de protoescolices y se evaluaron con los anticuerpos monoclonales. La señal obtenida con el MAb B1 fue idéntica a la observada en los experimentos *in toto* observándose una señal en anillo alrededor de algunos corpúsculos calcáreos (figura 36). La señal observada con el MAb B2/B4 también coincidió con la observada con parásitos enteros (figura 37). Se observan los anillos alrededor de algunos corpúsculos calcáreos y señal alrededor de toda la superficie del parásito y ventosas. La señal parece localizarse en una capa muy fina por debajo del tegumento del cuerpo del parásito, ventosas y almohadilla rostelar. Además se observa marca en fibras radiales de las ventosas y almohadilla rostelar. Los controles negativos (figura 38) sólo mostraron la autofluorescencia propia de este tipo de parásitos (Kassis & Tanner, 1977).



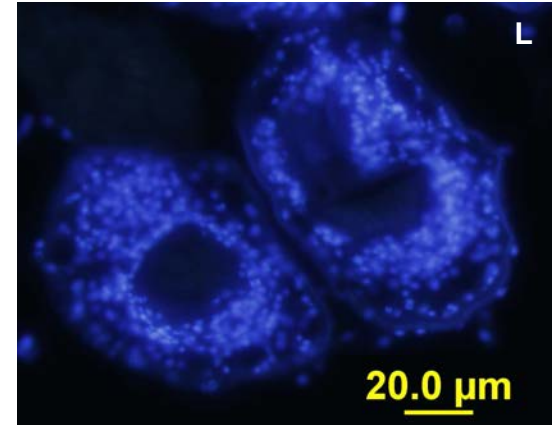
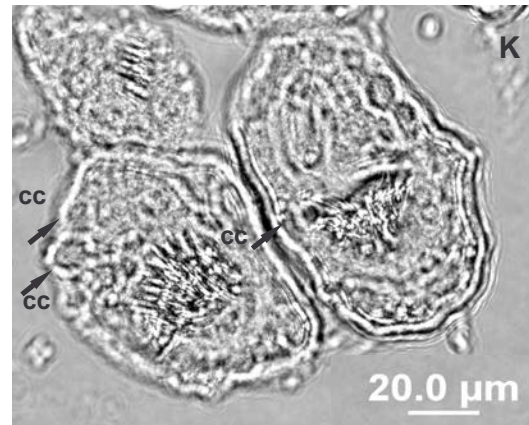
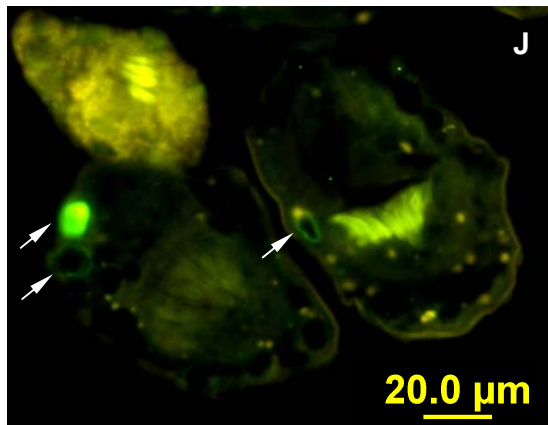
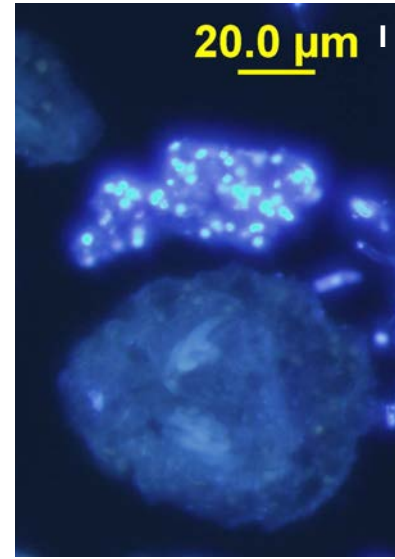
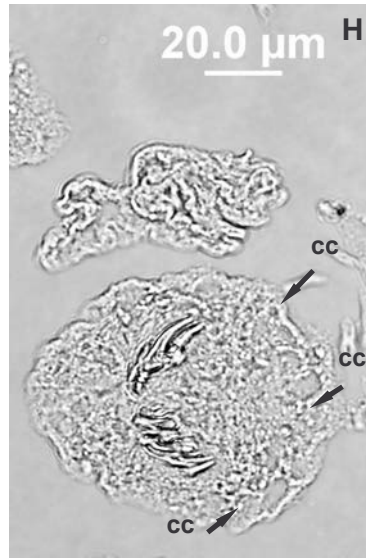
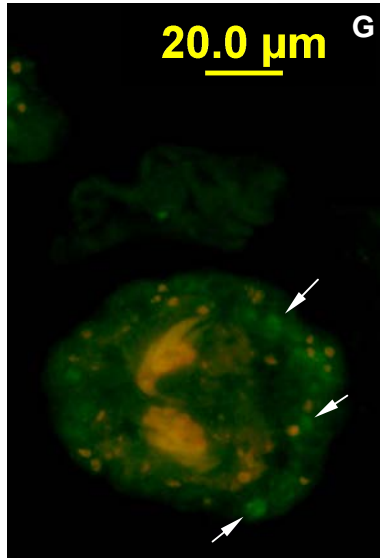
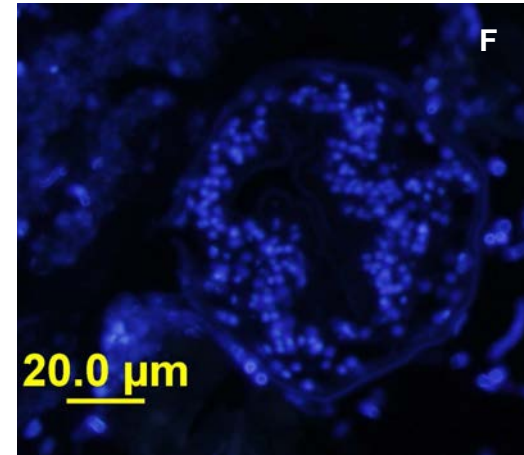
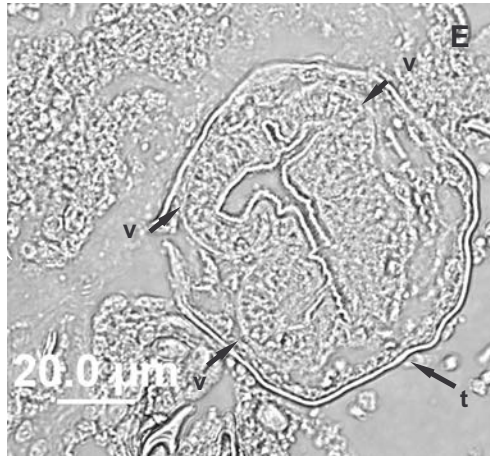
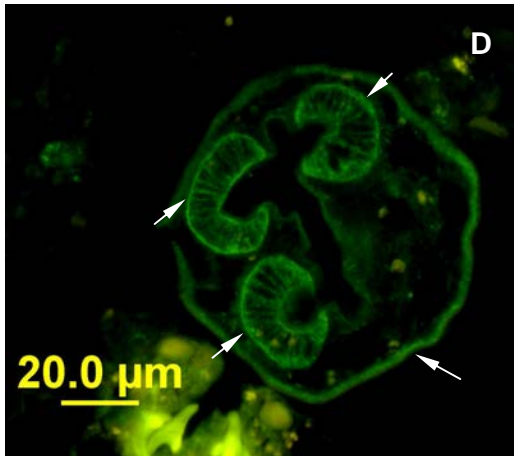
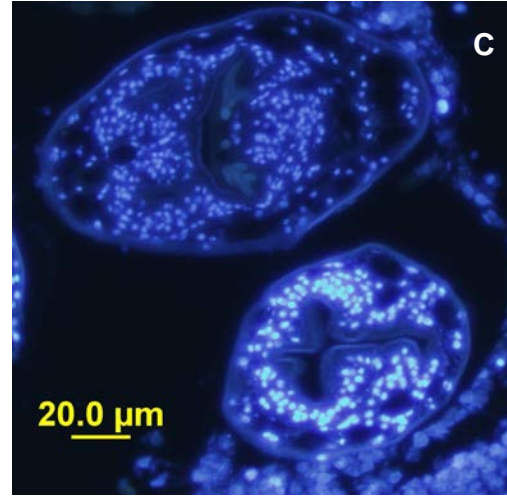
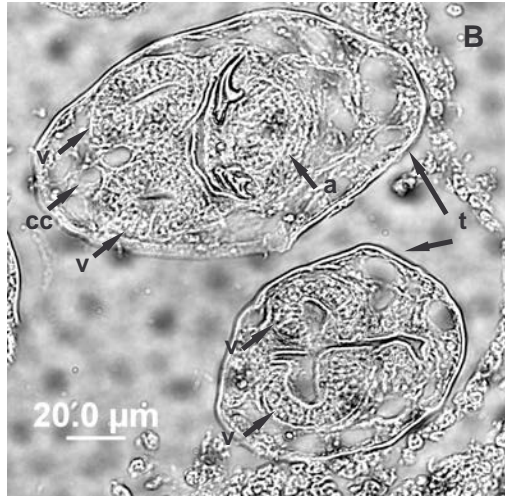
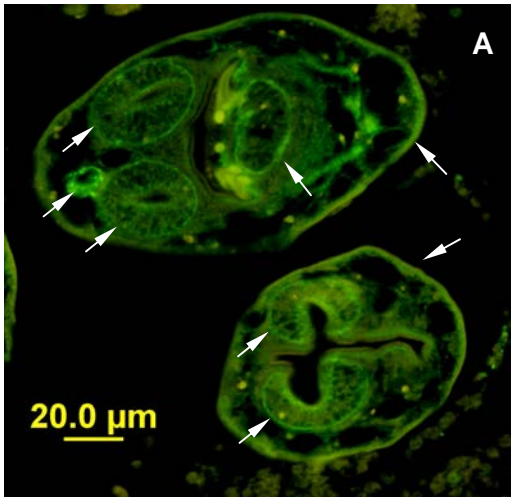
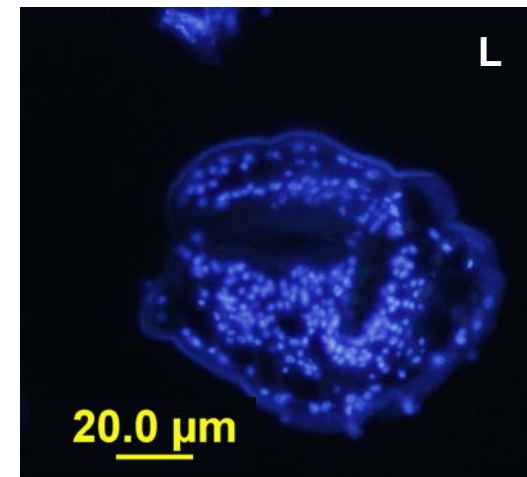
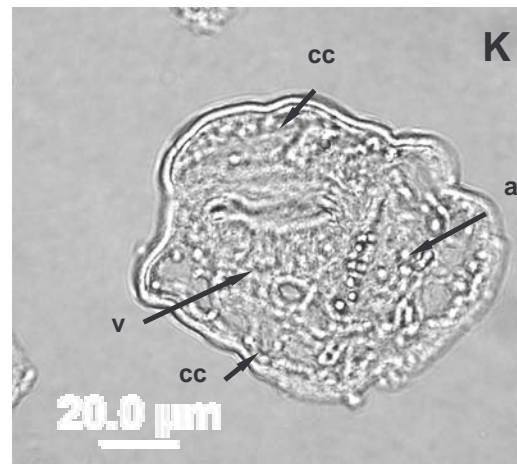
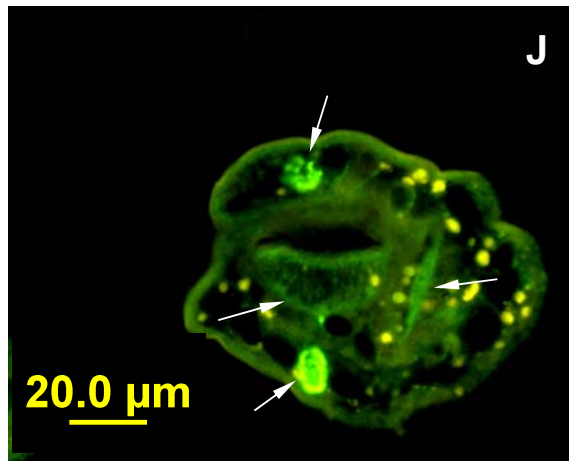
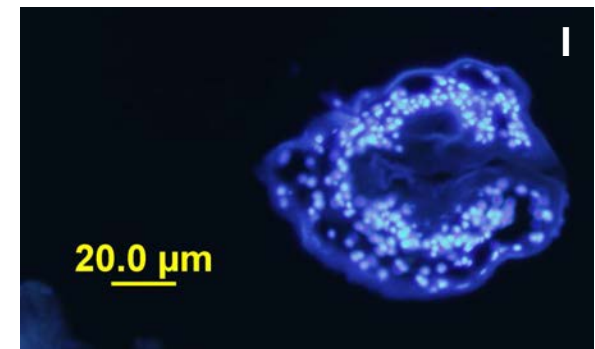
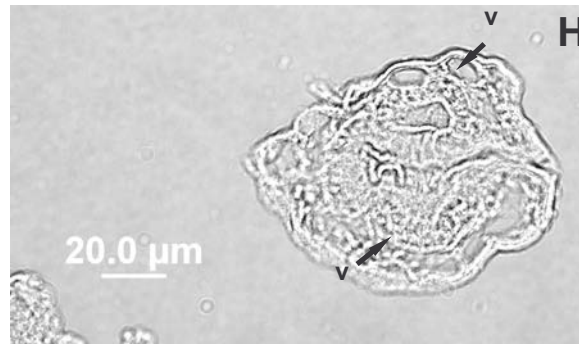
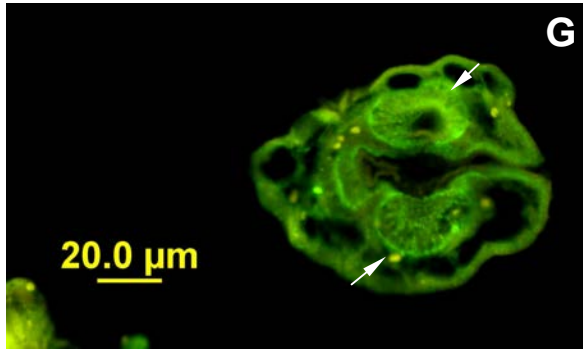


Figura 36. Inmunolocalización del AgB1 en protoescólices de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices fueron fijados en acetona antes de la inclusión en parafina. La incubación con el anticuerpo monoclonal MAb B1 se realizó durante 2 horas (paneles A-F) o 24 horas (paneles G-L). La detección se realizó con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Paneles: A, D, G, J: se muestra la señal de FICT observada en corpúsculos calcáreos (cc). Paneles B, E, H, K : se señalan algunos de los corpúsculos calcáreos que dieron señal positiva, en panel B se señalan corpúsculos calcáreos (cc), ganchos (g), almohadilla rostral (a), ventosas (v) y tegumento (t). Paneles C, F, I, L: se muestra tinción de nuclear con DAPI, en panel C se señalan las zonas sin núcleos que corresponden a los corpúsculos calcáreos y los núcleos de los territorios celulares de la almohadilla rostral y las ventosas. Las fotografías se tomaron con un aumento de 400X.





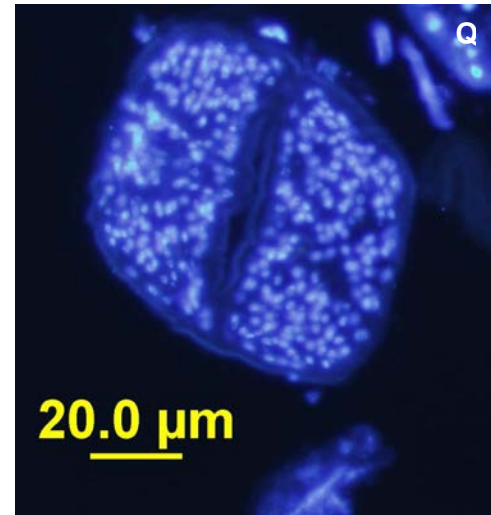
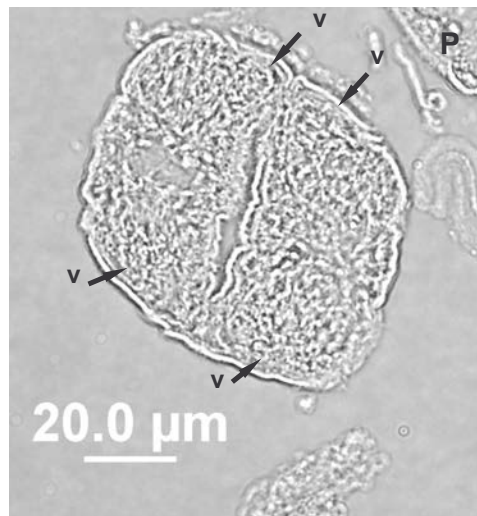
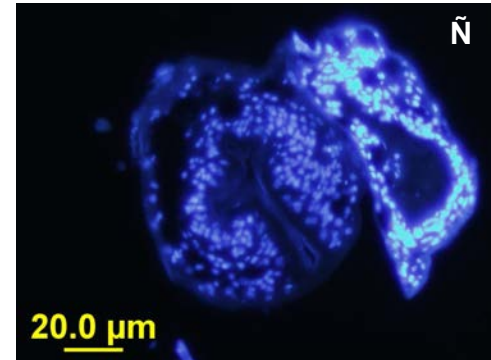
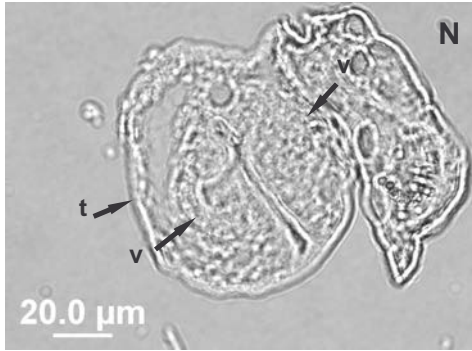
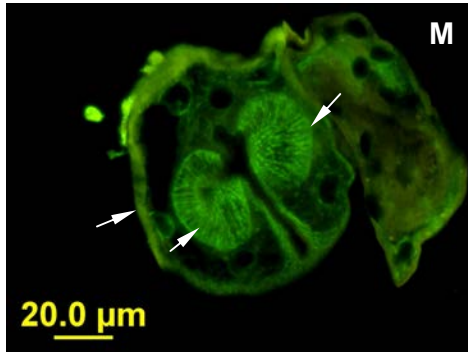


Figura 37. Inmunolocalización del AgB2/B4 en protoescólices de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices fueron fijados en acetona antes de la inclusión en parafina. La incubación con el anticuerpo monoclonal MAb B2/B4 se realizó durante 2 horas (paneles A-C) o 24 horas (paneles D-R). La detección se realizó con anticuerpo anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Paneles : A, D, G, J, M, O: se muestra la señal de FICT observada en corpúsculos calcáreos (cc), ventosas (v), almohadilla rostelar (a) y tegumento. Paneles B, E, H, K, N, P: se señalan las estructuras que dieron señal positiva. Paneles C, F, I, L, Ñ, Q: se muestra tinción de nuclear con DAPI. Las fotografías se tomaron con un aumento de 400X.

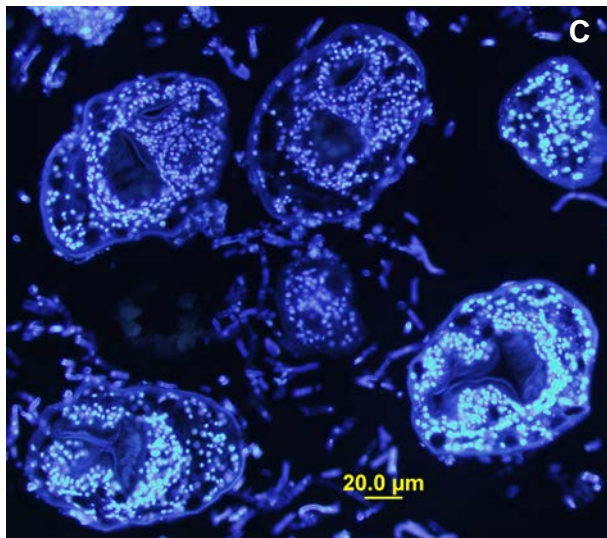
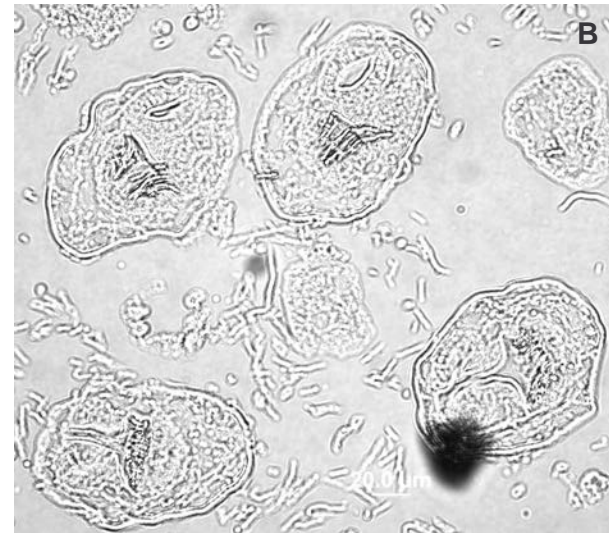
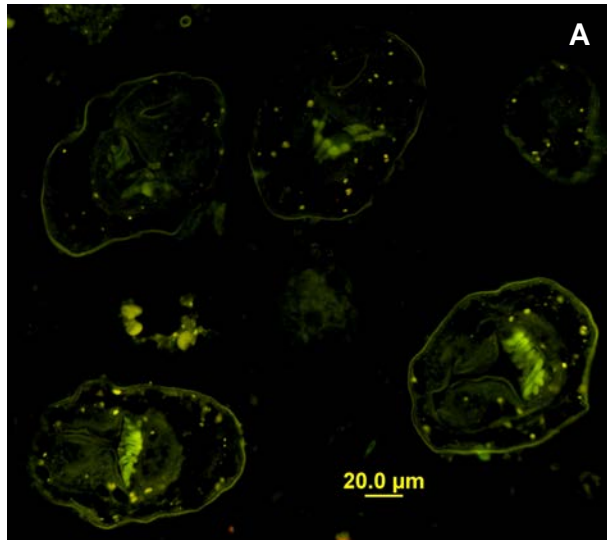


Figura 38. Controles negativos de las inmunolocalizaciones del AgB en protoescólices de de origen ovino genotipo G1. Los protoescólices fueron fijados en acetona antes de la inclusión en parafina. La incubación con el anticuerpo monoclonal anti cruzipaña de *T. cruzi* proteína no relacionada al AgB se realizó durante 24 horas y se reveló con anti IgG total de ratón conjugado con FICT. Panel A: se muestra la señal negativa para FICT. Panel B: luz visible. Panel C se muestra tinción nuclear con DAPI. Las fotografías se tomaron con un aumento de 200X.

Los antígenos AgB1 y AgB2/B4 parecen tener una localización en común en corpúsculos calcáreos. Sin embargo sólo los antígenos AgB2/B4 parecen localizarse en tegumento de protoescólices. No se observaron variaciones en la localización de estos antígenos entre genotipos.

3.3. Objetivo 3) Analizar la expresión del antígeno B en los estadios adulto y oncosfera del parásito.

3.3.1. Análisis de expresión por RT-PCR gen específica

Para determinar de manera sensible y específica el tipo de subunidad presente en los diferentes estadios del ciclo de vida de *E. granulosus* se realizaron RT-PCRs empleando los *primers* gen específicos descritos en el ítem 3.1.6.3. Se utilizó ARN de oncosferas, adultos inmaduros y adultos maduros de *E. granulosus* de genotipo G1. A efectos comparativos se analizó también ARN de protoescólices del genotipo G1. Se amplificó el gen de actina de *E. granulosus* como control de calidad y cantidad del ADN copia obtenido (figura 39).

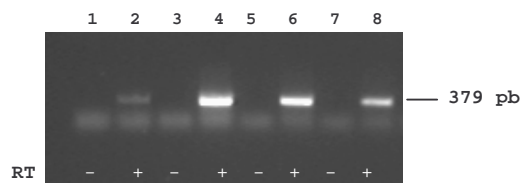


Figura 39. RT-PCR del gen de actina de *E. granulosus*. Las reacciones de retrotranscripción realizadas con 2µg de ARN total de los diferentes estadios fueron sometidas a PCR con *primers* específicos para el gen de actina. Calle 1 y 2, oncosferas, calles 3 y 4 adultos inmaduros, calles 5 y 6 adultos maduros, calles 7 y 8 protoescólices genotipo G1. RT - y + indica la ausencia o presencia de enzima retrotranscriptasa en la reacción de retrotranscripción del ARN respectivamente.

Como puede observarse la intensidad del producto de amplificación del gen de actina fue menor en oncosferas. Esto puede deberse a una degradación parcial del ARN utilizado, probablemente debido a largos tiempos de almacenamiento del material utilizado. Debido a que el material de oncosferas es difícil de obtener, ya que se requieren laboratorios de bioseguridad de tipo III (BSL3) para su manipulación, y no contando con otro material disponible se decidió realizar PCRs gen específicas con cantidades de ADN copia que resulten en niveles de amplificación de actina similares para los diferentes estadios, lo que implicó diluir el ADN copia de los estadio adulto y protoescólices (figura 40).

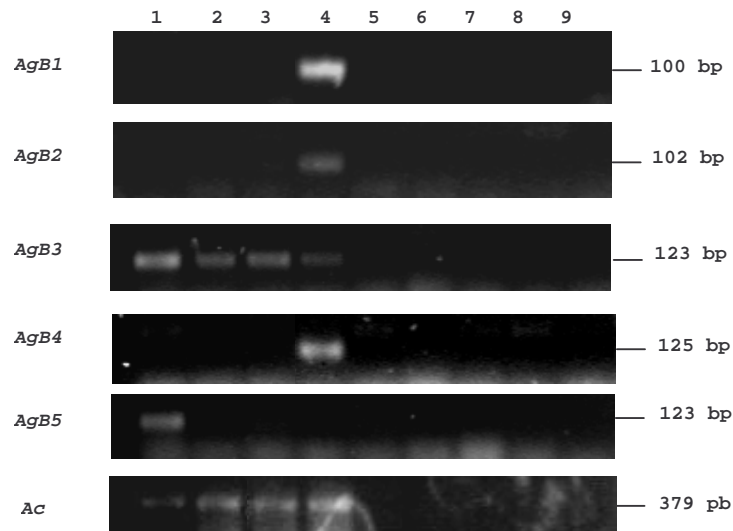


Figura 40. Expresión estadio específica del AgB de *E. granulosus*. ARN total de los estadios oncosfera, adulto inmaduro, adulto maduro y protoescólex fueron sometidas a RT-PCR utilizando *primers* gen AgB- específicos. La cantidad de ADN copia utilizada de cada estadio se determinó en función de la intensidad de amplificación del gen de actina. De arriba hacia abajo: productos de amplificación obtenidos con los *primers* específicos para *AgB1*, *AgB2*, *AgB3*, *AgB4*, *AgB5* y *actina* (*Ac*). Calles 1 y 5, oncosferas; calle 2 y 6, adultos inmaduros; calle 3 y 7, adultos maduros; calle 4 y 8, protoescólices genotipo G1. Calles 1-4 RT-PCR gen específico; calles 5-8 igual que 1-5 pero el ARN no fue retrotranscrito. Calle 9 control negativo de PCR sin el agregado de ADN molde.

Puede observarse que con baja cantidad de ADN copia inicial los genes de AgB se amplifican de manera diferencial. Los *AgB1* y *AgB4* se encontraron sólo en protoescólices, el *AgB2* en protoescólices, el *AgB3* en todos los estadios analizados y el *AgB5* sólo en oncosferas. Para corroborar los resultados obtenidos se repitieron los ensayos de RT-PCR gen específicos, con cantidades de ADN copia mayores que las utilizadas previamente sobre los estadios en los que había material disponible (adultos inmaduros y maduros y protoescólices) (figura 41).

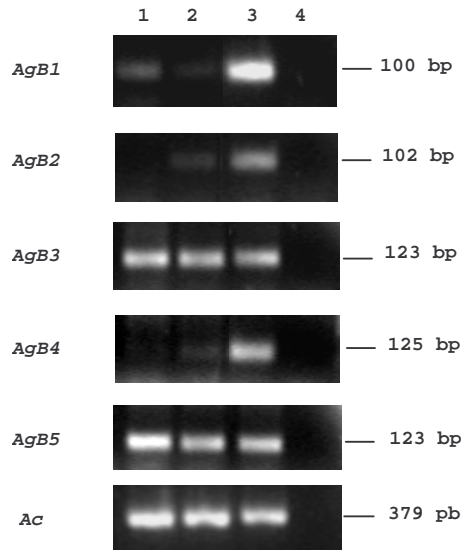


Figura 41. Expresión estadio específica del AgB de *E. granulosus*. ARN total de los estadios adulto inmaduro, adulto maduro y protoescoléx fueron sometidas a RT-PCR utilizando *primers* gen AgB- específicos. La cantidad de ADN copia inicial fue de 20 (protoescoléx G1), 300 (adultos) veces más que la empleada anteriormente. De arriba hacia abajo: productos de amplificación obtenidos con los *primers* específicos para *AgB1*, *AgB2*, *AgB3*, *AgB4*, *AgB5* y *actina* (*Ac*). Calle 1, adultos inmaduros; calle 2, adultos maduros; calle 3, protoescoléx genotipo G1; calle 4, control de PCR sin el agregado de ADN como molde. Los productos de amplificación del AgB obtenidos fueron purificados y secuenciados.

Puede observarse que el transcripto de *AgB1*, se encuentran en baja proporción en adultos de *E. granulosus*. Asimismo, los transcriptos *AgB2* y *AgB4* no pudieron amplificarse a partir de adultos inmaduros y dieron una baja señal en adultos maduros lo que indicaría un bajo nivel de expresión. El *AgB3* y *AgB5* se detectaron en todos los estadios analizados pero con niveles de expresión diferentes, mientras que el *AgB3* parece de expresión constitutiva, el *AgB5* se encuentra en mayor proporción en oncosferas que en adultos o protoescoléx (figuras 40 y 41). Los ensayos de RT-PCR fueron repetidos con mayor cantidad de ADN copia de los estadios adulto inmaduro y maduro para aquellos genes donde no se observó producto amplificado. Los resultados obtenidos fueron idénticos a los que se muestran en la figura 41 (datos no mostrados).

3.3.2. Análisis de expresión por inmunoblot

Se realizaron inmunoblots con proteínas totales de LH de genotipos G1 y G7 y proteínas de oncosferas y adultos de genotipo G1. Se utilizó el monoclonal EB7 (González-Sapienza & Cachau, 2003) gentilmente cedido por el Dr. Gualberto González de la Universidad de la República, Montevideo; este monoclonal reconoce el epítipo EVKYFFER presente en el AgB1 y el MAb B2/B4 descrito en el ítem 3.2.3. La técnica empleada sólo permitió detectar al AgB en LH (figura 42).

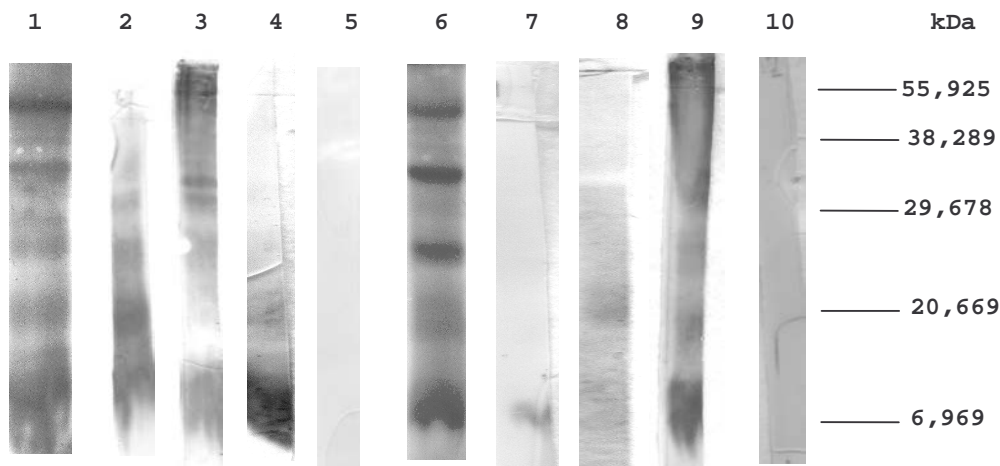


Figura 42. Inmunoblot de AgB en LH. Se sembraron 10 μ g de proteínas de LH y se incubaron con anticuerpos diluidos 1/200. LH ovino genotipo G1 (calles 1-5), proteínas del LH teñidas con *Coomassie blue* (calle 1), MAb EB7 (calle 2), MAb B2/B4 (calle 3), suero estándar anti-*Echinococcus* (NIBSC) (calle 4), MAb anti Cruzipaína de *T. cruzi* (control negativo) (calle 5). LH porcino genotipo G7 (calles 6-10), proteínas del LH teñidas con *Coomassie blue* (calle 6), MAb EB7 (calle 7), MAb B2/B4 (calle 8), suero estándar anti-*Echinococcus* (NIBSC) (calle 9), MAb anti Cruzipaína de *T. cruzi* (control negativo) (calle 10). El antisuero utilizado fue anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa 1/1000 y revelado con DAB.

Las oncosferas y adultos no dieron señal de AgB con diluciones de monoclonales 1/200 ni 1/20 (datos no mostrados). La baja sensibilidad observada en el método de inmunoblot empleado llevó a la puesta a punto de técnicas de inmunoblots más sensibles. Para ello se utilizaron reactivos comerciales que involucran quimioluminiscencia como método de detección de anticuerpos y por lo tanto aumentan la sensibilidad. Como primer paso se determinó la especificidad de los monoclonales utilizados con esta nueva técnica (figuras 43 y 44).

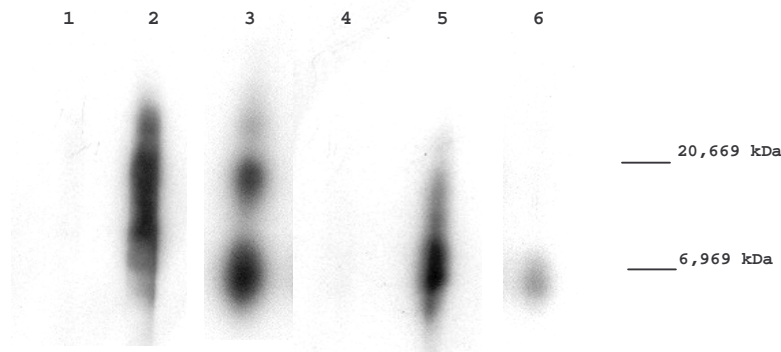


Figura 43. Especificidad del anticuerpo monoclonal anti AgB2/B4. Inmunoblot realizado con las proteínas rAgB1 (calles 1 y 4); rAgB2 (calles 2 y 5) y rAgB4 (calles 3 y 6). Se sembró 1 µg de proteína recombinante por calle. Calles 1- 3: MAb B2/B4 dilución 1/500; calles 4-6: MAb B2/B4 dilución 1/5000. Revelado con anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa 1/10000 y quimioluminiscencia (kit ECL plus, GE).

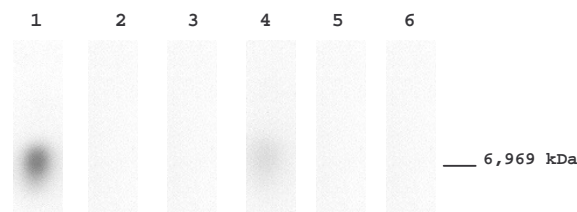


Figura 44. Especificidad del anticuerpo monoclonal anti AgB1 (EB7). Inmunoblot realizado con las proteínas rAgB1 (calles 1 y 4); rAgB2 (calles 2 y 5), rAgB4 (calles 3 y 6). Se sembró 1 µg de proteína recombinante por calle. Calles 1-3: MAb EB7 1/150; calles 4-6: MAb EB7 1/500. La detección se realizó con anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa 1/10000 y quimioluminiscencia (kit ECL plus, GE).

El MAb B2/B4 reconoció al monómero y dímero del rAgB2 y en menor medida a la proteína rAgB4. El MAb EB7 demostró ser específico rAgB1 no reconociendo al rAgB2 ni al rAgB4.

Primeramente se realizaron inmunoblots con proteínas provenientes de LH de los genotipos G1 y G7 (figura 45). El MAb EB7 reconoce intensamente al AgB en LH porcino genotipo G7 detectándose bandas de alto peso molecular que podrían corresponder al tetrámero y pentámero del AgB. Sin embargo el mismo anticuerpo monoclonal presenta bandas de menor intensidad en LH ovino genotipo G1 detectándose sólo monómero, dímero y trímero del AgB. La inversa se observa con el MAb B2/B4 que es reconocido con mayor intensidad por el LH del genotipo G1. Esto último correlaciona con lo observado en los ensayos de SSCP-RT-PCR y RT-PCR gen específico, donde el AgB2 se encuentra principalmente expresado en el genotipo G1. Habría que obtener MAbs específicos anti AgB2 o anti AgB4 para determinar certeramente la señal observada en el genotipo G7 pero es posible que provenga del reconocimiento por parte del MAb B2/B4 hacia la subunidad AgB4.

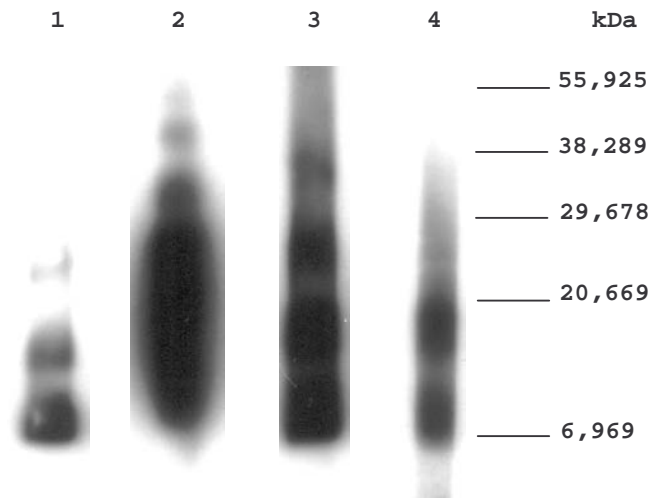


Figura 45. Inmunoblot del AgB en LH. Se sembraron 10 µg de proteínas de LH y se incubaron con anticuerpos diluidos 1/500. LH ovino genotipos G1 (calles 1 y 3); LH porcino genotipo G7 (calles 2 y 4). Calles 1 y 2, MAb anti B1 (EB7); calles 3 y 4, MAb anti B2/B4. La detección se realizó con anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa 1/10000 mediante quimioluminiscencia (kit ECL plus, GE).

Los inmunoblots realizados con adultos y oncosferas se muestran en la figura 46. Si bien la señal es menos intensa que la obtenida con LH puede observarse que el AgB se expresa en oncosferas y adultos presentando un patrón escalonado similar al que se observa en LH. Con el MAb B2/B4 se detectó una menor intensidad de bandas en adultos que en oncosferas ó protoescólicas.

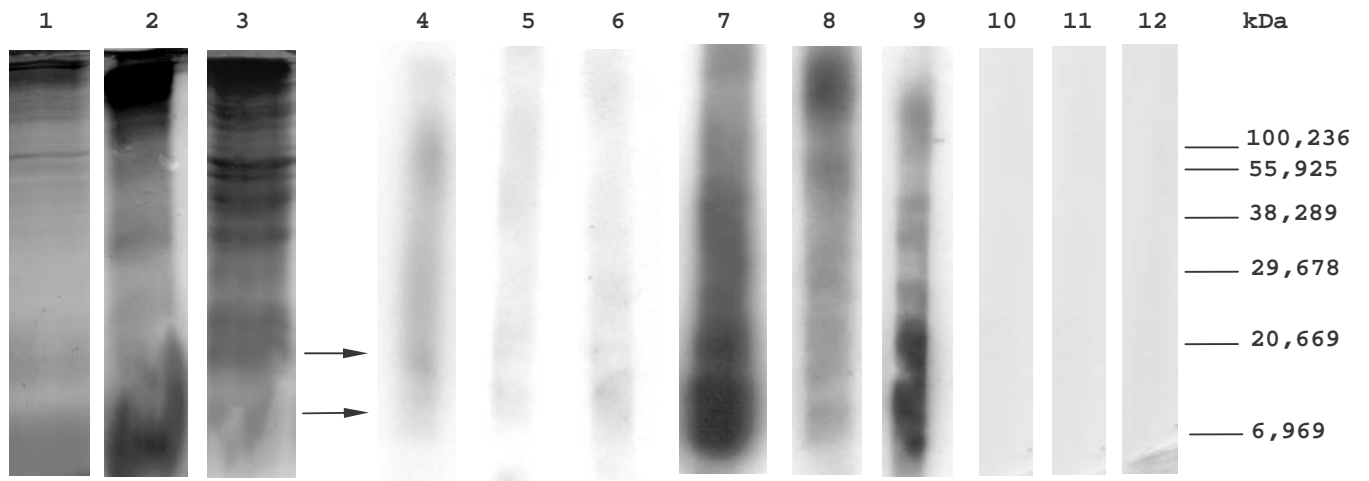


Figura 46. Inmunoblot del AgB en estadios de *E. granulosus*. Se sembraron 100µg de proteínas (oncosferas y adultos) o 40µg (protoescólicas genotipo G1) y se incubaron con anticuerpos diluidos 1/500. Oncosferas (calles 1, 4, 7 y 10), adultos (calles 2, 5, 8 y 11), protoescólicas (calles 3, 6, 9 y 12). Calle 1, 2 y 3 proteínas teñidas con *Coomassie blue* de oncosferas, adultos y protoescólicas respectivamente; calles 4, 5 y 6 MAb anti B1 (EB7); calles 7, 8 y 9 MAb anti B2/B4; calles 10, 11 y 12, MAb anti Cruzipaina de *T. cruzi* (control negativo). Se señalan las bandas correspondientes al monómero y dímero de AgB. La detección se realizó con anti IgG de ratón conjugada con peroxidasa 1/10000 mediante quimioluminiscencia (kit ECL plus, GE).

Si bien los genes AgB2 y AgB4 no pudieron detectarse en las RT-PCR sobre material de oncosferas, los ensayos de inmunoblot indican que hay expresión de estas proteínas, confirmando la sospecha de que la cantidad de ADN copia utilizada en los ensayos de RT-PCR gen específicos era insuficiente (figura 40). Por su parte los adultos presentan una señal de AgB2/B4 más tenue que los protoescolices, esto correlaciona con los ensayos de RT-PCR donde se observó menor intensidad en los productos de amplificación provenientes de los genes AgB2 y AgB4 (figura 41).

3.4. Objetivo 4) Evaluar la capacidad diagnóstica de diferentes subunidades del AgB como proteínas recombinantes

3.4.1. Potencial diagnóstico de la subunidad B4

Las diferencias encontradas en la secuencia aminoacídica deducida de las proteínas AgB2 y AgB4 podrían indicar diferencias en el potencial inmunodiagnóstico de ambas proteínas. Es por ello que se evaluó su desempeño diagnóstico mediante inmunoblots utilizando sueros de pacientes de genotipo infectante conocido. Los sueros de pacientes con hidatidosis utilizados fueron seleccionados en base al criterio de cirugía. Se obtuvo información del genotipo infectante del 80% de los pacientes. Del resto no pudo determinarse por problemas de cantidad y calidad de la muestra (quiste operado) remitida a nuestro laboratorio. Asimismo se realizaron ensayos de ELISA utilizando LHo como antígeno. Los resultados se muestran en la figura 47 y en la tabla 9. De los 30 sueros, 19 fueron de cepa oveja (G1), 1 cepa oveja de Tasmania (G2), 4 cepa camello (G6), y 6 sin determinación de cepa. La respuesta de los sueros ante ambos antígenos recombinantes fue casi idéntica. Sólo un suero de genotipo G1 reaccionó contra rAgB2 y no contra rAgB4 (calle 18 figura 47 y tabla 9). Por otro lado las bandas reconocidas fueron diferentes para cada antígeno. Cuando se utilizó rAgB2 las principales bandas reactivas fueron el monómero y el trímero mientras que con el antígeno rAgB4 se observaron las bandas del monómero y el dímero. La sensibilidad del rAgB4 fue similar a la del rAgB2, 59 y 56% respectivamente. Es por ello que de ambos antígenos se eligió solamente al rAgB2 para los siguientes ensayos serológicos.

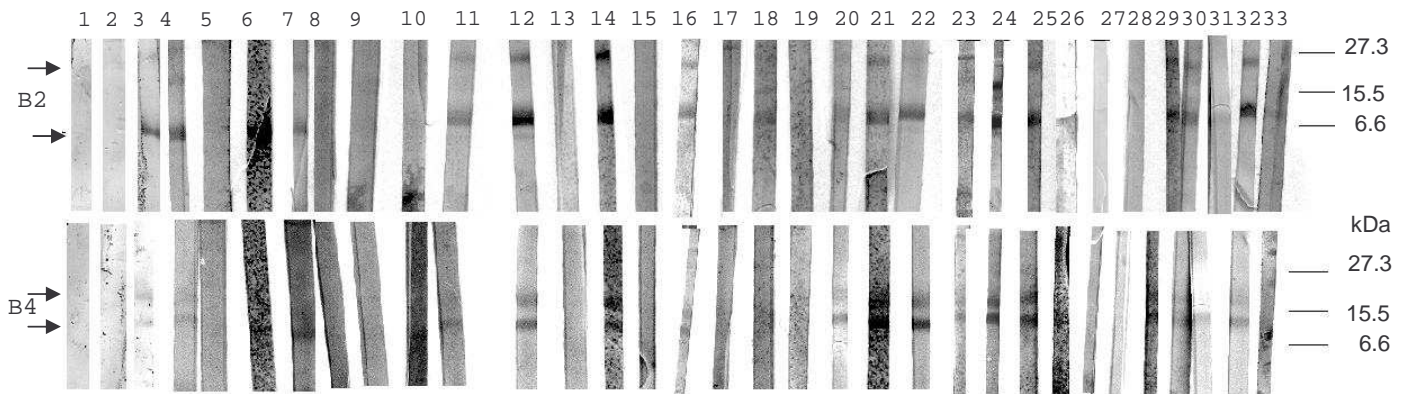


Figura 47. Inmunoblot realizado con las proteínas rAgB2 y rAgB4. Se señalan las bandas correspondientes al monómero y trímero (rAgB2) y monómero y dímero (rAgB4). Los códigos de los sueros se muestran en la tabla 9. Control en calle 1: transferencia de proteínas bacterianas luego de la inducción del vector vacío e incubado con el suero estándar anti-*Echinococcus* (NIBSC).

Tabla 9. Código, cepa, y resultado del inmunoblot y del ELISA de los 32 sueros utilizados. Las calles corresponden a la figura 47.

Calle	Suero	Cepa	Inmunoblot		ELISA
			rAgB2	rAgB4	LHo
2	Normal	No hidatídico	-	-	-
3	STD	suero estándar anti- <i>Echinococcus</i> (NIBSC)	+	+	+
4	HT19	ND	+	+	+
5	HT9	G2	-	-	+
6	HSC3	G1	+	+	+
7	HR66	G1	+	+	+
8	HR64	G6	-	-	-
9	HR63	G1	-	-	+
10	HR62	G6	-	-	+
11	HR61	G1	+	+	+
12	HR60	G1	+	+	+
13	HR59	ND	-	-	-
14	HR58	G1	+	+	+
15	HR57	ND	-	-	+
16	HR56	ND	+	+	+
17	HR53	G1	-	-	+
18	HR47	G1	+	-	+
19	HR46	G1	-	-	+
20	HR45	G1	+	+	+
21	HR44	G1	+	+	+
22	HR43	G1	+	+	+
23	HR41	G1	+	+	+
24	HR40	G1	+	+	+
25	HR39	G1	+	+	+
26	HR38	G1	-	-	+
27	HR35	G1	-	-	+
28	HR32	G1	-	-	+
29	HR16	ND	+	+	+
30	HR15	ND	+	+	+
31	HLP1	G6	+	+	+
32	HB4	G1	+	+	+
33	HB1	G6	-	-	+

3.4.2. Potencial diagnóstico de las subunidades B1 y B2

Los resultados presentados forman parte del estudio diseñado por el Dr. Gualberto Gonzalez-Sapienza y la Dra. Carmen Lorenzo del Laboratorio coordinador de la Red Sudamericana de Serología Hidatídica (RSSH), Departamento de Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. En esta tesis se presentan los resultados obtenidos y analizados en nuestro laboratorio. Se evaluó el potencial diagnóstico de las proteínas rAgB1 y rAgB2 mediante la seroteca perteneciente a la RSSH que involucra a seis laboratorios de cinco países afectados por la hidatidosis: Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay. Los sueros y antígenos fueron enviados al laboratorio coordinador de la Red donde fueron codificados al azar, fraccionados y reenviados a cada laboratorio perteneciente a la Red. Los sueros de pacientes con hidatidosis utilizados se eligieron en base a criterios de cirugía. En las tablas 10, 11 y 12 se muestran los sueros utilizados, su origen geográfico y la patología a la que pertenecen junto con las absorbancias obtenidas en los ensayos de ELISA con los tres antígenos evaluados.

Tabla 12. Sueros de humanos normales, origen y absorbancia obtenida por ELISA con los antígenos rAgB1, rAgB2 y LHb. Se muestra los resultados considerando los dos criterios de cut off: izquierda, promedio de sueros normales + 3 SD; derecha, el obtenido en las curvas ROC.

Normales		B2		B1		LH	
N8	Uruguay	0,064	-/-	0,089	-/-	0,041	-/-
987	Uruguay	0,091	-/+	0,041	-/-	0,0367	-/-
N9	Uruguay	0,023	-/-	0,028	-/-	0,037	-/-
974	Uruguay	0,209	-/+	0,068	-/-	0,194	+/-
967	Uruguay	0,044	-/-	0,043	-/-	0,0707	-/-
944	Uruguay	0,048	-/-	0,024	-/-	0,0783	-/-
N5	Uruguay	0,049	-/-	0,034	-/-	0,0223	-/-
951	Uruguay	0,032	-/-	0,012	-/-	0,0323	-/-
979	Uruguay	0,165	-/+	0,124	-/-	0,0407	-/-
945	Uruguay	0,036	-/-	0,042	-/-	0,0783	-/-
986	Uruguay	0,058	-/-	0,020	-/-	0,0437	-/-
956	Uruguay	0,065	-/-	0,024	-/-	0,03	-/-
984	Uruguay	0,065	-/-	0,033	-/-	0,0672	-/-
N3	Uruguay	0,022	-/-	0,000	-/-	0,0057	-/-
N6	Uruguay	0,016	-/-	0,009	-/-	0,061	-/-

En la figura 48 se muestran los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con los antígenos LHb y rAgB1 y rAgB2. Para cada antígeno se determinó el valor de corte, que diferencia los resultados positivos de los negativos, mediante dos métodos. En el primer caso se utilizó el cálculo comúnmente utilizado que define al valor de corte como el valor promedio de grupo de sueros normales más 3 desvíos estándar (3SD). Alternativamente se estableció el valor de corte mediante análisis de curvas *receiver operating characteristic* (ROC), definido como el valor de absorbancia que da la mayor suma de sensibilidad (%) y especificidad (%). Para el rAgB1 ambos valores fueron iguales. Puede verse que si se utiliza el valor de corte determinado por el método ROC un mayor número de sueros con otras parasitosis caen por debajo del valor de corte, lo que aumenta la especificidad del ensayo y no se pierde significativa sensibilidad. También puede observarse que en general el antígeno LHb se comporta de manera similar al rAgB1, siendo éste último más específico, en particular con los sueros de pacientes con hidatidosis alveolar. El rAgB2 exhibe un desempeño diagnóstico inferior.

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos con ambos métodos se muestran en la figura 49. Puede observarse que el rAgB1 y el LHb tienen resultados similares. La sensibilidad del AgB1 es del 76 % y la especificidad del 87 % con los dos criterios de valor de corte utilizados. Para LHb la sensibilidad varía de 80 a 78% y la especificidad de 69 a 84%. El rAgB2 tiene una eficiencia diagnóstica menor, siendo la sensibilidad de 46% ó 88%, criterios de valor de corte 3SD ó ROC respectivamente y la especificidad de 83 ó 47%. Cabe destacar que los resultados fueron altamente reproducibles entre los seis laboratorios involucrados.

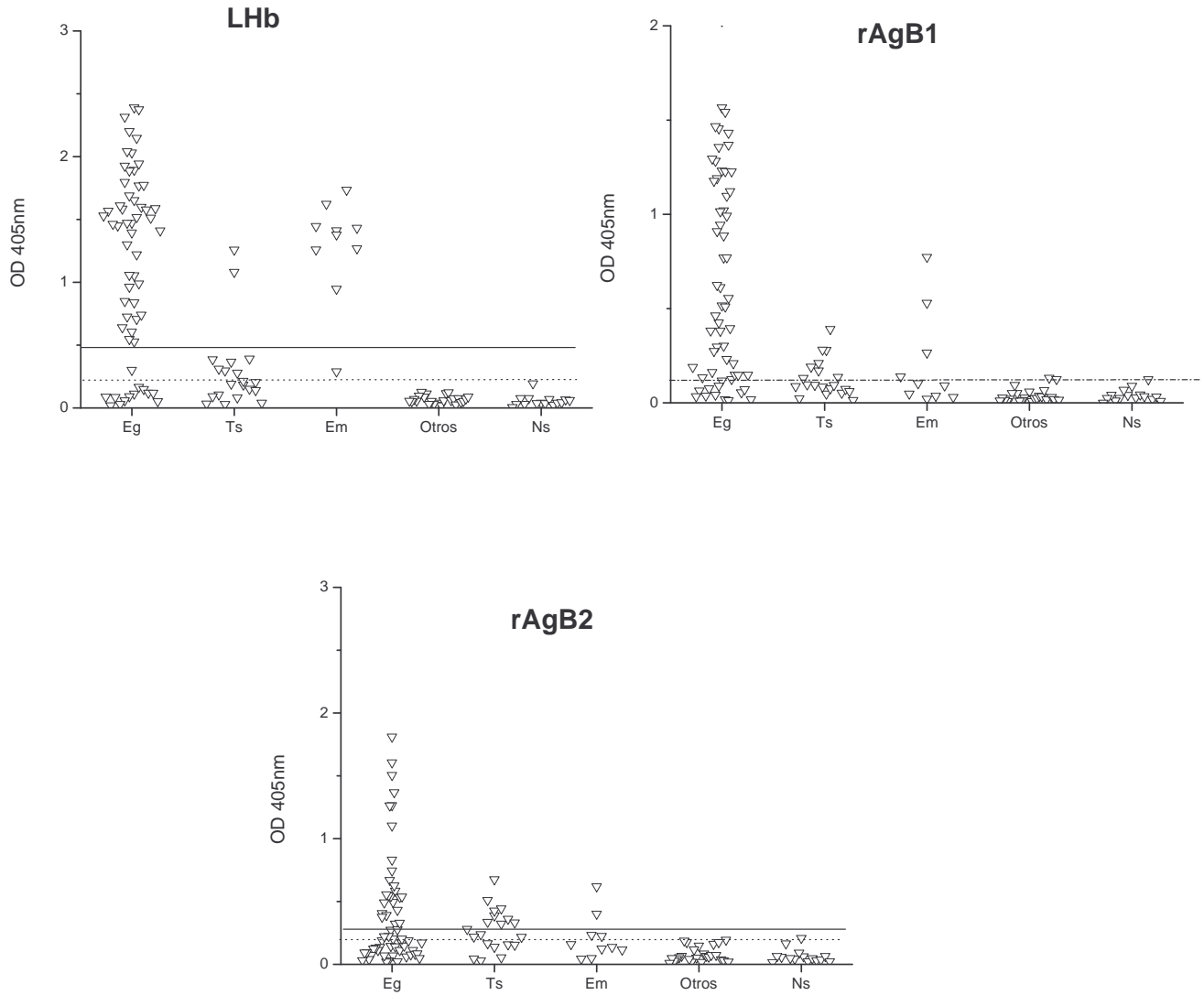


Figura 48. Análisis de las absorbancias a 405 nm obtenidas empleando los antígenos Lhb, rAgB1 y rAgB2. Los sueros empleados son los mostrados en las tablas. La línea llena indica el valor de corte calculado con las curvas ROC y la línea punteada indica el valor de corte calculado como el promedio del triplicado más tres desvíos estándar. Los sueros se agruparon como: Eg sueros de pacientes con hidatidosis quística; Ts: sueros de pacientes con cisticercosis; Em: sueros de pacientes con hidatidosis alveolar; Otros: sueros de pacientes con fasciolosis, esquistosomiosis o triquinosis., Ns: suero de donantes sanos.

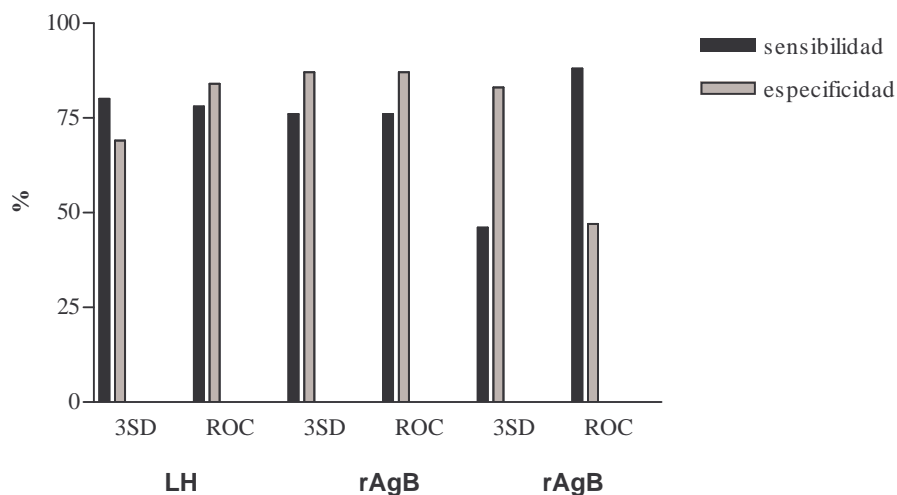


Figura 49. Porcentaje de sensibilidad y especificidad obtenidos con los tres antígenos utilizados, LHb, rAgB1 y rAgB2 utilizando dos criterios de valor de corte: promedio de sueros normales más tres desvíos estándar (3SD) ó el obtenido mediante la construcción de curvas ROC (ROC).

Debido a que el comportamiento del LHb fue similar al de la proteína rAgB1 se decidió evaluar su utilidad como herramienta diagnóstica en diferentes regiones endémicas. Para ello se evaluó la capacidad diagnóstica de diferentes lotes de antígeno LH obtenidos en cada laboratorio perteneciente a la Red y se evaluaron frente a la seroteca previamente descrita. Los LH evaluados fueron 3 de origen bovino y 3 de origen ovino. Se encontró concordancia en los parámetros de sensibilidad y especificidad de los diferentes LH utilizados (tabla 13). Asimismo, en la mayoría de los casos, cada suero individual se clasificó como positivo para todos los LH analizados o negativo para todos sin situaciones intermedias. Estos resultados, obtenidos en el marco de la Red Sudamericana de Serología Hídática, fueron utilizados para definir criterios de diagnóstico en *screenings* epidemiológicos (Lorenzo *et al.*, 2005).

Tabla 13. Desempeño diagnóstico de los seis antígenos LH de *E. granulosus* en ELISA utilizando la seroteca de la RSSH.

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
LHb2	78,0	82,9
LHb3	79,7	82,9
LHb4	79,7	80,0
LHo5	78,0	82,9
LHo6	78,0	82,9
LHo7	78,0	84,3

nota: LHb2-b4: líquido hídático de origen bovino; LHo5-o7: líquido hídático de origen ovino.

Discusión

Variabilidad del AgB

Los resultados obtenidos confirman que el AgB es variable y se encuentra compuesto por una familia de 5 genes, cada uno de los cuales presenta numerosas variantes (Kamenetzky *et al.*, 2005, Muzulin *et al.*, 2007).

Por primera vez se describe la variabilidad natural del AgB en los genotipos de *E. granulosus* caracterizados molecularmente. Debido a que se considera que la variación natural en genes indicaría una función importante de los mismos en la relación hospedador-parásito (Maizels *et al.*, 2002), estos resultados apoyan la idea de que el AgB tendría un rol fundamental en la supervivencia del parásito en el hospedador. A pesar de la complejidad de la estructura del AgB, la construcción de árboles filogenéticos ha permitido observar que los genotipos de *E. granulosus* difieren en el tipo y frecuencia de genes existentes del AgB. El uso en conjunto de PCR-SSCP y secuenciación permitió analizar el polimorfismo de genes relacionados al AgB en 5 cepas genéticamente caracterizadas de *E. granulosus*. Si bien la existencia de variación intraespecífica ya fue descrita y se sugirió que las cepas difieren en su antigenicidad (Shepherd & McManus, 1987; Zhang *et al.*, 2003), éste es el primer trabajo en el que se analiza sistemáticamente la variabilidad genética en genes codificantes para antígenos entre genotipos del parásito. La mayoría de los estudios sobre polimorfismo molecular en parásitos multicelulares involucran secuencias no codificantes. Sólo unos pocos estudios, tienen como objeto determinar la variación en genes codificantes (para una revisión ver Maizels & Kurniawan-Atmadja, 2002; Rosenzvit *et al.*, 2006), sin embargo en la mayoría de los casos, el nivel de variación descrito es significativamente menor al encontrado en esta tesis en las secuencias de *AgB* de *E. granulosus*.

Las variantes de *AgB* se agrupan en los diferentes genotipos de manera coincidente con los marcadores nucleares y mitocondriales utilizados en la tipificación de cepas de *E. granulosus* (Bowles *et al.*, 1995; Thompson *et al.* 1995; Lymbery & Thompson, 1996; Rosenzvit *et al.* 2001; Kamenetzky *et al.*, 2002; Bartholomei-Santos *et al.*, 2003, Obwaller *et al.*, 2004). Se observa que quistes pertenecientes al cluster de genotipos G1/G2 comparten variantes de *AgB* mientras que los quistes pertenecientes al cluster G6/G7 comparten otras

variantes. Asimismo, el cluster G5 contiene variantes de *AgB* diferentes al resto de los genotipos pero cercanas filogenéticamente a la presentes en el cluster G6/G7. Además, se encontró un alto nivel de polimorfismo en la familia de genes codificantes para el *AgB* en cada quiste de *E. granulosus* analizado.

El *AgB2* presenta numerosas variantes en el cluster G1/G2 donde se expresa frecuentemente. Sin bien, en los clusters G6/G7 y G5 se encontraron secuencias genómicas relacionadas con este gen (*AgB2p*), todas ellas presentan una sustitución en el sitio aceptor de *splicing* y no fueron detectadas en el análisis de transcripción por RT-PCR-SSCP. Si bien el método de SSCP es rápido, económico y resulta sensible para el análisis de variabilidad genética (Sunnucks *et al.*, 2000), la sensibilidad depende del tipo y tamaño de producto de PCR analizado (Gasser & Chilton, 2001) y el rango de detección de mutaciones puntuales en fragmentos menores de 400pb es de 90-100% (Lessa & Applebaum, 1993). Es por ello que posteriormente se emplearon técnicas más sensibles que involucraron la amplificación de transcritos mediante *primers* específicos para cada uno de los 5 genes que conforman la familia del *AgB*. Esta técnica demostró que aunque en menor medida que en G1, los genes relacionados al *AgB2* se transcriben en el genotipo G7. La secuencia abarcada por los *primers* utilizados no permite determinar si se trata de genes *AgB2* o *AgB2p*. Sin embargo, se observó que el transcripto obtenido de G7 no contiene las primeras 5 bases del exón 2 (TAAAG), lo que sugiere que se trata de genes *AgB2p* que fueron procesados tomando como sitio aceptor de *splicing* el AG contenido en esa secuencia. Este tipo de procesamiento resultaría en una proteína traducida no funcional, debido a la presencia de un codón de terminación prematuro, por lo que cabe preguntarse si la proteína *AgB2* se expresa en G7. Alternativamente podría utilizarse el sitio TG presente en las secuencias *AgB2p* como aceptor de *splicing*. El par GT-TG aunque en muy baja frecuencia, ha sido descrito como señal no canónica de *splicing* (Bursset *et al.*, 2000; Soong *et al.*, 2002). Sin embargo, si éste fuera el procesamiento, la proteína traducida del mensajero maduro sería mucho más corta y con una homología de sólo el 47% con los *AgB2* reportados hasta el momento. Al menos de manera teórica se puede postular que para *AgB2p* sólo se obtendría proteína *AgB2* si se tomara como aceptor de *splicing* el tercer AG presente en el segundo exón, la proteína *AgB2* resultante tendría 6

aminoácidos menos que la presente en los demás genotipos. Se pueden plantear estrategias experimentales para intentar responder esta pregunta. Una de ellas sería la secuenciación de un alto número de transcritos *AgB2/B2p* y sus correspondientes variantes genómicas. Asimismo podrían diseñarse *primers* complementarios a la secuencia TAAAG y utilizarlos en ensayos de RT-PCR sobre el genotipo G7. Además se podría intentar detectar directamente a la proteína del genotipo G7 generando anticuerpos monoclonales que reconozcan un epítipo presente sólo en las proteínas *AgB2*. Por otro lado no puede descartarse que los *AgB2p* cumplan una función reguladora como transcritos, se han descrito pseudogenes activamente transcritos como reguladores de la estabilidad de los mensajeros de sus genes homólogos (Hirotsune *et al.*, 2003).

Los análisis de selección sobre las secuencias de *AgB2* sugieren que estarían sujetos a selección purificadora. Estas secuencias presentes como genes funcionales en el cluster G1/G2 quizás tengan un rol en la adaptación al hospedador intermediario específico. Varias especies de hospedadores pueden actuar como intermediarios de este cluster de genotipos pero la producción de quistes fértiles se da principalmente en ovejas (Schantz, 1995; Thompson & McManus 2002)

El *AgB4* se encuentra presente y se expresa en todos los genotipos analizados pero sus secuencias genómicas y de ADN copia son más variables y frecuentes en los clusters G6/G7 y G5. Coincidentemente, los estudios de RT-PCR con *primers* específicos de gen mostraron que en G7 el *AgB4* tiene mayor nivel de expresión que en G1. Sería interesante determinar si el *AgB4* cumple un rol en el establecimiento y/o permanencia del parásito en el hospedero intermediario ya que el análisis realizado por Haag *et al.*, (2006a) sugiere que dicha subunidad sufre presión de selección heterogénea siendo algunos codones seleccionados positivamente y otros negativamente. Además el estudio de organización oligomérica del *AgB* nativo (González *et al.*, 1996) sugiere que las secuencias encontradas en esta tesis son efectivamente traducidas y forman parte del *AgB* oligomérico nativo.

Los genes *AgB1* y *AgB3* también muestran variantes diferentes en los genotipos de *E. granulosus*. Las diferencias son tales que en los análisis filogenéticos realizados con las 88 variantes que codifican al *AgB* han quedado

agrupadas en nodos diferenciales según pertenezcan al cluster de genotipos G1/G2 ó G6/G7 y G5. Si bien los genes AgB1 y AgB3 se encuentran en todos los genotipos analizados, el gen AgB5 no se detectó en los clusters G5 y G6/G7. Estos resultados fueron confirmados en el genotipo G7 mediante el estudio por RT-PCR con *primers* gen específicos en dónde no se detectaron transcritos del *AgB5*. Estudios realizados sobre ADN genómico del genotipo G7 utilizando los mismos *primers* confirmarían que el gen AgB5 no se detectó en el genoma de este genotipo (Muzulin *et al.*, 2007).

Las diferencias encontradas entre subunidades son lo suficientemente importantes como para que un hipotético cambio del patrón de expresión implique diferencias en el reconocimiento antigénico por parte del hospedador intermediario. De hecho, la región inmunodominante descrita para el AgB1 (González-Sapienza & Cachau, 2003) no se encuentra conservada en las demás subunidades de AgB. Asimismo, Riganò *et al.* (2004) observan que cuando líneas de células T son estimuladas con AgB nativo se produce una respuesta heterogénea que podría indicar las diferencias antigénicas de cada subunidad. La existencia de múltiples variantes en cada una de las subunidades del AgB podría proveer altos niveles de actividad de dicha proteína y parte de la diversidad observada quizás refleje cambios que son neutrales a su función. Esta última alternativa es plausible para muchas de las variantes genómicas encontradas dentro de cada uno de los cinco genes de AgB que codifican para la misma proteína.

No puede descartarse que el hecho de no haber detectado determinados genes en los clusters G5 y G6/G7 sea en realidad un menor número de copias respecto al cluster G1/G2 y que las técnicas empleadas no tengan la suficiente sensibilidad para detectarlos. Se ha intentado determinar el número de copias de cada gen en los genotipos G1 y G5 (Haag *et al.*, 2006b), los resultados obtenidos muestran que cada quiste varía significativamente en cuanto al número de copias estimadas de cada gen. Se encontraron menos de 5 copias de los genes AgB1, AgB2 y AgB4 en ambos genotipos. Por su parte el *AgB3* llega a tener cientos de copias en el genotipo G5 con un rango de variación extenso, de 7 a 117 copias. Cabe aclarar que los *primers* utilizados en la cuantificación del *AgB2* fueron diseñados sobre las secuencias reportadas previamente para el genotipo G1 (Haag *et al.*, 2006b) y no tuvieron en cuenta

la variabilidad encontrada en este trabajo, con lo cual las copias de *AgB*, que difieren en secuencia entre los genotipo G1 y G5, no están siendo evaluadas. Deberían repetirse los ensayos, teniendo en cuenta en el diseño de los *primers* la amplificación de todas las variantes descritas en los parásitos de diferentes genotipos para determinar con certeza el número de copias de cada gen.

El análisis filogenético realizado en otras especies del género coincide con el realizado por Haag *et al.* (2006a) que indican que los genes *AgB1-AgB5* se encuentran presentes en todo el género *Echinococcus* y sugeriría que eventos de duplicación anteriores a la especiación del género dieron origen a los grupos de genes *AgB2/AgB4* y *AgB1/AgB3/AgB5* resaltando la importancia biológica del *AgB* en este grupo de parásitos.

De todos los genotipos presentes en *E. granulosus*, el cluster de genotipos G1/G2 es el más variable a nivel molecular (Haag *et al.*, 1998; Rosenzvit *et al.*, 2001; Kamenetzky *et al.*, 2002; Bartholomei-Santos *et al.*, 2003) y el más distribuido mundialmente con un mayor rango de hospedadores y mayor porcentaje de infectividad en el hombre. Coincidentemente, en este cluster de genotipos se encuentran presentes los cinco genes funcionales, mientras que en los demás clusters de genotipos sólo se encontrarían el *AgB1*, *AgB3* y *AgB4* funcionales, indicando una menor capacidad de variación. Estas diferencias podrían estar relacionadas con distintas estrategias de supervivencia de los genotipos de *E. granulosus*. Debido a que cada genotipo produce quistes fértiles en determinadas especies de hospederos sería interesante determinar si un mismo genotipo de *E. granulosus* varía en el perfil de expresión del *AgB* cuando infecta a diferentes hospederos lo que permitiría relacionar la capacidad de infección con las diferentes isoformas del *AgB*. A su vez, la variabilidad encontrada entre genotipos podría indicar diferencias en las características de la infección en humanos por parte de cada cepa de *E. granulosus*. Si bien el estudio realizado por Gutiérrez *et al.* (2002) sobre las características clínicas de 42 pacientes con hidatidosis y su relación con el genotipo infectante no ha permitido encontrar una relación significativa, deben ser analizados más casos para determinar con certeza si existe algún tipo de relación, se podría además incluir el análisis de la respuesta inmunológica a las diferentes subunidades de *AgB*.

Localización del AgB en protoescólices

Los ensayos de hibridación *in situ* y la obtención de anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes subunidades de AgB permitieron determinar su localización. En esta tesis se realizaron inmunolocalizaciones sobre parásitos enteros y cortes y se emplearon varios métodos de fijación de los mismos. Se determinó que ciertos protocolos de fijación como por ejemplo el empleo de paraformaldehído disminuyen la intensidad de la señal del AgB. La falla en la detección del AgB en parásitos fijados con paraformaldehído ya había sido reportada (Jones *et al.*, 1996), los autores pudieron inmunolocalizar al Ag5 pero no al AgB. En los trabajos en los que se reportó la localización del AgB los métodos de fijación empleados involucraron formalina o glutaraldehído, por lo que no puede descartarse una pérdida de sensibilidad en la detección. Además, éstos fueron realizados con anticuerpos policlonales por lo que la especificidad de los mismos sea probablemente menor. Estos factores, entre otros, podrían explicar que los resultados de localización del AgB obtenidos hasta el momento no hayan sido coincidentes, algunos autores detectaron al AgB en tegumento de protoescólices (Yarzabal *et al.*, 1977; Rickard *et al.*, 1977; Davies *et al.*, 1978) y otros no (Sánchez *et al.* 1991). La localización en corpúsculos calcáreos fue descrita sólo por Rickard *et al.* (1977). Por otro lado uno de los estudios previos utilizó métodos de microscopia de mayor resolución (Davies *et al.*, 1978), en esta tesis solo se emplearon métodos de microscopia óptica, por lo que no puede determinarse certeramente el tipo celular involucrado. Sería interesante realizar microscopia electrónica de barrido y microscopia confocal con los anticuerpos y protocolos desarrollados en esta tesis para determinarlo.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren diferencias en la localización de las distintas subunidades del AgB: aunque tanto el AgB1 como el AgB2/B4 se localizaron en corpúsculos calcáreos, solamente para éste último se encontró localización tegumentaria/subtegumentaria, rodeando la superficie del parásito, ventosas y almohadilla rostral del protoescólex. Estas diferencias junto con el gran polimorfismo previamente descrito refuerzan la idea de que las diferentes subunidades podrían cumplir distintos roles.

Para los antígenos AgB2 y AgB4 la localización tegumentaria podría relacionarse al rol de evasión de la respuesta inmune sugerido por diversos autores (Shepherd *et al.*, 1991; Riganò *et al.*, 2001; Virginio *et al.*, 2006). Particularmente el grupo de secuencias de AgB4 posee dos regiones variables, una en su extremo amino y otra en su extremo carboxilo y se sugiere la acción de la selección sobre dichas regiones aminoacídicas (Haag *et al.*, 2006a), asimismo el número de variantes y el nivel de expresión pareciera ser diferencial entre genotipos (Kamenetzky *et al.*, 2005). Esto argumenta a favor de un rol relevante del AgB en la interacción hospedero-parásito. Además se observa una señal radial en ventosas y almohadilla rostral que podría estar relacionada con fibras musculares (Markoski *et al.*, 2005), aunque habría que realizar estudios de microscopía de mayor resolución para determinar el tipo celular involucrado. Estas estructuras del protoscolex son las que le permiten adherirse al intestino del hospedador definitivo (Smyth & McManus, 1989), sería interesante determinar si el AgB está involucrado en dicha función.

La señal del AgB en periferia del corpúsculo calcáreo sugiere que forma parte de la célula que lo origina y podría explicar la señal ausente en algunos corpúsculos calcáreos que habrían degenerado totalmente a la célula que les dio origen. Además, en un mismo individuo se encuentran corpúsculos calcáreos que expresan AgB1 y/o AgB2/B4, sería interesante determinar si la presencia de determinadas subunidades del AgB se relaciona con el desarrollo del corpúsculo calcáreo. Por otro lado, los corpúsculos calcáreos son estructuras relacionadas con la acumulación de lípidos y detoxificación (Smith & McManus, 1989), la localización del AgB en dichas estructuras podría atribuirse a la función de detoxificación sugerida por Chemale *et al.*, (2005) en su estudio de unión a ligandos hidrofóbicos. En especial el grupo de secuencias que codifican para la subunidad AgB2 sufren selección purificadora, la tendencia a conservar la secuencia aminoacídica de la proteína podría explicarse por la función sugerida. También los corpúsculos calcáreos han sido sugeridos como responsables de la inhibición de la vía clásica de complemento que involucra complejos inmunes (Kassis & Tanner, 1976), si bien deben verificarse los resultados obtenidos, resulta sugerente que el AgB se localice en corpúsculos calcáreos. Así como el AgB otras proteínas inmunogénicas han sido localizadas en corpúsculos calcáreos. Una de ellas, la proteína de unión a

calcio EgCaBP1 se localiza en la matriz orgánica del corpúsculo y su forma recombinante es capaz de unir calcio (Rodrigues *et al.*, 1997), además una isoforma EgCaBP2 ha demostrado ser inmunogénica en humanos (Virginio *et al.*, 2003). Recientemente se ha encontrado su homóloga igualmente antigénica en *T. solium* (Zurabian *et al.*, 2005). Estas proteínas podrían movilizar el calcio desde o hacia el parásito y estar involucradas en el desarrollo del corpúsculo calcáreo. Asimismo se ha descrito una proteína fibrilar EgA31, localizada en periferia de corpúsculos calcáreos e inmunogénica en el hospedero definitivo (Saboulard *et al.*, 2003) con similitud a las proteínas paramiosinas involucradas en la inhibición de complemento en *Schistosoma mansoni* (Deng *et al.*, 2003).

Cabe destacar que las dos regiones donde se ha encontrado presente al AgB: tegumento y corpúsculos calcáreos, fueron asociadas a la interacción con la respuesta inmune del hospedero. El tegumento de los cestodes los protege del daño inmunológico y en algunas especies se ha demostrado que son activas unidades secretoras (Halton, 2004). Asimismo se ha descrito la activación de la vía alternativa de complemento por la superficie de los protoescólices (Ferreira *et al.*, 1992). Por otro lado Kassis & Tanner (1976) encontraron actividad anticomplementaria en protoescólices previamente lisados por complemento y en la fracción filtrada del líquido hidatídico rica en corpúsculos calcáreos. Los corpúsculos calcáreos aislados mostraron retener la actividad anticomplementaria. Los autores proponen un mecanismo de evasión durante la infección temprana, la activación de complemento por parte de protoescólices liberados del quiste consumiría compuestos activos de complemento, a su vez los protoescólices lisados por complemento liberarían corpúsculos calcáreos con actividad anti-complementaria en las inmediaciones de los protoescólices vivos remanentes favoreciendo su establecimiento. La actividad anti-complementaria se perdería durante la formación del quiste hidatídico no encontrándose activación de complemento por parte de los componentes de la pared del quiste (Ferreira *et al.*, 2000). La hidatidosis es una enfermedad crónica, el control de los procesos inflamatorios del hospedero le permitiría al parásito crecer, multiplicarse y permanecer en el hospedador durante largos períodos de tiempo. Algunos de estos procesos podrían encontrarse modulados por el grupo de proteínas que conforman al AgB.

Expresión estadio específica del AgB

Debido a la gran variabilidad encontrada en las secuencias de *AgB* y su expresión diferencial en los protoescolices de diferentes genotipos es que resulta interesante determinar su expresión en otros estadios de *E. granulosus*. Mediante el diseño de *primers* gen-específicos e inmunoblots con anticuerpos monoclonales por primera vez se determina que el AgB se expresa en los estadios oncosfera y adulto de *E. granulosus*. Si bien los resultados obtenidos son preliminares y requerirán de una profundización posterior, queda en evidencia que hay genes del AgB con diferentes niveles de expresión en oncosferas y adultos, sugiriendo una función diferencial de cada subunidad en el ciclo de vida del parásito. Los resultados obtenidos mediante RT-PCR sugieren que las oncosferas y los adultos expresan principalmente *AgB3* y *AgB5* y en menor medida *AgB1*, *AgB2* y *AgB4*. Asimismo, es notorio que el *AgB5* parecería estar más expresado en oncosferas que en adultos o protoescolices, sería interesante determinar la función de esta subunidad en el estadio infectante para el hombre. La importancia del AgB en el estadio oncosferas se ha puesto de manifiesto en infecciones experimentales en ratones que, al ingerir oncosferas de *E. granulosus*, producen muy tempranamente anticuerpos anti AgB (Zhang *et al.*, 2003b). Para determinar fehacientemente la subunidad que se expresa en cada estadio será necesario contar con un panel de anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las 5 subunidades descritas. En *E. multilocularis*, se han descrito 5 genes (*EmAgB1-EmAgB5*) relacionados al AgB, 4 de ellos con más de 90% de homología en sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas a los genes *AgB1-AgB4* de *E. granulosus*. Estos genes también parecen expresarse diferencialmente, encontrándose perfiles de expresión particulares en cada estadio de desarrollo (Mamuti *et al.*, 2006). Asimismo, pueden observarse patrones de expresión en común entre ambas especies, el *EmAgB3* es de expresión constitutiva mientras que los *EmAgB1*, *EmAgB2* y *EmAgB4* se encuentran ausentes o pobremente expresados en adultos. El significado de estos hallazgos requiere de análisis funcionales sobre cada subunidad de AgB.

Es notorio que en un trabajo reciente sobre la caracterización de secuencias de *ESTs* (*expressed sequence tags*) de protoesclóices y capas germinales de *E. granulosus* sólo se encontraron secuencias correspondientes al *AgB3* en protoesclóicesy al *AgB4* en capa germinal (Fernández *et al.*, en preparación). Sería interesante determinar si el método de obtención de *ESTs*, que requiere la presencia de la modificación en 5' del transcripto maduro denominada "capping", utilizada en ese trabajo es la causa del aparente sesgo de subunidades. Las diferencias en el procesamiento de transcriptos podrían regular la expresión del *AgB* en cada estadio del parásito. Independientemente de la causa, estos hallazgos aportan otra evidencia de expresión diferencial de las subunidades del *AgB* en los diferentes estadios del ciclo de vida de *E. granulosus*.

Potencial diagnóstico del AgB

En los ensayos realizados para la detección de IgG-anti *E. granulosus* pudo observarse que los sueros respondieron tanto al rAgB2 como al rAgB4 independientemente del genotipo de parásito presente en el paciente del que se extrajo el suero. Para determinar certeramente el tipo de diagnóstico a implementar en cada región endémica que presente varios genotipos de *E. granulosus* infectando al hombre, debería analizarse un mayor número de sueros de genotipos diferentes a G1.

De todos los antígenos ensayados en este trabajo y en el trabajo dentro del marco de la RSSH, el que mostró un mejor comportamiento respecto a la sensibilidad y especificidad fue el LH (Lorenzo *et al.*, 2005). El LH es una mezcla compleja de proteínas del parásito y del hospedero, por lo que puede presentar un alto grado de reacción cruzada, sin embargo, utilizando el análisis ROC para definir el valor de corte de este antígeno, se llega a valores de especificidad aceptables. Es por ello que se decidió evaluar otro factor, el de la variabilidad en la obtención de este antígeno en los diferentes laboratorios que conforman al Red. El LH demostró ser un antígeno de alta reproducibilidad, independientemente del hospedero o zona geográfica de donde se obtenga, los niveles de sensibilidad y especificidad fueron virtualmente idénticos. Además cada suero individual se clasificó como positivo para todos los LH analizados o

negativo para todos, sin casos intermedios. Lo mismo ocurrió con las proteínas rAgB1 y rAgB2, por lo que la variabilidad reportada en los ensayos serológicos para hidatidosis (Carmena *et al.*, 2006; Zhang *et al.* 2003a) puede atribuirse principalmente al panel de sueros usados. El rAgB1 mostró una eficiencia diagnóstica similar al LH, la ventaja de esta fuente antigénica es la posibilidad de producción a gran escala y de manera estandarizada y podría utilizarse como ensayo confirmatorio. Sin embargo los niveles de sensibilidad y especificidad del LH y el rAgB1 distan de los valores deseados tanto para estudios epidemiológicos como para diagnóstico individual. El rAgB2 fue previamente caracterizado con valores de sensibilidad y especificidad mucho mayores a los obtenidos en esta tesis (Viriginio *et al.*, 2003). Puede pensarse que estas contradicciones surgen principalmente por las características de la seroteca utilizada. Por un lado la seroteca utilizada por la RSSH se compuso por sueros de pacientes con hidatidosis confirmados por cirugía, por lo que las características clínicas de los pacientes pueden llegar a ser diferentes que en los casos donde el diagnóstico fue sólo por imagen. La enfermedad hidatídica no tiene una sintomatología clara y los sueros utilizados con “sospecha” de hidatidosis diagnosticados por imagen pueden conducir a resultados erróneos.

Sería interesante evaluar otras subunidades de AgB para determinar su desempeño diagnóstico, si bien los estudios de estructura realizados no son muy alentadores. El análisis de autoensamblaje de los monómeros de AgB recombinantes muestra que el rAgB3 es más resistente a proteólisis que el rAgB1 y el rAgB2, lo que sugiere una localización interna en el AgB nativo. La estructura tridimensional que presentaría el rAgB3 en el AgB oligomérico podría limitar su procesamiento y presentación a células Th, lo que explicaría por qué esta subunidad despierta una respuesta humoral poco específica en pacientes con hidatidosis comparada con los anticuerpos que se generan anti rAgB1 o anti rAgB2 (Monteiro *et al.*, 2006). Una alternativa para la búsqueda de antígenos útiles para el diagnóstico sería el uso de péptidos sintéticos dirigidos a las diferentes regiones del AgB, para ello habría que realizar estudios similares a los realizados por González-Sapienza (2000) sobre todas las subunidades del AgB. Una vez definidos los péptidos podrían evaluarse con estrategias del tipo “multiple antigen blot assay (MABA)” (Noya & Noya, 1998)

que permiten analizar múltiples antígenos ante el mismo panel de sueros mediante técnicas inmunoenzimáticas simples y en relativo corto plazo.

Asimismo es imperativa la caracterización de nuevos antígenos que superen el desempeño diagnóstico de los actuales. Por este motivo en nuestro laboratorio se están realizando proyectos de búsqueda y caracterización de proteínas de secreción y de membrana como posibles candidatos con valor diagnóstico.

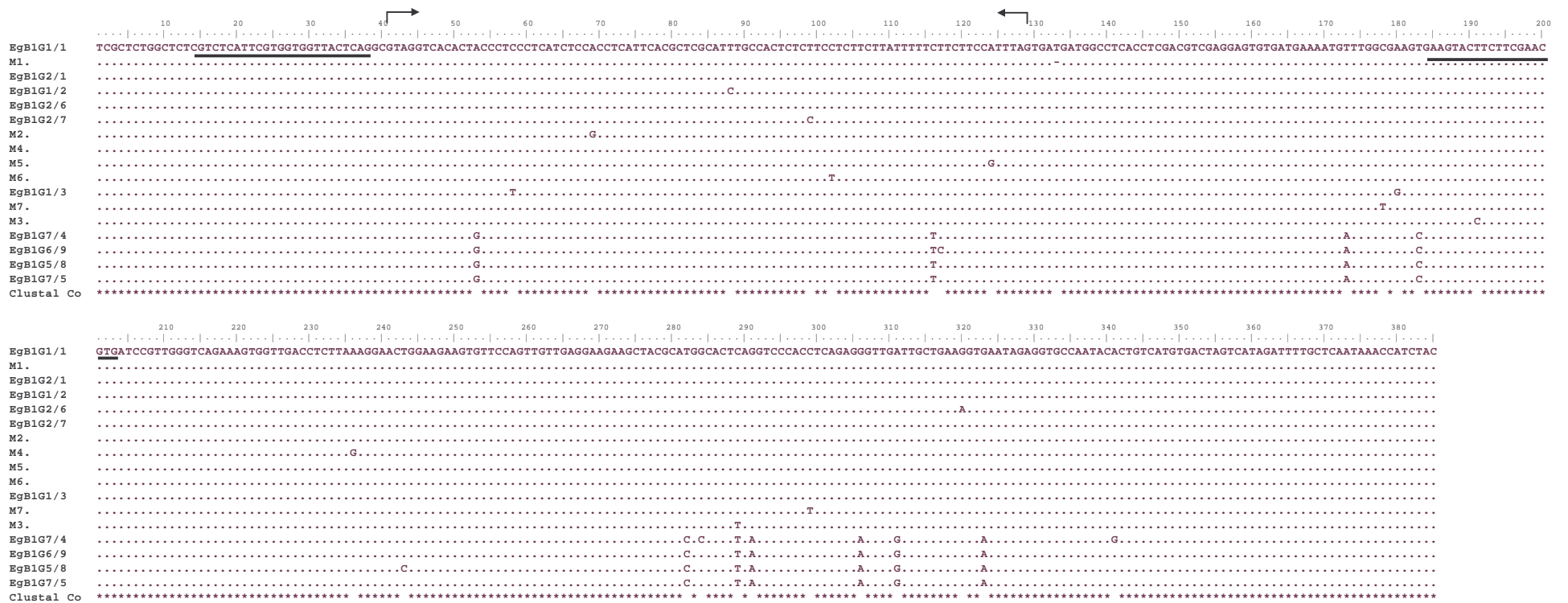
Asimismo, mediante el trabajo de la RSSH se evidencia que es necesario, para la comparación de antígenos, que éstos sean evaluados usando los mismos protocolos y serotecas. Esto es crucial ya que aunque se encuentren disponibles antígenos recombinantes o nativos correctamente purificados, su potencial uso queda restringido debido a la falta de resultados concordantes realizados por investigaciones independientes.

Conclusiones generales

Puede concluirse de este trabajo que el AgB está codificado por una familia de genes, con un gran número de variantes genómicas y de transcritos variables entre genotipos y estadios del ciclo de vida de *E. granulosus*. Los genotipos de *E. granulosus* tienen características diferenciales en cuanto a la presencia en el genoma y la expresión de un antígeno que estaría involucrado en la relación parásito-hospedador, más aún, la localización de algunas de las subunidades del AgB refuerzan la idea de un rol de evasión de la respuesta inmune para esta proteína. La presencia de determinadas subunidades del AgB en el estadio infectivo para el hombre es relevante y requiere de una profundización posterior. Asimismo, el análisis inmunodiagnóstico realizado en el marco de la Red Sudamericana de Serología Hidatídica permitió crear la plataforma para el estudio de nuevos antígenos que podrían incluir nuevas subunidades de AgB. Dado que el AgB es una de las principales proteínas presentes en el estadio larvario el cual puede permanecer en el hombre durante varios años sin producir daños aparentes, la expresión diferencial de genes que codifiquen para diferentes subunidades del AgB podría estar relacionada a algún tipo de función en su interacción con la respuesta inmune.

Apéndice

Alineamientos de secuencias genómicas de *EgB1-EgB5* para diseño de *primers* específicos. Se señalan subrayadas las secuencias de los *primers forward* y *reverse*. Se señalan con flechas la región de las secuencias correspondientes al intrón. Las secuencias fueron tomadas del GenBank y las obtenidas en este trabajo.



Primers *EgB1* específicos. Secuencias genómicas de todas las variantes de *AgB1* descritas. Se subraya el sitio de unión de ambos *primers*. Entre flechas se indica la región correspondiente al intrón. La región elegida para el diseño de los *primers* fue analizada en las secuencias de *EST* disponibles. Se degeneraron algunos sitios de los *primers* para garantizar la amplificación de todas las variantes.

Primers EgB2 específicos. Secuencias genómicas de todas las variantes de *AgB2* descritas. Se subraya el sitio de unión de ambos *primers*. Entre flechas se indica la región correspondiente al intrón. La región elegida para el diseño de los *primers* fue analizada en las secuencias de *EST* disponibles. Se degeneraron algunos sitios de los *primers* para garantizar la amplificación de todas las variantes.

Primers EgB3 específicos. Secuencias genómicas de todas las variantes de *AgB3* descritas. Se subraya el sitio de unión de ambos *primers*. Entre flechas se indica la región correspondiente al intrón. La región elegida para el diseño de los *primers* fue analizada en las secuencias de *EST* disponibles. Se degeneraron algunos sitios de los *primers* para garantizar la amplificación de todas las variantes.

Bibliografía

Ammann, R. and Eckert, J. (1995) Clinical diagnosis and treatment of Echinococcosis in humans in *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. Páginas: 411-463.

Arend AC, Zaha A, Ayala FJ, Haag KL. (2004) The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Experimental Parasitology*; 108: 76-80.

Atías A. (1991) *Parasitología Clínica*. Tercera Edición. Publicaciones Técnicas Mediterráneos Ltda. Santiago de Chile.

Barbieri, M.; Fernández, V.; González, G.; Luaces, V. M.; Nieto, A. (1998) Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunology* 20, 51-61.

Barrett, J.; Saghir, N.; Timanova, A.; Clarke, K.; Brophy, P. M. (1997) Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm *Moniezia expansa*. *European Journal of Biochemistry*. 250, 269-275.

Bart, J. M., Bardonnet, K., Elfegoun, M. C. B., Dumon, H., Dia, L., Vuitton, D. A. and Piarroux, R. (2004) *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* 128, 229-234.

Bartholomei-Santos, M., L., Heinzelmann, L., S., Oliveira, R., P., Chemale, G., Gutierrez, A., M., Kamenetzky, L., Haag, K., L. And Zaha A. (2003) Isolation and characterization of microsatellites from the tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*. 126:599-605 .

Battelli, G. (2004) Socio-economic impact of cystic echinococcosis and of its control: some data and considerations. *Parassitologia* 46 :359-62.

Bowles J., Blair D. and McManus D. P. (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54 165-173

Bowles J., van Knapen F., and Mcmanus D. P. (1992) Cattle strain of *Echinococcus granulosus* and human infection. *Lancet* 339, 1358

Bowles J. and McManus D. P. (1993a) Molecular variation in *Echinococcus*. *Acta Tropica* 53, 291-305

Bowles J. and McManus D. P. (1993b) NADH hydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International Journal of Parasitology* 23, 969-972

Bowles J. and McManus D. P. (1993c) Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Molecular and Biochemical Parasitology* 57, 231-240

Bowles J., Blair D. and McManus D. P. (1994) Molecular genetic characterization of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 109, 215-221

Bowles, J., Blair, D. and McManus, D. P. (1995). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology* 110, 317–328.

Bui L.T., Stenzel D.J., Jones M.K. (1999). Reappraisal of vesicular types in the syncytial tegument of the *Echinococcus granulosus* protoscolex. *Parasitology Research*, 85, 35-40.

Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV. (2000) Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research* 28, 4364-75.

Burset, M., Seledtsov, I., A., Solovyev, V., V. (2001) SliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucleic Acids Research*, 29 255-259.

Carmena, D., Benito, A., Eraso, E. (2006) Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Tropica* 1, 74-86.

Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM, Zaha A. (2005) *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biophysica Acta* 1747, 189-94.

Chemale, G., Haag, K.L., Ferreira, H.B. and Zaha., A. (2001). *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Molecular and Biochemical Parasitology* 116, 233-237.

Chung, J.Y., Bahk, Y.Y., Huh, S., Kang, S.Y., Kong, Y. and Cho, S.Y. (1999). A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *Journal of Infection Disease* 180, 1307-1315.

Coltorti E. A. (1975) La penetración de macromoléculas a través de las membranas parasitarias del quiste hidatídico. Sus implicancias farmacológicas e inmunológicas. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Coltorti EA, Varela-Diaz VM. (1975) Penetration of host IgG molecules into hydatid cysts. *Z Parasitenkd.* 48, 47-51.

Davies C, Rickard MD, Bout DT, Smyth JD. (1978) Ultrastructural immunocytochemical localization of two hydatid fluid antigens (antigen 5 and antigen B) in the brood capsules and protoscoleces of ovine and equine *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Parasitology* 77, 143-52.

de Meeûs T., Michalakis Y. and Renaud F. (1998) Santa Rosalia Revisited: or Why are there so many kinds of parasites in "The garden of earthly delights"? *Parasitology Today.* 14, 10-13.

Deng J, Gold D, LoVerde PT, Fishelson Z. (2003) Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. *Infection Immunity* 71, 6402-10.

Di Felice G., Pini C., Afferini C., Vicari G. (1986) Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Molecular and biochemical Parasitology* 20, 133-142.

Eckert, J. & Deplazes, P. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. (2004) *Clinical Microbiology Reviews* 17, 107–135

Eckert J. and Thompson R. C. A. (1997) Intraespecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Tropica* 64, 19-34.

Eckert J. Conraths F., J. and Tackmann K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *International Journal for Parasitology* 30 1283-1294

Eckert J., Thompson R. C. A., Michael, S. A. Kumaratilake L. M., and El Sawah H. M. (1989) *Echinococcus granulosus* of camel origin: development in dogs and parasite morphology. *Parasitology Research* 75, 536-544

Esteves A, Senorale M, Ehrlich R. (2003) A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research* 89, 501-2.

Etges FJ, Marinakis V. (1991) Formation and excretion of calcareous bodies by the metacestode (Tetrathyridium) of *Mesocestoides vogae*. *Journal of Parasitology* 77, 595-602.

Fernandez C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM. (2002) Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 122, 171-80

Fernández, V.; Ferreira, H. B.; Fernández, C.; Zaha, A.; Nieto, A. (1996) Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Molecular and Biochemical Parasitology* 77, 247-250,.

Ferreira A, Nieto A. (1992) Preliminary characterization of anticomplementary components of hydatid cyst fluid. *International Journal of Parasitology* 22, 113-5.

Ferreira A. M., Trecu T. and Reisin I. (1992) *Echinococcus granulosus*: study of the in vitro complement activation by protoscoleces by measuring the electric potential difference across the tegumental membrane. *Experimental Parasitology* 75, 259-68.

Ferreira AM, Irigoien F, Breijo M, Sim RB, Diaz A. (2000) How *Echinococcus granulosus* deals with complement. *Parasitology Today* 16, 168-72.

Freire T, Fernandez C, Chalar C, Maizels RM, Alzari P, Osinaga E, Robello C. (2004) Characterization of a UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase with an unusual lectin domain from the platyhelminth parasite *Echinococcus granulosus*. *Biochemical Journal*. 382, 501-10.

Frosch, P.; Hartmann, M.; Mühlischlegel, F.; Frosch, M. (1994) Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64, 171-175.

Galindo M., Gonzalez M. J. and Galanti N. (2002) *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biological Research*, 35; 365-371.

Gasser R. B. and Chilton, N. B. (2001) Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Veterinary Parasitology* 101, 201–213.

González, G.; Nieto, A.; Fernández, C.; Örn, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U. (1996) Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunology* 18, 587-596,

Gonzalez-Sapienza, G., Lorenzo, C. and Nieto, A. (2000). Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* Antigen B. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3979-3983.

Gonzalez-Sapienza G, Cachau RE. (2003) Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20179-84.

Greiner-M (1995) Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *Journal of Immunology Methods* 185, 145-146

Gutiérrez A. M., Kamenetzky L., Parra A., García G. E., Guarnera E. A. y Rosenzvit M. C. (2002) Cepas de *Echinococcus granulosus* y su importancia para el control de la hidatidosis en Argentina. Trabajo presentado en la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, primer premio del concurso "José M. Jorge".

Haag K. L., Araújo A. M., Gottstein B., Siles-Lucas M., Thompson R. C. A. and Zaha A. (1998) Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology* 118, 63-71

Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A, Ayala FJ. (2004) Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene*; 333: 157-67.

Haag KL, Zanotto P, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A, Ayala FJ. (2006a) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infection Genetics and Evolution* 6, 251-261.

Haag KL, Gottstein B, Muller N, Schnorr A, Ayala FJ. (2006b) Redundancy and recombination in the *Echinococcus* AgB multigene family: is there any similarity with protozoan contingency genes? *Parasitology* 133, 411-9.

Halton DW. (2004) Microscopy and the helminth parasite. *Micron* 35, 361-90.

Hirotsune S., Yoshida N., Chen A., Garrett L., Sugiyama F., Takahashi S., Yagami K., Wynshaw-Boris A. and Yoshiki A. (2003) An expressed pseudogene

regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423, 91-96.

Ito, A.; Ma, L.; Paul, M.; Stefaniak, J.; Pawlowski, Z. S. (1998) Evaluation of Em18-, Em16-, Antigen B-Western blots, Em2^{plus}-ELISA and four other tests for differential serodiagnosis of alveolar and cystic echinococcosis patients in Poland. *Parasitology International* 47, 95-99.

Janssen, D. & Barrett, J. (1995) A novel lipid-binding protein from the cestode *Moniezia expansa*. *Biochemical Journal* 311, 49-57.

Jenkins, D.J., Romig, T., Thompson, R.C. (2005) Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.--a global update. *International Journal for Parasitology* 35,1205-19.

Jenkins, D. J. (2006) *Echinococcus granulosus* in Australia, widespread and doing well! *Parasitology International* 55, S203-6.

Jones MK, Zhang LH, Leggatt GR, Stenzel DJ, McManus DP. (1996) The ultrastructural localization of *Echinococcus granulosus* antigen 5. *Parasitology*. 113, 213-22.

Kamenetzky L., Canova S. G., Guarnera E. A. and Rosenzvit M. C. (2000) *Echinococcus granulosus*: DNA extraction from germinal layers allows strain determination in fertile and non-fertile hydatid cysts. *Experimental Parasitology* 95,122-127.

Kamenetzky, L. , Gutierrez, A., M., Canova, S., G. ,Haag, K., H., Guarnera, E., A., Parra, A., García, G., E., Rosenzvit, M., C. (2002) Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 63, 1–8.

Kamenetzky, L. , Muzulin, P. M., Gutierrez, A. M, Angel, S. O., Zaha, A., Guarnera, E. A. and Rosenzvit, M. C. (2005) High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*, 131, 805-815.

Kassis AI, Tanner CE. (1976) The role of complement in hydatid disease: in vitro studies *International Journal of Parasitology* 6, 25-35.

Kassis AI, Tanner CE. (1977) Host serum proteins in *Echinococcus multilocularis*: complement activation via the classical pathway. *Immunology* 33, 1-9.

Kedra A.H., Swiderski Z., Tkach V. V., Dubinský P., Pawlowski Z., Stefaniak J. and Pawlowski J. (1999) Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitologica* 44 (4) 248-254

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244–1245.

Kumaratilake L. M., Thompson R. C. A. and Dunsmore J. D. (1983) Comparative strobilar development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin from different geographical areas of Australia *in vivo* and *in vitro*. *International Journal for Parasitology* 13, 151-156

Larrieu E., Mercapide C., Del Caprio M., Salvitti J., Costa M., Romeo S., Cantoni G., Perez A. And Thakur A. (1999) Evaluation of the losses produced by hydatidosis and cost-benefit analysis of different strategic interventions of control in the province of Río Negro, Argentina. *Archivos Internacionales de Hidatidosis* 33,122-128

Lascano EF, Coltorti EA, Varela-Diaz VM. (1975) Fine structure of the germinal membrane of *Echinococcus granulosus* cysts. *Journal of Parasitology* 61, 853-60.

Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, Hirvela-Koski V, Meri S. (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*. 127, 207-15.

Leggatt, G. R.; Yang, W.; McManus, D. P. (1992) Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 189-192.

Lessa E. P., Applebaum G. (1993) Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Molecular Ecology* 2, 119-29.

Li J., Zhang W.B., Loukas A., Lin R.Y., Ito A., Zhang L.H., Jones M., McManus D.P. (2004). Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. *Gene* 326, 157-165.

Lightowers, M. W. & Gottstein, B. (1995) Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. *In: Echinococcus and hydatid disease*. Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J. eds. CAB International, Wallingford, Oxon, 355-410.

Lightowers, M. W.; Liu, D.; Haralambous, A.; Rickard, M. (1989) Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 37, 171-182

Lightowlers MW, Heath DD. (2004) Immunity and vaccine control of *Echinococcus granulosus* infection in animal intermediate hosts. *Parassitologia*. 46, 27-31.

Lorenzo C, Last JA, Gonzalez-Sapienza GG. (2005a) The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* antigen 5 is determined by its post-translational modifications. *Parasitology* 131, 669-77.

Lorenzo C., Ferreira H., Monteiro K., Rosenzvit M., Kamenetzky L., García H., Vasquez Y., Naquira C., Sánchez E., Lorca M., Contreras M., Last J., González-Sapienza G. (2005b) Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind randomized multi-center study. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2764-2770

Lymbery, A. J. and Thompson, R. C. (1996). Species of *Echinococcus*: pattern and process. *Parasitology Today* 12, 486–491.

Magambo, J.; Njoroge, E.; Zeyhle, E. (2006) Epidemiology and control of echinococcosis in sub-Saharan Africa. *Parasitology International* 55, S193-5.

Maizels, R. M. and Kurniawan-Atmadja, A. (2002). Variation and polymorphism in helminth parasites. *Parasitology* 125, S25–S37.

Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, Yamasaki H, Lightowlers MW, Craig PS, Ito A. (2006) *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Experimental Parasitology*. 113, 75-82.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Markoski MM, Trindade ES, Cabrera G, Laschuk A, Galanti N, Zaha A, Nader HB, Ferreira HB. (2006) Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitology International* 55, 51-61.

Martinez C, Paredes R, Stock RP, Saralegui A, Andreu M, Cabezon C, Ehrlich R, Galanti N. (2005) Cellular organization and appearance of differentiated structures in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *Journal of Cell Biochemistry* 94, 327-35.

McManus & Bryant (1995) Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus* in *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. Páginas: 134-181.

McManus DP, Zhang L, Castrodale LJ, Le TH, Pearson M, Blair D. (2002) Short report: molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of *Echinococcus granulosus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 296-8

McManus, D.P., Zhang, W., Li J., Bartley, P.B. (2003) Echinococcosis. *Lancet* 362, 1295-304.

McVie A, Ersfeld K, Rogan MT, Craig PS. (1997) Expression and immunological characterisation of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. *Acta Tropica* 15, 19-35.

Monteiro KM, Scapin SM, Navarro MV, Zanchin NI, Cardoso MB, da Silveira NP, Goncalves PF, Stassen HK, Zaha A, Ferreira HB. (2006) Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochemistry and Biophysical Acta*. 17; in press

Moro, P., Schantz, P.M. (2006) Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitology International* 55,S181-6.

Morseth D. J. (1967) Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus*. *The Journal of Parasitology*, 53, 312-325.

Muzulin P. M., Kamenetzky L., Gutiérrez A.M Zaha A., Guarnera E. A., Rosenzvit M.C. (2007) Further analysis of genetic variability in *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Enviado a Experimental Parasitology*

Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. (2006) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes *Parasitology* 11, 1-10

Nei, M. and Gojobori, T. (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3, 418-426.

Noya O. and Noya B. A. (1998) The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunology Letters* 63, 53–56

Obwaller, A., Schneider, R., Walochnik, J., Gollackner, B., Deutz, A., Janitschke, K., Aspöck, H., Auer, H. (2004) *Echinococcus granulosus* strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology* 128, 569-75.

Oriol, R.; Williams, J. F.; Esandi, M. V. P.; Oriol, C. (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20, 569-574.

Ortona, E.; Riganò, R.; Margutti, P.; Notargiacomo, S.; Ioppolo, S.; Vaccari, S.; Barca, S.; Buttari, B.; Profumo, E.; Teggi, A.; Siracusano, A. (2000) Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunology* 22, 553- 559.

Pawlowski ID, Yap KW, Thompson RC. (1988) Observations on the possible origin, formation and structure of calcareous corpuscles in taeniid cestodes. *Parasitology Research*;74 293-6.

Pawloski Z, Mrozewicz B., Stefaniak J., Schantz P., Wilson M., Eckert J., Jacquier P., Haremski T., Nowosiwlski J. and Zieta B. (1993) *Echinococcus granulosus* pig strain from Poland has low infectivity to humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49 (supp.) 342-343

Poretti D, Felleisen E, Grimm F, Pfister M, Teuscher F, Zuercher C, Reichen J, Gottstein B. (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 193-8.

Profumo, E.; Ortona, E.; Riganó, R.; Gioia, I.; Notargiacomo, S.; Ioppolo, S.; Siracusano, A. (1994) Cellular and humoral responses to antigenic subunits of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunology* 16, 393-398.

Rickard, M. D.; Davies, C.; Bout, D. T.; Smyth, J. D. (1977) Immunohistological localisation of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (ovine and equine) and *E. multilocularis* using immunoperoxidase methods. *Journal of Helminthology* 51, 359-364.

Riganó, R.; Profumo, E.; Bruschi, F.; Carulli, G.; Azzara, A.; Ioppolo, S.; Buttari, B.; Ortona, E.; Margutti, P.; Teggi, A.; Siracusano, A. (2001) Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infection Immunity* 69, 288-296.

Rigano R, Buttari B, De Falco E, Profumo E, Ortona E, Margutti P, Scotta C, Teggi A, Siracusano A. (2004) *Echinococcus granulosus*-specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis. *Parasite Immunology* 26, 45-52.

Rodrigues JJ, Ferreira HB, Farias SE, Zaha A. (1997) A protein with a novel calcium-binding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237, 451-6.

Romig T., Dinkel A., Mackenstedt U. (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitology International* 55, S187-91.

Roratto, P., A., Bartholomei-Santos, M., L., Gutierrez, A., M., Kamenetzky, L., Rosenzvit, M., C. and Zaha, A. (2006) Detection of genetic polymorphism among and within *Echinococcus granulosus* strains by heteroduplex analysis of a microsatellite from the U1 snRNA genes. *Genetics and Molecular Research* , 5, 542-52.

Rosenzvit M. C., Zhang L-H, Kamenetzky L., Canova S. G., Guarnera E. A. and McManus D. P. (1999) Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118, 523-530

Rosenzvit MC, Zhang W, Motazedian H, Smyth D, Pearson M, Loukas A, Jones MK, McManus DP. (2006) Identification of membrane-bound and secreted

proteins from *Echinococcus granulosus* by signal sequence trap. International Journal of Parasitology 36, 123-130.

Rosenzvit, M. C., Canova, S. G., Kamenetzky, L. and Guarnera, E. A. (2001) *Echinococcus granulosus*: intraespecific genetic variation assessed by a DNA repetitive element Parasitology. 123,381-388

Rott, M. B.; Fernández, V.; Farias, S.; Ceni, J.; Ferreira, H. B.; Haag, K. L.; Zaha, A. (2000) Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica* 75, 331-340.

Rozas, J. and Rozas, R. (2001). DnaSP: DNA Sequence Polymorphism. Distributed by the authors, Department of Genetics, University of Barcelona, available at <http://www.bio.ub.es/~julio/DnaSP.html>.

Saboulard D, Lahmar S, Petavy AF, Bosquet G. (2003) The *Echinococcus granulosus* antigen EgA31: localization during development and immunogenic properties. *Parasite Immunology* 25, 489-501.

Saghir, N.; Conde, P. J., Brophy, P. M., Barrett, J. (2000) A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family. *FEBS Letters* 487, 181-184.

Saghir, N.; Conde, P. J.; Brophy, P. M.; Barrett, J. (2001) Biochemical characterisation of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Int. J. Parasitol.*; 31: 653-660.

Sako, Y.; Nakao, M.; Ikejima, T.; Piao, X. Z.; Nakaya, K.; Ito, A. (2000) Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-

molecular-weight antigen genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 4439-4444

Sánchez, F.; Garcia, J.; March, F.; Cardeñosa, N.; Coll, P.; Muñoz, C.; Auladell, C.; Prats, G. (1993) Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* of human origin. *Parasite Immunology* 15, 441-447.

Sánchez, F.; March, F.; Mercader, M.; Coll, P.; Muñoz, C.; Prats, G. (1991) Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunology* 13, 583-592.

Schantz, P. M., Chai, J., Craig, P. S., Eckert, J., Jenkins, D. J., Macpherson, C. N. L. and Thakur, A. (1995). Epidemiology and control of hydatid disease. In *Echinococcus and Hydatid Disease* (ed. Thompson, R. C. A. and Lymbery, A. J.), pp. 233–331. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. Pawlowski, Z. S.), pp. 1–19. World Organization for Animal Health, Paris, France.

Scott J. C. S., Stefaniak J., Pawlowski Z. S. and Mc Manus D. P. (1997) Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotype group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 114, 37-43

Shepherd, J.C., Aitken, A. and McManus, D. (1991). A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44, 81-90.

Siles-Lucas M, Gottstein B. (2003) The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends in Parasitology* 19, 575-80.

Smyth, J. D. & McManus, D. P. (1989) *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press, Cambridge

Snabel V., D' Amelio S., Mathipoulos K., Turcekova L. and Dubinsky P. (2000) Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. *Journal of Helminthology* 74, 177-181

Soong T. W., DeMaria C., D., Alvania R., S., Zweifel, L., S., Liang M., C., Mittman S., Agnew W., S. and Yue D. T. (2002) Systematic Identification of Splice Variants in Human P/Q-Type Channel 12.1 Subunits: Implications for Current Density and Ca²⁺-Dependent Inactivation *The Journal of Neuroscience* 22,10142-10152

Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*. 9, 1699-710.

Swofford D. L. (1998) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Thanaraj, T., A., & Clark F. (2001) Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Research*, 29 2581-2593

Thanh H. L., Blair D. a,d McManus D. P. (2000) Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Tropica* 77, 243-256

Thompson R. C. A. and Lymbery A. J. (1988). The Nature, Extent and Significance of Variation Within the Genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology* 27, 209-259.

Thompson R. C. A., Lymbery A. J. and Constantine C. C. (1995) Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Advances in Parasitology* 35, 145-176

Thompson RCA. (1995) Biology and Systematics of *Echinococcus*. In *Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. Páginas: 1-37.

Thompson, R. C. A. and McManus, D. P. (2001). Aetiology: parasites and life-cycles. In: *World Health Organization/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern* (Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.-X., Pawlowski, Z.S. Eds., pp. 1–19.

Thompson, R. C. and McManus, D. P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology* 18, 452–457.

Torgerson PR, Oguljahan B, Muminov AE, Karaeva RR, Kuttubaev OT, Aminjanov M, Shaikenov B. (2006) Present situation of cystic echinococcosis in Central Asia. *Parasitology International* 55, S207-12.

Varela-Diaz V. M., Coltorti E. A. (1972) Further evidence of the passage of host immunoglobulins into hydatid cysts. *Journal of Parasitology* 58, 1015-6.

Varela-Diaz V.M., Coltorti E. A. (1973) The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes. *Journal of Parasitology* 59, 484-8.

Vargas-Parada L, Lacleste JP. (1999a) Role of the calcareous corpuscles in cestode physiology: a review. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 4, 303-7.

Vargas-Parada L, Merchant MT, Willms K, Laclette JP. (1999b) Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitology Research* 85, 88-92.

Virginio, V.G., Hernandez, A., Rott, M.B., Monteiro, K.M., Zandonai, A.F., Nieto, A., Zaha, A. and Ferreira, H.B. (2003). A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clinical of Experimental. Immunology* 132, 309-315.

Von Brand T, Nylen MU. (1970) Organic matrix of cestode calcareous corpuscles. *Experimental Parasitology* 28, 566-76.

Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A. (2005) *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *International Journal of Parasitology* 35, 693-701.

Yarzabal, L. A.; Dupas, H.; Bout, D.; Naquira, F.; Capron, A. (1977) *Echinococcus granulosus*: the distribution of hydatid fluid antigens in the tissues of the larval stage. II. Localization of the thermostable lipoprotein of parasitic origin (Antigen B). *Experimental Parasitology* 42, 115-120.

Zarlenga, D. S.; Rhoads, M. L.; al Yaman, F. M. A. (1994) *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Molecular and Biochemical. Parasitology*; 67, 215-223

Zhang W, Li J, McManus D. (2003a) Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clinical of Microbiology Reviews* 16, 18-36.

Zhang W, You H, Li J, Zhang Z, Turson G, Aili H, Wang J, McManus DP. (2003b) Immunoglobulin profiles in a murine intermediate host model of

resistance for *Echinococcus granulosus* infection. *Parasite Immunology* 25, 161-8.

Zhang W, Li J, You H, Zhang Z, Turson G, Loukas A, McManus DP. (2003c) A gene family from *Echinococcus granulosus* differentially expressed in mature adult worms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126, 25-33.

Zurabian R, Carrero JC, Rodriguez-Contreras D, Willms K, Lacleste JP. (2005) Antigenic proteins associated with calcareous corpuscles of *Taenia solium*: partial characterization of a calcium-binding protein. *Archives of Medical Research*. 36, 4-9.