

# TABLA DE CONTENIDOS

---

<b>Capítulo 1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Echinococcus granulosus</i></b>	<b>1</b>
1.1.1. Ciclo de vida	1
1.1.2. El metacestodo de <i>E. granulosus</i> : el quiste hidático	2
1.1.3. La interfase hospedador-parásito en la hidalidosis: la pared del quiste hidático	5
1.1.4. Otras especies de <i>Echinococcus</i>	10
<b>1.2. La inflamación, con énfasis en una de las vías que la induce: el sistema complemento.</b>	<b>12</b>
1.2.1. Breve descripción de la respuesta inflamatoria	12
1.2.2. El sistema complemento	15
1.2.2.1 <i>Generalidades</i>	15
1.2.2.2 <i>Activación y regulación de la vía alterna del complemento</i>	19
<b>1.3. <i>Echinococcus granulosus</i> e inflamación</b>	<b>24</b>
1.3.1 Inmunobiología de la infección en el hospedador intermediario	24
1.3.2. <i>Echinococcus granulosus</i> y el sistema complemento	27
1.3.2.1. <i>Interacción del complemento con las formas infectantes del parásito</i>	27
1.3.2.2. <i>Interacción del complemento con el metacestodo</i>	29
<b>1.4. <i>myo</i>-Inositol hexakisfosfato (IP6)</b>	<b>32</b>
1.4.1. Derivados fosforilados del <i>myo</i> -inositol	32
1.4.2. Estructura del IP6 y su interacción con cationes	36
1.4.3. Localización y metabolismo del IP6	40
1.4.4. Actividades descritas para el IP6	44
<b>1.5. Objetivos de esta tesis</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo 2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>49</b>
<b>2.1. Reactivos generales</b>	<b>49</b>

<b>2.2. Fuentes de complemento humano</b>	50
2.2.1. Suero humano normal (SHN)	50
2.2.2. Plasma humano normal (PHN)	50
<b>2.3. Componentes del C purificados</b>	51
2.3.1. C3, C3(NH <sub>2</sub> ) y C3b	51
2.3.2. Radiomarcado de C3 y C3b con <sup>125</sup> I	52
2.3.2.1. <i>Marcado de las proteínas</i>	52
2.3.2.2. <i>Control de la preparación de <sup>125</sup>I-C3</i>	52
2.3.3. Preparación de factor D funcionalmente pura	53
2.3.4. Factor B	54
2.3.5. Factor H y factor I	54
<b>2.4. Materiales y extractos parasitarios</b>	54
2.4.1. PQH, PE y LH de quistes de origen bovino	54
2.4.2. Extractos de PQH bovinos pulverizadas	55
2.4.2.1. <i>Extracto para la purificación del IP6</i>	55
2.4.2.2. <i>Extracción en paralelo en presencia o ausencia de EDTA</i>	55
2.4.3. Extractos de capas laminar y germinativa de PQH bovinos	56
2.4.4. Extracto de PE	56
2.4.5. Quistes pequeños: murinos y bovinos hijos	57
2.4.6. Extractos de quistes pequeños	57
2.4.6.1. <i>Extracción secuencial</i>	57
2.4.6.2. <i>Extracción de quistes murinos "desde adentro"</i>	58
2.4.6.3. <i>Extracción en paralelo en presencia o ausencia de quelantes</i>	58
2.4.7. Extracto de adultos	59
2.4.8. Extracto de PQH de <i>E. multilocularis</i>	59
<b>2.5. Métodos generales de bioquímica de proteínas</b>	59
2.5.1. Estimación de la concentración	59
2.5.2. SDS-PAGE	59
2.5.3. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)	60
2.5.4. <i>Western blotting</i>	60
2.5.4.1. <i>Detección de factor B humano</i>	61
2.5.4.2. <i>Detección de factor H bovino</i>	61
2.5.4.3. <i>Detección de ciclofilina A (CyPA) de E. granulosus</i>	61
2.5.4.4. <i>Detección de P-29 de E. granulosus</i>	61
2.5.5. Diálisis	62

<b>2.6. Métodos cromatográficos</b>	62
2.6.1. Intercambio aniónico en FPLC y BioPilot	62
2.6.2. Gel filtración en FPLC	62
2.6.3. Gel filtración en sistemas de baja presión	63
<b>2.7. Métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos</b>	63
2.7.1. Cuantificación de fosfato en muestras orgánicas	63
2.7.2. Determinación de azúcares reductores	64
2.7.3. Oxidación de <i>cis</i> -dioles vecinales	64
2.7.4. Desfosforilación por hidrólisis con ácido fluorhídrico	65
2.7.5. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	65
2.7.5.1. NMR de protón (NMR- <sup>1</sup> H)	65
2.7.5.2. NMR de carbono 13 (NMR- <sup>13</sup> C)	65
2.7.5.3. NMR de fósforo 31 (NMR- <sup>31</sup> P)	66
2.7.5.4. Espectroscopía bidimensional (COSY y HMQC)	66
2.7.6. Espectrometría de masa (MS)	66
2.7.6.1. Ionización por electrospray (ESI-MS)	66
2.7.6.2. Ionización por luz asistida por matriz (MALDI)	66
2.7.6.3. Identificación de proteínas por digestión trípica y MALDI-TOF-MS	67
2.7.7. Cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa (GLC-MS)	67
2.7.8. Cromatografía gas-líquido	67
2.7.9. Cromatografía en capa fina (TLC) de inositoles polifosfato	68
2.7.10. Cuantificación de IP6 utilizando TLC y densitometría	68
2.7.11. Cuantificación de Ca y Mg por absorción atómica	69
<b>2.8. Métodos utilizados en la localización del IP6 en la pared del quiste</b>	69
2.8.1. Microscopía con filtro para pérdida de energía electrónica (EELS)	69
2.8.1.1. Preparación de las muestras	69
2.8.1.2. Obtención de imágenes por EELS	70
2.8.2. Purificación del elemento granular de la CL	70
2.8.2.1. Obtención del extracto de partida	70
2.8.2.2. Ultracentrifugación	71
<b>2.9. Ensayos relacionados al sistema complemento</b>	72
2.9.1. Ensayos de activación del complemento en suero humano normal	72
2.9.1.1. Ensayo básico	72
2.9.1.2. Ensayo hemolítico	72
2.9.1.3. Activación del C por quistes murinos enteros	73

2.9.2. Ensayo de formación de la convertasa de C3 de la VA a partir de componentes purificados	73
2.9.2.1. Ensayo básico	73
2.9.2.2. Estudio de la competencia entre el inhibidor y C3(NH <sub>2</sub> ) por la unión a f.B	74
2.9.3. Ensayo de actividad de la convertasa de C3 de la VA	74
2.9.4. Ensayo de inactivación proteolítica de C3b por los factores H e I	75
2.9.5. Experimentos utilizando el BIACORE	75
2.9.5.1. Inmovilización de las proteínas	76
2.9.5.2. Estudio de la interacción analito-ligando	76
2.9.5.3. Inhibición de la interacción f.B-C3b y f.H-C3b	77
2.9.6. Cuantificación del complejo de los componentes terminales (TCC)	77
<b>Capítulo 3. PURIFICACION E IDENTIFICACION DE IP6 EN LA PARED DEL QUISTE HIDATICO</b>	79
3.1. La actividad se purifica de la PQH mediante cromatografías sucesivas de intercambio aniónico y gel filtración	79
3.2. El componente responsable de la actividad es el <i>myo</i> -inositol hexakisfosfato	81
3.2.1. Caracterización preliminar	81
3.2.2. Elucidación estructural	83
3.2.2.1. Espectroscopía de NMR del componente purificado	83
3.2.2.2. Análisis de la molécula desfosforilada	86
3.2.3. Confirmación de la estructura	88
<b>Capítulo 4. DETERMINACION DE LA LOCALIZACION DEL IP6 EN <i>Echinococcus granulosus</i></b>	92
4.1. En la PQH el IP6 se encuentra insolubilizado por interacción con calcio	92
4.2. El IP6 es un componente intrínseco de la PQH	95
4.3. En la PQH, el IP6 se encuentra mayoritariamente en forma extracelular	96
4.4. El IP6 es el único componente del parásito que se extrae en forma abundante de la PQH con EDTA	104

4.5. En la capa laminar, el IP6 se encuentra asociado con $Ca^{++}$ en gránulos de tamaño definido	106
4.6. El IP6 se acumula únicamente en la interfase <i>E. granulosus</i> -hospedador	109
<b>Capítulo 5. ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL IP6 CON LA VIA ALTERNA DEL COMPLEMENTO</b>	111
<b>5.1. Caracterización de la actividad de inhibición del complemento:</b>	
<b>i) Estudios anteriores a la identificación del IP6</b>	
5.1.1. La molécula del parásito inhibe la activación de la VA en suero humano normal	112
5.1.2. El inhibidor interfiere a distintos niveles en el proceso de activación de la VA	113
5.1.2.1. Efecto sobre la formación de la convertasa de C3	114
5.1.2.2. Efecto sobre la convertasa de C3 ya formada	114
5.1.2.3. Efecto en la actividad de f.H sobre la convertasa de C3	115
5.1.2.4. Efecto sobre la inactivación de C3b mediada por f.H y f.I	116
5.1.2.5. Análisis global de los ensayos con componentes purificados	116
5.1.3. El inhibidor se une a f.B y f.H en presencia de $Ni^{++}$ , y bloquea la interacción de éstos con C3b	117
5.1.3.1. El fenómeno de SPR en el estudio de interacciones moleculares	117
5.1.3.2. Interacción del inhibidor con C3b, f.B y f.H	118
5.1.3.3. Interacción de f.B y f.H con C3b en presencia del inhibidor	119
5.1.3.4. Análisis conjunto de los estudios por BIACORE y los ensayos funcionales	120
<b>5.2. Caracterización de la actividad de inhibición del complemento: ii)</b>	
<b>Estudios posteriores a la identificación del IP6</b>	
5.2.1. La interacción del IP6 con cationes divalentes puede estar involucrada en la actividad de inhibición del C	121
5.2.1.1. Consideraciones generales	121
5.2.1.2. La situación en presencia de $Mg^{++}$	121
5.2.1.3. La situación en presencia de $Ni^{++}$	122
5.2.2. El IP6 insoluble inhibe la activación del C sólo en presencia de $Ni^{++}$	124
	126

5.3. El IP6 de la capa laminar no sería determinante en el control de la activación del complemento por el quiste	127
<b>Capítulo 6. DISCUSION GENERAL</b>	129
<b>6.1. Discusión en relación a los objetivos iniciales del trabajo</b>	129
6.1.1. Control de la activación de la VA por la PQH	129
6.1.2. Bioquímica de la interacción entre el IP6 y las proteínas del complemento	132
6.1.3. Cumplimiento de los objetivos iniciales de la tesis	135
<b>6.2. Aportes de la tesis a la biología de <i>E. granulosus</i></b>	136
6.2.1. Estructura de la capa laminar de <i>E. granulosus</i>	136
6.2.2. Papel del IP6 en la pared del quiste de <i>E. granulosus</i>	137
6.2.3. Proteínas del hospedero en la interfase con el parásito	140
6.2.3.1. El IP6 en la pared del quiste y las proteínas del hospedero que se unen a glicosaminoglicanos	140
6.2.3.2. SAP, MRP-8 y MRP-14 en paredes de quistes murinos	141
<b>6.3. Aportes de la tesis al conocimiento del IP6</b>	143
6.3.1. Interacción del IP6 con cationes polivalentes	143
6.3.2. Aspectos prácticos	143
6.3.2.1. Comportamiento en gel filtración y diálisis	143
6.3.2.2 Estimación de la concentración	145
6.3.3. Metabolismo y biología celular del IP6	145
<b>6.4. La tesis en perspectiva</b>	147
<b>REFERENCIAS</b>	149