

TREMATODIASIS

Caracterización morfológica y molecular de *Lymnaeidae* (Gastropoda: Hygrophila) de la región neotropical

Ana C. Correa¹, Juan S. Escobar², Óscar Noya³, Luz E. Velásquez⁴, Carolina González-Ramírez⁵, Sylvie Hurtrez-Boussès^{1,6}, Jean-Pierre Pointier⁷

¹ Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle Centre, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France

² Institut des Sciences de l'Evolution, Université Montpellier, Montpellier, France

³ Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela y Centro para Estudios sobre Malaria, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas, Venezuela

⁴ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁵ Laboratorio de investigaciones Parasitológicas "Dr. Jesús Moreno Rangel", Cátedra de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

⁶ Département de Biologie-Ecologie, Faculté des Sciences, Université Montpellier, Montpellier, France

⁷ CRIOBE Université de Perpignan, Perpignan, France

Introducción. Los moluscos de la familia *Lymnaeidae* desempeñan un papel crucial en la transmisión de la fascioliasis, una enfermedad de importancia médica y veterinaria causada por *Fasciola hepatica* (Digenea: Fasciolidae). Este grupo de moluscos presenta una gran diversidad en la morfología de la concha y una estasis morfológica en caracteres, como la anatomía del sistema reproductor. La taxonomía clásica se ha basado en estos caracteres generando una gran confusión en la sistemática de *Lymnaeidae*.

El objetivo del estudio fue estudiar la diversidad de los moluscos de la familia *Lymnaeidae* presentes en el neotrópico.

Materiales y métodos. Se recolectaron muestras de 14 especies de *Lymnaeidae*, incluyendo siete de las ocho especies consideradas como válidas en el neotrópico y una "nueva" especie, *Lymnaea* sp., en 27 poblaciones. Las muestras se conservaron en alcohol al 80 % para los análisis de ADN. Además, una parte de los individuos recolectados

en el neotrópico (excepto *Lymnaea diaphana*) se conservaron en Railliet-Henry para el análisis de la morfología del sistema reproductor. El análisis filogenético se basó en secuencias de ADN (cuatro genes concatenados representando 2.966 sitios alineados). Utilizando el máximo de verosimilitud y el método de probabilidad posterior. La morfología del sistema reproductor se analizó mediante un análisis de componentes principales.

Resultados. Nuestros resultados muestran claramente que los rasgos morfológicos no discriminan correctamente las especies similares fenotípicamente. Los métodos moleculares atribuyen los individuos a una u otra especie de forma inequívoca. Finalmente, nuestros resultados muestran que el taxón encontrado en Colombia, Venezuela, España y la isla Reunión (*Lymnaea* sp.) está estrechamente relacionado con *Galba truncatula*, *Lymnaea cubensis*, *L. neotropica* y *L. viatrix* pero es claramente otra entidad genética.

Conclusión. Podemos concluir que los caracteres morfológicos son insuficientes para identificar especies estrechamente relacionadas y se deben utilizar métodos moleculares para una correcta diferenciación de estas especies.

• • •

Respuesta inmunitaria protectora, localización y expresión diferencial de un miembro de la familia de las saposinas de *Fasciola hepatica*

Ana M. Espino, Kimberly Cabán-Hernández, Francheska Rivera

Laboratorio de Inmunología y Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Escuela de Medicina, Universidad de Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico

Introducción. Recientemente nuestro laboratorio identificó una nueva proteína de *Fasciola hepatica* (FhSAP2) perteneciente a la familia de las saposinas. Cuando FhSAP2 se administra por vía subcutánea en adyuvante de Freund induce altos niveles de protección contra *F. hepatica* en ratones y conejos.

El objetivo del presente estudio fue investigar si FhSAP2 podría inducir inmunidad protectora cuando se administra con adyuvantes menos inflamatorios, tales como Montanide-ISA720 o QS21. Además, para explorar el rol de FhSAP2

nos propusimos estudiar su expresión diferencial y localización en diferentes estadios del ciclo biológico de *F. hepatica*.

Materiales y métodos. Se vacunaron grupos de 10 ratones BALB/c, 3 veces con 20 µg de FhSAP2 en ISA720 o QS21. Los animales vacunados con PBS en ISA720 o QS21 sirvieron de controles positivos. Cuatro semanas después de la última inyección, los animales fueron infectados con 5 metacercarias y 45 días más tarde fueron sacrificados. Se estudió la respuesta humoral y celular, y se correlacionaron con la carga parasitaria. Se obtuvieron miracidios, juveniles y adultos, de *F. hepatica* que fueron fijados con paraformaldehído al 4 % y utilizados para llevar a cabo las reacciones de inmunohistoquímica. Se hicieron extracciones de ARN y se optimizó la técnica de amplificación por PCR en tiempo real para estudiar la expresión diferencial de la proteína en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito.

Resultados. FhSAP2-QS21 indujo 50 % de protección y FhSAP2-ISA720, 62,5 %. La protección se asoció con altos niveles de IgG_{2a}, IFN γ y TNF α . Demostramos que FhSAP2 se expresa diferencialmente en el tegumento de adultos y forma juveniles de *F. hepatica*.

Conclusiones. Los elevados niveles de protección obtenidos y la localización específica de esta proteína sugieren que FhSAP2 podría ser un importante blanco para el desarrollo de vacunas y medicamentos.



Compatibility polymorphism in snail-schistosome interactions: from populations and theory, to molecular mechanisms

André Theron, Benjamin Gourbal, Guillaume Mitta
Ecologie et Evolution des Interactions, Université de Perpignan, Perpignan, France

Introduction. Coevolutionary dynamics in host-parasite interactions potentially lead to an arms race which resulted in compatibility polymorphism. The mechanisms underlying compatibility have remained largely unknown in the interactions between the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*, one of the agents of human schistosomiasis.

We present a combination of data obtained from field and laboratory studies on snail susceptibility and parasite infectivity arguing in favour of a Matching-Phenotype-Model (MPM) to explain compatibility polymorphism observed in *S. mansoni/B. glabrata*

combinations and its underlying molecular mechanisms.

Materials and methods. Snails and schistosome miracidia directly collected in the field were used to determine the compatibility level in field populations. Snails and schistosomes from the same locality were then used to establish laboratory strains and to test their level of compatibility in such conditions. A comparative molecular and proteomic approach between compatible and incompatible strains of *S. mansoni* toward the same *B. glabrata* host strain was performed.

Results. There is a large difference between compatibility level observed under wild vs laboratory conditions. The drop in compatibility observed after laboratory passages may result from a more severe genetic bottleneck in the parasite than the host. A matching-phenotype-model based on a system of self/non-self recognition or mimicry molecules may explain the various levels of compatibility observed in the field and in the lab. Investigations on the molecular determinants of compatibility have revealed in *S. mansoni*, a repertoire of polymorphic and diversified antigens called SmPoMuc (for *S. mansoni* Polymorphic Mucins) that have been shown to interact with known Fibrinogen-related Proteins (FREPs) immune receptors of the intermediate snail host *B. glabrata*.

Conclusion. We hypothesize their interactions define the compatible/incompatible status of a specific snail/schistosome combination.



Efecto de la edelfosina durante la fase profiláctica de la infección con *Schistosoma mansoni*

Edward Yepes^{1,2}, Rubén E. Varela^{2,3}, Julio López-Abán¹, José Rojas-Caraballo¹, Faustino Mollinedo³, Antonio Muro¹

¹Laboratorio de Inmunología y Parasitología Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

²APOINTECH, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Villamayor, Salamanca, España

³Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, España

Introducción. Se estima que 207 millones de personas en el mundo tienen esquistosomiasis, parasitosis causada por trematodos del género *Schistosoma*. Existen pocas alternativas terapéuticas al prazicuantel, fármaco de primera elección, y se ha encontrado resistencia al compuesto en algunos países. Esta situación terapéutica hace necesario

buscar nuevas alternativas farmacológicas. Los alquil-lisofosfolípido son compuestos de apoptosis en células tumorales y en parásitos. Este trabajo estudia el efecto profiláctico de la edelfosina en ratones infectados con *S. mansoni*.

Materiales y métodos. Se distribuyeron 45 ratones CD1 en cinco grupos: no infectados no tratados (G0), grupo infectado no tratado (G1) y tres grupos infectados tratados con prazicuantel (G2), edelfosina (G3) y prazicuantel más edelfosina (G4), compuestos suministrados por vía oral tres días antes y cinco días después de infectarlos con 150 cercarias. Con las muestras recolectadas se efectuaron estudios parasitológicos, hematológicos e inmunológicos. En el análisis estadístico se utilizó ANOVA y el porcentaje de reducción se calculó con la siguiente fórmula: (media del grupo no tratado – media del grupo tratado) x 100/media del grupo no tratado.

Resultados. El G2 presentó (35 %) de reducción de vermes adultos frente al G3 y G4 en los que se obtuvo 52 %. En los huevos por gramo de tejido no hubo reducción comparando los grupos G2, G3 y G4 con G1, pero sí entre el (G2=20.870) y (G4=11.020) del 47 % en hígado. El número de eosinófilos y basófilos disminuyó estadísticamente ($p < 0,006$) y ($p < 0,003$) en el G3 comparado con G1, mientras que la respuesta contra antígenos somáticos de *Schistosoma mansoni* de IgG1 e IgG2a fue menor en G3.

Conclusiones. La edelfosina disminuye significativamente la carga parasitaria frente al prazicuantel, y la combinación prazicuantel más edelfosina fue la más efectiva. La disminución de eosinófilos, basófilos e inmunoglobulinas del tipo IgG1 e IgG2a, correlacionó con la disminución de la carga parasitaria ocasionada por la edelfosina.



Diferenciación específica de limneidos en Colombia, utilizando el gen de la citocromo oxidasa I

Luz Velásquez^{1,2}, Rafael J. Vivero¹, Rafael Villareal¹, Claudia Guzmán¹, Catalina Gómez¹, Érica Alarcón¹, Andrea Fernández³, Natalia Gómez³, Wilda Becerra⁴

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

⁴ Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia

Introducción. *Fasciola hepatica*, digeneo registrado en Colombia por más de un siglo, es frecuente en animales bovinos y ovinos, y escaso en cerdos

y personas. La identidad de tres huéspedes intermediarios se estableció hasta el 2008, por análisis de anatomía interna y la concha: *Lymnaea columella*, *L. cousini* y *L. truncatula* (= *Galba truncatula*). Los estudios posteriores demostraron la presencia de otra especie con morfología indistinguible de esta última.

Esta investigación buscaba resolver el conflicto taxonómico por medio del análisis de secuencias mitocondriales de limneidos de diversas regiones de Colombia.

Materiales y métodos. Se incluyeron 73 secuencias de limneidos (11 del Genbank, 62 de 15 poblaciones de Colombia). El ADN total se aisló de músculo del pie; se amplificó un segmento de 710 pb del gen de la citocromo oxidasa I, utilizando los oligonucleótidos LCO1490-HCO2198. Las secuencias fueron sometidas a alineamiento múltiple, luego se evaluaron la variabilidad nucleotídica, las distancias genéticas K2P y se generó un dendrograma por el método de *neighbour joining*.

Resultados. Se obtuvo un fragmento mitocondrial de nucleótidos de 623 pb del gen de la citocromo oxidasa I. El análisis global de la variabilidad generó 167 (26,80 %) sitios polimorfos y 157 (22,5 %) sitios parsimoniosamente informativos. En las 15 poblaciones de limneidos de Colombia se dedujeron 7 haplotipos mitocondriales. El rango de distancia genética intraespecífica K2P 0,002-0,045 para el morfotipo 1 (Norte de Santander) permite asignarla como *Galba truncatula*; el morfotipo 2 (Apartadó) se categorizó como *Lymnaea cubensis* con distancias K2P 0,002-0,005. En tanto que el morfotipo 3 (Antioquia y Cauca) no presentó asociación genética al compararse con los otros limneidos (K2P 0,109-0,151), lo que sugiere que corresponde a una especie no descrita. Las agrupaciones obtenidas resuelven el estatus específico de tres morfotipos con un *bootstrap* del 99 %.

Conclusión. Se sugiere considerar el análisis del gen de la citocromo oxidasa I, como método rápido, confiable y sencillo para diferenciar especies de limneidos indistinguibles por morfología. El disponer de esta información permite diseños más exactos de los modelos predictivos de fascioliasis, entre otras opciones.



Clonación, expresión y caracterización molecular de una catepsina I de *Fasciola hepatica*

Mónica Uruburu¹, Luz Elena Velásquez^{1,2}, Sergio Pulido¹, Sara Robledo^{1,3}

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La fascioliasis, parasitosis causada por *Fasciola hepatica*, deteriora la salud de rumiantes y personas en todo el mundo y es adquirida por la ingestión de vegetales y aguas contaminados con metacercarias.

En Colombia, el parásito afecta al 25 % de los animales bovinos de producción lechera, generando pérdidas anuales por \$ 12.483 millones, pues reduce la producción de leche y carne, obliga al decomiso de hígados infectados y disminuye la fertilidad de los animales. En algunos hatos de Antioquia la prevalencia supera el 40 %.

El diagnóstico coproparasitológico utilizado actualmente es poco sensible y eficiente, dada la cantidad de animales por muestrear. Las técnicas serológicas que utilizan antígenos de excreción y secreción presentan reacción cruzada con otros parásitos; además, la obtención de estos antígenos es laboriosa. La producción de antígenos recombinantes se propone como una alternativa diagnóstica, pues ofrecen mayor sensibilidad y especificidad, y el antígeno se puede producir a gran escala de forma controlada con alta pureza.

Objetivo. Producir una catepsina L recombinante de *F. hepatica* en un sistema de expresión procarionte.

Métodos. El gen de la catepsina L de *F. hepatica* se amplificó, clonó en el vector pET28a y se confirmó por secuenciación y análisis filogenético. La proteína recombinante se produjo en un sistema de expresión heterólogo y verificado por SDS-PAGE y se evaluó su reactividad por Western blot.

Resultados. Se clonó la catepsina L recombinante de *F. hepatica* a partir de aislamientos locales; se demostró la expresión de un péptido del tamaño esperado y se determinó su reacción frente a sueros de bovinos infectados.

Conclusiones. Se reporta por primera vez en Colombia la producción de un antígeno recombinante de *F. hepatica*. Con la proteína obtenida se evaluará su utilidad para diagnosticar la fascioliasis bovina en Antioquia, constituyendo un importante avance hacia la implementación de estrategias de control y prevención de esta trematodiasis.

• • •

Interacción de los productos de excreción y secreción de *Fasciola hepatica* con los receptores tipo *toll* de macrófagos humanos

Olgary Figueroa-Santiago, Ana M. Espino
Laboratorio de Inmunología y Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Escuela de Medicina, Universidad de Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico

Introducción. Durante las primeras etapas de la infección, *Fasciola hepatica* secreta moléculas conocidas como productos de excreción y secreción. Estos productos son capaces de modular la respuesta inmunológica del huésped mamífero resultando en una polarización hacia el fenotipo Th2, lo cual le permite al parásito sobrevivir dentro del huésped, completar su desarrollo y establecer una infección crónica. Para poder entender este sofisticado mecanismo de evasión es necesario conocer las interacciones que tienen lugar entre los antígenos del parásito y los receptores tipo *toll* presentes en las células presentadoras de antígeno.

El objetivo del presente estudio fue identificar los receptores tipo *toll* que intervienen en esta interacción.

Materiales y métodos. Se fraccionaron los productos de excreción y secreción de *F. hepatica* en rangos de peso molecular empleando técnicas de ultrafiltración. Se utilizó la línea celular THP1-CD14, la cual es derivada de monocitos humanos y que expresa constitutivamente todos los receptores tipo *toll*. En el primer experimento las células fueron expuestas a cada antígeno y se midió la capacidad de activación mediante la determinación cuantitativa del factor de transcripción NF- κ B. En el segundo experimento, las células fueron primero expuestas a los antagonistas y luego estimuladas con los antígenos. Reducciones mayores del 40 % en la activación de NF- κ B fueron consideradas como un indicativo de interacción específica entre el antígeno y un determinado receptor tipo *toll*.

Resultados. Demostramos que todas las fracciones de los productos de excreción y secreción activan NF- κ B. Los productos de excreción y secreción mayores de 10 y de 30 kDa y los productos de excreción y secreción mayores de 30 y de 100 kDa activan NF- κ B por medio de la interacción con TLR2 y TLR4. Las células estimuladas con los productos de excreción y secreción mayores de 10 y de 30 kDa secretaron muy bajos niveles de NO y altos niveles de arginasa lo cual es indicativo de una activación de macrófagos por vía alterna (AAM Φ).

Conclusiones. Nuestros resultados sugieren que en los productos de excreción y secreción

de *F. hepatica* polarizan la respuesta inmune de los humanos hacia Th2 mediante la activación de AAMΦ, posiblemente, mediante la interacción con TLR2 y TLR4.



Búsqueda activa de casos de paragonimiasis en comunidades indígenas de Colombia

Leidy Puerta, Lina Salazar, Luz Velásquez, Iván Vélez
Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La paragonimiasis, infección causada por trematodos del género *Paragonimus*, se adquiere consumiendo metacercarias del parásito en crustáceos dulciacuícolas. La sintomatología similar a la de tuberculosis dificulta su diagnóstico. En Colombia, la mayoría de pacientes han sido identificados en Antioquia y Chocó mediante la búsqueda activa de casos, siendo los indígenas embera los más afectados, por su costumbre de consumir cangrejos crudos y semicocidos.

El conocer la prevalencia de esta enfermedad permitirá que se tenga en cuenta como diagnóstico diferencial en pacientes con factores de riesgo asociados a la infección.

Materiales y métodos. Se realizó búsqueda de casos en indígenas tosedores de las etnias embera de Chigorodó y El Carmen de Atrato y kogui del municipio de Dibulla, además, en instituciones de salud de Medellín.

Para buscar huevos de *Paragonimus* se analizaron muestras de esputo y heces. Las de esputo se concentraron con hidróxido de sodio. Las heces se analizaron mediante coprológico directo y por la técnica de sedimentación de Lumberas.

En las comunidades se buscaron cangrejos y moluscos huésped de *Paragonimus*.

Resultados. En campo se recolectaron 323 muestras; en ninguna se observaron huevos. En las instituciones de salud se obtuvieron 200 muestras entre las que se diagnosticaron tres indígenas embera con paragonimiasis remitidos con diagnóstico presuntivo de tuberculosis. No se recolectaron caracoles, pero sí varias especies de cangrejos negativos para metacercarias del digeneo.

Conclusiones. Aunque hay paragonimiasis en poblaciones indígenas de Colombia, las dificultades de acceso a sus asentamientos y la falta de información sobre la enfermedad se conjugaron para impedir un diagnóstico correcto y oportuno desde el primer nivel de atención, suministrándose

tratamiento para otras patologías y, al no observarse mejoría, obligan al paciente a desplazarse a niveles superiores de atención, con deterioro de la salud del paciente, gastos innecesarios para él y sus familiares y sobrecostos en el sistema de salud.



Relationship between exposure eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni* of the LD₅₀ *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex and reproductive biology of infected *Biomphalaria glabrata*

Ronaldo de Carvalho Augusto^{1,2}, Gabriela Friani Vieira², Maurício de Carvalho Vasconcelos³, Clélia Christina Mello-Silva², Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues¹

¹ Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

² Laboratório de Esquistossomose Experimental, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

³ Laboratório de Avaliação e Pesquisa em Sanidade Ambiental, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

Introduction. Schistosomiasis is a chronic, debilitating illness and major public health problems in the world. The WHO recommends the combined action of chemotherapy and molluscicide application to reduce the prevalence and morbidity. The synthetic compound Bayluscide WP 70® is used in control programs on a large scale; however this product is expensive, toxic effects on non-target organisms and as a consequence of the exclusive use of this compound, some populations clam with resistance. In this sense, research for the discovery of biodegradable compounds has been stimulated. Among the natural products surveyed, *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii* presents the most promising results as a product for use in controlling large scale.

The present study aimed at assessing the effects of exposure to LD₅₀ latex of this compound on egg and / or miracidia of *Schistosoma mansoni* in reproduction and mortality of *Biomphalaria glabrata* during the pre-patent

Materials and methods. Therefore, four groups of 30 snails in each were infected individually with 6-8 miracidia. In order to simulate the forms of contact with eggs and miracidia with latex at the time of its application in the field were set out three situation: Group 1 - eggs hatch in water and individual infection of snails in the presence of latex; Group 2 – eggs hatch in the presence of latex and individual infection in the presence of water and Group 3 – The process of hatching eggs and individual infection in the presence of aqueous extract of latex. Group 4 -

eggs and kept in miracidia (negative control)

Results. During the pre-patent period, the group 4 showed survival rates 27.3% lower than the control group. As for reproductive activity were not statistical differences between the control and experimental groups

Conclusions. The LD50 of the latex can be used as an alternative method of controlling populations of *B. glabrata* in the field and consequently as schistosomiasis control.

