

Parasitología molecular

TOXOPLASMOSIS

Búsqueda de genes de virulencia de *Toxoplasma gondii* en cepas de diferentes tipos de clones y muestras clínicas: el caso de ROP16, resultados preliminares

Catalina Álvarez¹, Claudia Herrera¹, Jorge Enrique Gómez²

¹ Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo Parasitología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. *Toxoplasma gondii* es un parásito protozoario intracelular obligado, que presenta una fuerte interacción con su huésped. La proteína codificada por el gen *ROP16* ha mostrado jugar un papel muy importante en el proceso de invasión y afecta la fosforilación de STAT3/6, la producción de citocinas e IL-12, en el huésped, modulando así rutas de señalización.

El objetivo de este estudio fue evaluar el gen *ROP16* como posible marcador de virulencia en muestras de pacientes con toxoplasmosis y cepas de diferentes tipos clonales.

Materiales y métodos. Se estandarizó una PCR convencional con el fin de amplificar un fragmento del gen *ROP16* en muestras clínicas y cepas de diferentes tipos clonales. Se diseñaron iniciadores específicos empleando los programas *Gene Runner* V.3.01 y *Primer 3*, sobre la región 1216pb a 1652pb. Se corroboró con una PCR *in silico* (programa FastPCR) la especificidad de los iniciadores en las 17 secuencias reportadas de *ROP16* en la base de datos de GenBank. Se evaluaron 209 muestras clínicas positivas para anticuerpos IgG-anti-*T. gondii* y una parasitosis confirmada mediante qPCR para el gen *RE*, *B1* o ambos. También, se evaluaron seis cepas de referencia pertenecientes a los tres tipos clonales.

Resultados y conclusiones. De las 209 muestras clínicas evaluadas, 22 presentaron la banda del producto esperado para la PCR convencional de 437 pb. Todas las cepas de referencia de los tres tipos clonales presentaron la banda esperada. Los productos de amplificación serán sometidos a secuenciación directa mediante ambos iniciadores,

con el fin de corroborar el blanco deseado y buscar polimorfismos que pudiesen estar asociados al desarrollo de ciertas formas clínicas de toxoplasmosis. Este estudio corresponde a la primera evaluación del gen *ROP16* como marcador de virulencia en muestras clínicas con el fin de elucidar relaciones huésped-parásito en el modelo de toxoplasmosis humana.

• • •

Estandarización de un análisis *multilocus* que incluyen espaciadores transcritos internos (ITS) en *Toxoplasma gondii*

John Alejandro Acosta, Aylan Farid Arenas, Jorge Enrique Gómez

Grupo de Estudio en Parasitología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. *Toxoplasma gondii* es un parásito de amplia distribución, que posee un ciclo de vida complejo y que puede infectar a la mayoría de vertebrados en el mundo. A pesar de poseer esta flexibilidad de infección y transmisión, el parásito posee una diversidad baja y se clasifica en tres linajes de clones denominados I, II, III, de acuerdo con los marcadores moleculares clásicos y el grado de virulencia, aunque en los últimos años se ha observado una mayor diversidad gracias al uso de nuevas herramientas moleculares, como la secuenciación para identificar (SNP).

El objetivo de este trabajo fue estandarizar un análisis *multilocus* para *T. gondii* y discernir la estructura de población de las muestras presentes en Colombia.

Metodología. Se diseñaron iniciadores para cada uno de los genes y se utilizaron regiones espaciadoras transcritas internas del ARN ribosómico (ITS) no reportadas en ToxoDB. Todos los marcadores fueron estandarizados en la cepa de referencia RH.

Resultados preliminares. Se obtuvieron las condiciones adecuadas de amplificación de PCR de los marcadores moleculares ITSs, GRA6, apicoplasto y B-tubulina con la cepa de referencia RH, y los pesos esperados. Se harán análisis de secuenciación de datos mediante herramientas de bioinformática, para hacer comparaciones de

los haplogrupos existentes frente a las muestras utilizadas, permitiendo por primera vez un análisis evolutivo del parásito en Colombia.

Conclusiones. Se logró estandarizar los marcadores moleculares ITSs, GRA6, apicoplasto y B-tubulina en *T. gondii*, y se obtuvieron datos que permiten una aproximación a un análisis evolutivo de *T. gondii*, de particular interés debido a su importancia clínica y económica. Es fundamental la comprensión de estos parásitos en todas sus dimensiones, ya que afectan las decisiones futuras en la salud pública.

• • •

Búsqueda de genes para proteínas con función adhesina en *Toxoplasma gondii*

Jonathan Múnera, Aylan Farid Arenas, Jorge Enrique Gómez, John Alejandro Acosta
Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. Las proteínas con función adhesina son importantes en *Toxoplasma gondii* durante el proceso de adhesión a la célula huésped. La aplicación de métodos de predicción permite mejorar y acelerar la identificación de este tipo de proteínas y su potencial como blancos farmacológicos. Nuestro grupo ha desarrollado recientemente un programa de predicción de adhesinas ApiPredictorAd UniQ_E, con base en algoritmos de búsqueda novedosos que mejoran la identificación de este tipo de secuencias.

Con este trabajo se pretende buscar y caracterizar genes para proteínas con función adhesina a partir del programa ApiPredictorAd UniQ_E y, posteriormente, reevaluarlos con programas de bioinformática clásica.

Materiales y métodos. Se buscaron proteínas hipotéticas anotadas con función desconocida en *T. gondii* en la base de datos eupathdb (<http://eupathdb.org/eupathdb/>), las cuales se utilizaron para la validación del ApiPredictorAd UniQ_E. Posteriormente, se procedió a reevaluar esta función con los programas SMART, SignalP, TMHMM y Prosite.

Resultados. De 132 proteínas seleccionadas sin función conocida, tres presentaron algunas características de adhesina, una (TGGT1_085200) presentó 12 ESTs, 2 dominios srs (sag); otra proteína (TGGT1_033580) presentó 38 ESTs, 3 dominios *Thrombospondin type 1 repeats*; y una tercera presentó (TGGT1_074630) 2 ESTs y 10 dominios EGF.

Conclusiones. Hasta el momento se han encontrado tres proteínas con función de adhesina y se continúa con la búsqueda.

• • •

Níveis de citocinas/quimiocinas produzidos por células mononucleares do sangue periférico de gestantes após infecção por *Toxoplasma gondii*

Karine Rezende-Oliveira¹, Neide Silva², José Roberto Mineo², Virmondes Rodrigues³

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Campus do Pontal, Minas Gerais, Brasil

² Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

³ Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil

Introdução. *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório que pode causar sintomas clínicos variados ou até mesmo assintomáticos em pacientes imunocompetentes, sendo mais grave em indivíduos imunocomprometidos, considerando aqueles a transmissão congênita. Células da resposta imune participam do controle da infecção pelo parasito através da síntese de citocinas e quimiocinas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de parturientes e de não gestantes frente a infecção com taquizoitos vivos da cepa RH ou ME49 de *T. gondii* quando em cultura.

Material e métodos. Foram colhidos sangue de 30 mulheres sendo sete parturientes negativas, sete não gestantes negativas, dez parturientes positivas e seis não gestantes positivas. O sangue foi processado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico. Estas células forma mantidas em cultura por 24 horas com formas taquizoitas vivas de duas diferentes cepas de *T. gondii*. Após este período o sobrenadante destas culturas foi colhido para análise de níveis de citocinas e quimiocinas. Para análises estatística foi utilizado teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e Wilcoxon para a comparação entre duas variáveis em um mesmo grupo. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados. Observou-se que formas taquizoitas vivas de *T. gondii* foram capazes de inibir a síntese de CCL-2 diferentemente do observado para CCL-5. As células de não gestantes sintetizaram níveis significativos de TNF- α e IL-12, demonstrando o perfil pró-inflamatório induzido pela presença do parasito nas culturas.

Conclusão. A imunomodulação, observada durante a gestação pode contribuir com o desenvolvimento de mecanismos de escape do parasito da resposta imune e que a modulação da síntese de quimiocinas pode favorecer a sua sobrevivência.

Apoio financeiro. FAPEMIG



Caracterización parcial de los genes dihidrofolatorreductasa (*dhfr*) y dihidropteroatosintetasa (*dhps*) en aislamientos de *Toxoplasma gondii*

Liliana Jazmín Cortés, María Luz Gunturiz, Sofía Duque Grupos de Parasitología y Fisiología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Toxoplasma gondii* es el agente causal de la zoonosis conocida como toxoplasmosis, que se presenta como una infección asintomática en adultos sanos y con manifestaciones clínicas graves en inmunosuprimidos. El tratamiento empleado es clindamicina-sulfadoxina-pirimetamina, para el cual se han reportado fracasos terapéuticos asociados con mutaciones en genes blanco para estos medicamentos.

Objetivo. Estandarizar las condiciones de amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del exón 2 del gen *dhfr* y los exones 1ab, 2, 4 y 5 del gen *dhps*, a partir de la cepa de referencia RH y de dos aislamientos de *T. gondii* obtenidos de pacientes con VIH (virus de inmunodeficiencia adquirida) y con toxoplasmosis cerebral.

Materiales y métodos. Se practicó PCR a partir de 100 ng de ADN genómico. Se hizo la secuenciación directa con los productos purificados, empleando los iniciadores de PCR para cada uno de los exones. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en Refseq del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Resultados. Se estandarizaron las condiciones de amplificación del exón 2 del gen *dhfr* y de los exones 1ab, 2, 4 y 5 del gen *dhps*, y se encontró que las secuencias obtenidas para estos exones son idénticas a las reportadas en las bases de datos mundiales. Sin embargo, se encontró un cambio de un nucleótido para el exón 2 del gen *dhps* en las tres muestras secuenciadas.

Conclusiones. La estandarización de las PCR para la amplificación de los genes *dhps* y *dhfr*, permitirá realizar estudios de polimorfismo y establecer su posible asociación con resistencia a medicamentos en muestras de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de toxoplasmosis.

Amplificación de los genes *rop 18*, *GRA6* y *BTUB* de *Toxoplasma gondii* mediante la técnica de PCR en carnes de consumo humano

Lored Uribe, Fabiana Lora, Alejandro Acosta, Jorge Enrique Gómez-Marín

Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado. La vía oral es probablemente la principal ruta de transmisión como pueden adquirir la infección los humanos y los animales, ya sea al consumir carne con quistes, cruda o mal cocida, o al ingerir alimentos y agua contaminados.

Objetivo. Amplificar los genes *rop 18*, *GRA6* y *B.TUB* de *T. gondii* mediante la técnica de PCR en muestras de carne de res, cerdo y pollo, obtenidas en Armenia y en el municipio de Calarcá.

Materiales y métodos. Se obtuvieron 20 muestras de carne de res, cerdo y pollo de establecimientos comerciales clasificados por estratos de Armenia y del municipio de Calarcá, de las muestras de pollo se obtuvieron 17 muestras. Se extrajeron 117 muestras de ADN, las cuales se utilizaron para practicar una PCR anidada, con el fin de obtener un producto de amplificación final esperado de 97 pb específicas de *T. gondii*. Posteriormente, se practicó una PCR para el gen *rop 18*, producto de amplificación esperado de 514 pb, para el gen *GRA6*, producto de amplificación esperado de 546 pb, y para el gen *BTUB*, producto de amplificación esperado de 528 pb.

Resultados. De 117 muestras de ADN, se hizo PCR anidada a 57 muestras del municipio de Calarcá y a 6 muestras de Armenia, donde 57 amplificaron para el gen *b1* 20 (35 %) fueron positivas para la presencia de *T. gondii*. De las seis muestras de Armenia, 4 amplificaron para el gen *b1*. Se hizo PCR para el gen *rop 18* a 15 muestras positivas para el gen *b1*; no se obtuvo amplificación. Se tomó como alternativa amplificar el gen *GRA6*; de 16 muestras positivas para el gen *b1*, no se obtuvo ningún amplificado; se practicó PCR al gen *BTUB* de *T. gondii*, a 13 muestras que fueron positivas para el gen *b1*, amplificando sólo 1 muestra de carne de pollo de un supermercado de Calarcá. Falta por estandarizar nuevas PCR, que proporcionarán nuevas amplificaciones y nuevos resultados.

Conclusión. En el municipio de Calarcá, el 35 % de las muestras de ADN fueron positivas para la presencia de *T. gondii* en carnes de consumo

humano. Esto indica que, en los diferentes tipos de carne de cerdo, res y pollo analizados, existe la exposición al parásito, pero ninguna de estas cepas son virulentas.

