

Simposio

LAS “-ÓMICAS” NUEVAS Y ATENDIBLES, TECNOLOGÍAS PARA ENFERMEDADES VIEJAS Y DESATENDIDAS**Mapeo cromosómico para la identificación de variantes genéticas implicadas en la enfermedad de Chagas**

Clara Isabel González

Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, es considerada un problema de salud pública en 17 países de América Latina. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud, cerca de 100 millones de personas se encuentran expuestas y alrededor de 10 millones están infectadas. Las migraciones y la globalización han llevado a que la enfermedad de Chagas sea una enfermedad emergente en países no endémicos de Norteamérica, Europa, Asia y Australia.

En Colombia, se estima que alrededor de 5 % de la población está infectada y cerca de 20 % se encuentra en riesgo de adquirir la infección, con cerca de tres millones de enfermos (Moncayo, 2003). Los departamentos con mayor endemia son: Arauca, Casanare, Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Tolima, Huila y Bolívar (Guhl, 2005).

Clínica y patogénesis de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas cursa en dos fases: aguda y crónica. La mayoría de los individuos infectados con *T. cruzi* no desarrollan una fase aguda debido a una respuesta inmunitaria efectiva contra el parásito. Posteriormente, los pacientes infectados entran en una fase indeterminada, sin sintomatología ni evidencia de daño orgánico. La mayoría persiste indefinidamente en esta fase; sin embargo, después de 20 a 30 años, entre 15 y 30 % desarrolla las formas crónicas, las cuales pueden cursar con compromiso cardíaco (cardiopatía chagásica) o de las vías digestivas (megaesófago) o, menos frecuentemente, las formas nerviosas. En Colombia, la cardiomiopatía chagásica es la manifestación clínica más frecuente y grave. Sin embargo, se desconoce su incidencia entre los individuos infectados.

La patogénesis de la enfermedad de Chagas es un proceso no entendido en su totalidad. En

la fase aguda, las lesiones del miocardio y el sistema nervioso se relacionan directamente con la parasitosis tisular, y la ruptura de los nidos de parásitos en los tejidos con liberación de antígenos de *T. cruzi* que sensibilizan las fibras cardíacas y neuronales, lo que lleva a la destrucción de estas células por la respuesta anti-*T. cruzi* de tipo CD8+ y CD4+ (Soares, 1999). En cuanto a la fase crónica, se han propuesto diferentes mecanismos. Actualmente, la hipótesis más aceptada es que la respuesta inflamatoria generada por la presencia del parásito, que no ha sido eliminado por el sistema inmunitario, induce una inflamación crónica, responsable en algunos individuos del daño tisular.

Existen varios factores que contribuyen directa o indirectamente a la progresión y, por lo tanto, a la evolución de la enfermedad de Chagas en el huésped. Algunos de estos factores son inherentes al parásito, como su virulencia, tropismo tisular, constitución genética y antigénica; otros están relacionados con el huésped, como edad, raza, estado nutricional, respuesta inmunitaria y constitución genética. El hecho de que sólo un porcentaje de individuos infectados desarrolle síntomas, demuestra la importancia del genoma del huésped en el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Genética de la enfermedad de Chagas

La variación en la secuencia del genoma humano juega un papel importante, pero a la vez poco conocido, en la etiología de muchas enfermedades. En el caso de las enfermedades infecciosas, se sabe que no sólo las diferencias genotípicas y fenotípicas del microorganismo determinan el desarrollo de una enfermedad determinada, sino también, que la variación en el genoma del huésped (polimorfismos genéticos) podría ejercer un papel importante en el desarrollo de resistencia o sensibilidad.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) son la forma más común de variación genética en el genoma humano; en la actualidad, la densidad de SNP comunes estimados es de aproximadamente 10 a 15 millones (*The International HapMap Consortium* 2007, <http://www.hapmap.org>). Su utilidad como marcadores genéticos asociados con varias enfermedades infecciosas y no infecciosas, ha sido ampliamente demostrada (Delgado-Vega, 2010).

El interés sobre el posible efecto funcional generado por estas variantes polimorfas en el genoma y su posible papel en la patogénesis de diversas enfermedades complejas, es cada vez mayor. Se dice que una enfermedad es “compleja” cuando la posibilidad de padecerla está controlada por múltiples factores, como los genéticos y ambientales, cada uno de los cuales tiene un efecto modesto sobre el desarrollo de la enfermedad (Cardon, 2003). Teniendo en cuenta lo anterior, la enfermedad de Chagas podría catalogarse como compleja, dada la variedad de factores que podrían influenciar su desarrollo, especialmente la variabilidad genética del huésped y del parásito, además de los factores medioambientales.

Polimorfismos genéticos y enfermedad de Chagas

La asociación de variantes génicas de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y el desarrollo de la forma clínica de la enfermedad de Chagas, se ha demostrado en algunos estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones (Llop, 1991; Nieto, 2000). Existen también algunos reportes relacionados con otros genes de respuesta inmunitaria, como *TNFA* (Beraún, 1998.), *CCR5*, *NRAMP1* (Calzada, 2001), *IL10*, *BAT1* y *NFKBL/IKBL* (Ramasawmy, 2006).

En nuestro grupo hemos encontrado asociaciones con *IL1B* (Flórez, 2006), *IL12B* (Zafra, 2007), *PTPN22*, *MIF*, *TGFB* e *IFNG* (Torres, 2010), entre otros. Estos datos muestran que, al igual que en el caso de la mayoría de los microorganismos con los cuales se han encontrado asociaciones, la infección con *T. cruzi* podría también estar determinada por variaciones en un gran número de genes polimorfos.

La dificultad para identificar genes asociados al desarrollo de la enfermedad de Chagas en humanos, es la misma que se presenta en el estudio de enfermedades complejas y poligénicas. Esta dificultad se relaciona con la heterogeneidad genética de las poblaciones humanas y la interacción de múltiples genes con contribuciones

modestas a la asociación con la enfermedad. Los avances tecnológicos logrados en la última década, relacionados con el desarrollo de mapas de alta densidad de marcadores, los mapas de desequilibrio de ligamiento y haplotipos, la utilización de micromatrices para genotipificación de SNP y las herramientas bioinformáticas, han permitido superar algunas de estas dificultades y han llevado a un auge en este tipo de estudios.

El Proyecto Internacional HapMap adelanta la construcción de una base de datos para haplotipos comunes en distintas poblaciones humanas. Cuando los marcadores se encuentran en desequilibrio de ligamiento en la población, existe información redundante. Si dos marcadores se encuentran en total desequilibrio de ligamiento ($r^2=1$), cada uno de los genotipos de un SNP está totalmente determinado por el otro; por lo tanto, la genotipificación de uno será suficiente para obtener la información de los dos.

La selección de marcadores no redundantes presentes en una zona con alta densidad de marcadores, se ha denominado *haplotype tagging* y los SNP seleccionados por este método se denominan “tag-SNP”. El principal objetivo de esta selección es reducir la cantidad y el costo de la genotipificación, manteniendo la mayoría de la información del mapa que contiene la totalidad de los marcadores (Clayton, 2004).

Con esta estrategia y el desarrollo de plataformas comerciales para genotipificar en un solo ensayo cientos o miles de polimorfismos, se han realizado mapeos finos de regiones cromosómicas en numerosas enfermedades complejas y comunes, y se han popularizado los estudios de rastreo del genoma o *genome wide scan* (GWAS). De hecho, después de cinco años del primer GWAS, en el cual se identificó la asociación del factor H de complemento con la degeneración macular relacionada con la edad, se han publicado más de 450 GWAS y asociaciones con más de 2000 SNP en numerosas enfermedades humanas (Ku, 2010). Sin embargo, las variantes identificadas requieren una comprobación posterior en diferentes poblaciones con tamaños de muestra considerables.

Mapeo cromosómico en enfermedad de Chagas

Basados en los resultados obtenidos por nuestro grupo con SNP individuales de genes candidatos, y con el fin de identificar regiones cromosómicas asociadas al desarrollo de la cardiomiopatía chagásica, se hizo un mapeo cromosómico de alta resolución en las regiones donde mapean los

genes encontrados previamente asociados con dicha enfermedad y que involucraron regiones de los cromosomas 1, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 16, 19 y 22.

La selección de *tagSNP* se hizo con el programa *Haploview* 4.2; de esta manera, se definieron 765 SNP de 78 genes que fueron genotipificados utilizando la plataforma de micromatrices *Golden Gate* (Illumina). Los genes seleccionados se relacionan principalmente con citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas y quimiocinas, vías de señalización y factores de transcripción, entre otros. Además, se incluyeron polimorfismos presentes en regiones intergénicas.

La población de estudio incluyó individuos seropositivos a antígenos de *T. cruzi*, de la zona endémica de Santander (Colombia), mayores de 20 años, provenientes en su mayoría de áreas rurales, con condiciones socioeconómicas similares y que llevaban más de 10 años de vivir en la zona (400 individuos).

Estos individuos se dividieron en dos grupos: asintomáticos, sin sintomatología clínica, ni trastornos electrocardiográficos, que representaron el grupo control, y pacientes con cardiomiopatía chagásica, con síntomas clínicos y alteraciones electrocardiográficas o funcionales, que representaron el grupo de casos. Este último grupo se subdividió en diferentes grados de gravedad, según los parámetros de la OMS.

Los resultados de la genotipificación permiten establecer las frecuencias de alelos, genotípicas y de haplotipos de los dos grupos de pacientes. El efecto genético de cada polimorfismo con la cardiomiopatía chagásica es determinado usando un modelo de regresión logística, con los casos y los controles como variables dependientes y donde la edad y el sexo fueron utilizadas como covariables adicionales. Estos análisis se realizaron con el programa PLINK, versión 1.07.

Referencias

- Beraún Y, Nieto A, Collado MD, González A, Martín J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. *Tissue Antigens*. 1998;52:81-3.
- Calzada JE, Nieto A, López-Nevot MA, Martín J. Lack of association between NRAMP1 gene polymorphisms and *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*. 2001;57:353-7.
- Cardon L, Abecasis G. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet*. 2003;19:135-40.
- Clayton D, Chapman J, Cooper J. Use of unphased multilocus genotype data in indirect association studies. *Genet Epidemiol*. 2004;27:415-28.
- Delgado-Vega A, Sánchez E, Löfgren S, *et al*. Recent findings on genetics of systemic autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:698-705.
- Flórez O, Zafra G, Morillo C, Martín J, González CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol*. 2006;67:741-8.
- Guhl F, Restrepo M, Angulo VM, Antunes CM, Campbell-Lendrum D, Davies CR. Lessons from a national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. *Trends Parasitol*. 2005;21:259-62.
- Ku CS, Loy EY, Pawitan Y, Chia KS. The pursuit of genome-wide association studies: Where are we now? *J Hum Genet*. 2010;55:195-206.
- Llop E, Rothhammer F, Acuna M, *et al*. HLA antigens in Chagas cardiomyopathy: New evidence based on a case-control study. *Rev Med Chil*. 1991;119:633-6.
- Moncayo A. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:577-91.
- Nieto A, Beraún Y, Collado MD, *et al*. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*. 2000;55:195-8.
- Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Muller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, *et al*. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2006;193:1394-9.
- Soares MB, Santos RR. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(Suppl.1):257-62.
- Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, *et al*. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol*. 2010;10:682-5.
- Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect*. 2007;9:1049-52.



Esquistosomiasis: proteómica de la interfase parásito-huésped

Eduardo De la Torre, Ricardo Pérez-Sánchez, Raúl Manzano, Mar Siles-Lucas, Ana Oleaga

Grupo de Parasitología, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Salamanca, España

Los esquistosomas son una de las principales causas de enfermedad en muchos países tropicales y subtropicales. Hay tres especies principales que parasitan al hombre, *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*, y, al menos, otras diez que afectan a rumiantes. De este segundo grupo, únicamente *S. mattheei* y *S. bovis* han recibido cierta atención como consecuencia de su importancia veterinaria.

Schistosoma bovis, especie muy cercana filogenéticamente a *S. haematobium*, es un parásito del sistema portal mesentérico que afecta fundamentalmente a rumiantes de prácticamente todo el continente africano, Asia sudoccidental, islas del Mediterráneo y España. En las zonas endémicas, la mayor parte de las infecciones por *S. bovis* cursan a nivel subclínico, aunque pueden manifestarse brotes serios, llegándose a producir en algunos casos la muerte de los animales infectados. Estas infecciones subclínicas causan importantes pérdidas en las explotaciones ganaderas como consecuencia de su efecto a largo plazo sobre el crecimiento y la productividad de los animales y, también, por aumentar la propensión de los animales infectados a otras enfermedades parasitarias y bacterianas.

Al igual que las otras especies de esquistosomas, los vermes adultos de *S. bovis* pueden llegar a vivir durante años en el lecho vascular de su huésped, en permanente contacto con el endotelio vascular, y expuestos a los componentes del torrente sanguíneo. Es un hecho constatado que el parásito se ha adaptado al hábitat intravascular y ha desarrollado mecanismos de modulación y evasión de las respuestas inmunitaria y hemostática de su huésped. Igualmente, todo parece indicar que el parásito regula también las funciones del endotelio en su propio beneficio, induciendo unas condiciones favorables para asegurar su supervivencia. Las moléculas parasitarias responsables de esta regulación forman parte de la interfaz parásito-huésped, constituida por las moléculas que el parásito expone al huésped a lo largo de la infección, y por los componentes del sistema inmunitario y del sistema hemostático del huésped, así como por la superficie del endotelio vascular.

Las moléculas parasitarias encargadas de llevar a cabo las funciones inmunomoduladoras y

antihemostáticas están, en el caso de los vermes adultos, entre las excretadas o secretadas durante sus procesos vitales y, esencialmente, entre las expresadas en la superficie de su tegumento. Las moléculas implicadas en estas funciones son vitales para la supervivencia del parásito y constituyen, en potencia, excelentes dianas para ser bloqueadas por medio de vacunas o fármacos.

Teniendo en cuenta el interés de dichas moléculas, el objetivo general de nuestra línea de investigación ha sido la caracterización y estudio de la interfaz parásito-huésped en estas infecciones. Para ello abordamos el estudio de las proteínas parasitarias excretadas o secretadas y las del tegumento y, recientemente, hemos iniciado la caracterización de las proteínas expresadas por el huésped en la superficie del endotelio vascular (en respuesta a la infección) para, posteriormente, identificar los correspondientes ligandos parasitarios.

Comenzamos estudiando mediante electroforesis bidimensional, *Western blot* y espectrometría de masas, las proteínas de los productos de excreción o secreción y las de una fracción superficial del tegumento. Dicho estudio nos permitió conocer el proteoma de estas dos fracciones, definir qué proteínas interactúan con el sistema inmunitario (inmunoma) e identificar una serie de proteínas parasitarias que intervienen específicamente en los mecanismos de evasión de las respuestas defensivas.

Además, teniendo en cuenta que en la superficie externa del tegumento se desarrolla gran parte de los mecanismos de evasión del parásito, profundizamos en el estudio de las proteínas tegumentarias de machos y hembras, especialmente de aquellas expresadas en su superficie. Realizamos tres digestiones con tripsina, de intensidad creciente, de la superficie de los vermes, obteniendo así fracciones de péptidos tripticos que fueron analizadas por espectrometría de masas. En la fracción correspondiente a la digestión más superficial, se identificaron 41 y 27 proteínas en el tegumento de los machos y hembras, respectivamente, evidenciándose claras diferencias en el proteoma del tegumento de los vermes de uno y otro sexo. Igualmente, por microscopía confocal se confirmó la expresión de actina, enolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en la superficie de los vermes.

Tras estos estudios iniciales, y una vez conocidas las moléculas del parásito que constituyen la interfase parásito-huésped, pudimos definir teóricamente las posibles interacciones entre ciertos grupos de proteínas parasitarias y determinados mecanismos fisiológicos del huésped.

Concretamente, teniendo en cuenta determinadas proteínas identificadas en el tegumento, nos planteamos la hipótesis de que los esquistosomas, por medio de receptores del tegumento, podrían activar el sistema fibrinolítico del huésped y así evitar la formación de coágulos en su superficie. Tras una serie de ensayos, confirmamos esta hipótesis y demostramos que el tegumento de los vermes adultos contiene componentes con capacidad para fijar y activar plasminógeno, componente central del sistema fibrinolítico.

Una vez identificadas las posibles proteínas del tegumento, implicadas en éste y otros mecanismos antihemostáticos, comprobamos específicamente la actividad fibrinolítica o anticoagulante, entre otras, de la enolasa y la anexina, dos moléculas que en otros organismos poseen estas funciones. Con este fin, tras la clonación de sus ADNc en un vector de expresión y la obtención de ambas proteínas en forma recombinante, se hicieron los correspondientes ensayos de actividad. Estos ensayos han demostrado que ambas proteínas poseen actividad fibrinolítica y que la anexina, además, tiene efectos anticoagulantes que afectan a ambas vías de la coagulación, aunque de forma más notoria a la vía intrínseca.

Recientemente, hemos iniciado la identificación de las proteínas que se expresan en la superficie del endotelio vascular durante la infección. Para ello se utiliza una metodología que se basa en la perfusión vascular de animales (infectados y no infectados con *S. bovis*) con un éster derivado de la biotina. De este modo, las proteínas expresadas en la superficie endotelial, con grupos amino accesibles a la solución de perfusión, quedan con biotina y pueden ser eficientemente purificadas con cromatografía de afinidad con estreptavidina,

para su posterior digestión con tripsina y análisis e identificación por espectrometría de masas.

En resumen, la aplicación de los últimos desarrollos técnicos en proteómica al estudio de las relaciones parásito-huésped, permite identificar los componentes implicados y, en definitiva, dilucidar los mecanismos que utiliza el parásito para asegurar su supervivencia en el huésped.

Agradecimientos

Estos estudios han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España mediante los proyectos de investigación AGL2007-60413 y AGL2010-18163.

Bibliografía

1. De la Torre-Escudero E, Manzano-Román R, Pérez-Sánchez R, Siles-Lucas M, Oleaga A. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol.* 2010;173:76-84.
2. De la Torre Escudero E, Manzano-Román R, Valero L, Oleaga A, Pérez-Sánchez R, Hernández-González A, *et al.* Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *J Proteomics.* 2011 (in press).
3. Pérez-Sánchez R, Ramajo-Hernández A, Ramajo-Martín V, Oleaga A. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics.* 2006;6:226-36.
4. Pérez-Sánchez R, Valero ML, Ramajo-Hernández A, Siles-Lucas M, Ramajo-Martín V, Oleaga A. A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;161:112-23.
5. Ramajo-Hernández A, Oleaga A, Ramajo-Martín V, Pérez-Sánchez R. Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Vet Parasitol.* 2007;144:45-60.
6. Ramajo-Hernández A, Pérez-Sánchez R, Ramajo-Martín V, Oleaga A. *Schistosoma bovis*: Plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp Parasitol.* 2007;115:83-91.



Inmunoproteómica de la interacción parásito-huésped en modelos animales

Rafael Toledo

Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjassot-Valencia, España

Los factores que determinan el curso de las helmintiasis intestinales han sido ampliamente estudiados mediante el uso de nematodos intestinales. Numerosas especies de nematodos y roedores (fundamentalmente, distintas cepas de ratón) se han empleado como modelos experimentales (Finkelman, *et al.*, 1997).

Sin embargo, los resultados obtenidos no son, en absoluto, definitivos. En general, se ha observado que la evolución de una helmintiasis depende de numerosos factores relacionados tanto con el parásito, como con el huésped. Así, la expulsión de los helmintos intestinales parece estar relacionada con el desarrollo de respuestas Th2 mediadas por IL-4. Sin embargo, el desarrollo de infecciones crónicas parece asociado con respuestas Th1 mediadas por IL-12; IFN- γ y TNF- β (Finkelman, *et al.*, 1997).

De cualquier modo, los mecanismos implicados en el desarrollo de estos tipos de respuestas, así como los factores dependientes del huésped y del parásito que determinan las diferentes respuestas, son difíciles de estudiar (Toledo y Fried, 2005). En este sentido, cabe destacar que uno de los factores que impiden la obtención de conclusiones más definitivas es la ausencia de modelos experimentales adecuados.

Los modelos experimentales empleados hasta la fecha presentan diversos problemas: (i) alguna de las especies de nematodos empleados únicamente es capaz de desarrollarse en una sola especie de huésped experimental, lo cual impide hacer estudios comparados, y (ii) otras especies de nematodos presentan fases titulares o parasitan el intestino grueso, lo cual dificulta considerablemente la interpretación de los resultados obtenidos. Estos hechos hacen evidente la necesidad de desarrollar nuevos modelos experimentales (Toledo y Fried, 2005). En este contexto, los equinostomátidos y, más concretamente *E. caproni*, pueden resultar de gran utilidad.

Sin embargo, los aspectos relacionados con la respuesta inmunitaria del huésped definitivo han sido muy poco estudiados hasta la fecha en las equinostomiasis. Es un hecho conocido que los equinostomátidos generan respuestas inmunitarias detectables en sus huéspedes vertebrados (Toledo,

et al., 2006). La mayor parte de la información disponible sobre la respuesta inmunitaria en las infecciones con *Echinostoma* spp. se deriva de estudios en los que se han utilizado diferentes roedores (Toledo, *et al.*, 2009).

En general, se ha podido determinar que estos Digénidos generan respuestas de carácter celular y humoral, estimuladas por antígenos tanto de las fases juveniles como adultas (Toledo, *et al.*, 2006). Asimismo, también es conocido que existen huéspedes que rápidamente eliminan al parásito y son llamados huéspedes de baja compatibilidad. Un ejemplo es la rata, que elimina a *E. caproni* entre la sexta y la octava semanas después de la infección (Toledo, *et al.*, 2009). Existen también, por el contrario, huéspedes que el parásito puede infectar en forma crónica. Un ejemplo claro es el hámster, en el que el parásito no es eliminado hasta unos meses después de la infección.

Todo lo expuesto pone de manifiesto que el estudio del desarrollo de *E. caproni* en diferentes especies de huésped puede resultar de gran utilidad para el análisis de las interacciones parásito-huésped en las helmintiasis intestinales. El modelo *E. caproni*-roedor ofrece la posibilidad de fijar las variables dependientes del parásito implicadas en el curso de la infección para, de esta forma, analizar de manera específica las variables dependientes del huésped y sus consecuencias en el curso de la infección. Así, mediante estudios comparativos se podrá profundizar tanto en los factores que determinan la expulsión de un helminto intestinal como en los que influyen en el desarrollo de infecciones crónicas.

En este contexto, el estudio del proteoma del parásito y la interacción de las proteínas del parásito con cada tipo de huésped, puede resultar fundamental. Sin embargo, uno de los principales problemas en este tipo de estudios es la escasez de secuencias depositadas en las bases de datos, lo que dificulta el hallazgo de homologías, a pesar de la obtención de buenos resultados espectrométricos.

Para minimizar este problema, nuestro grupo ha empleado dos aproximaciones metodológicas: (i) puesto que la electroforesis bidimensional dificulta la identificación de las proteínas menos

abundantes, se ha hecho un estudio de proteómica aleatoria (*shot-gun*), que consiste en llevar a cabo el proceso de separación mediante cromatografía líquida y, posteriormente, analizar los compuestos, ya separados, mediante la espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS); y (ii) los datos espectrométricos han sido analizados mediante la combinación de diferentes motores de búsqueda, como MASCOT (*Matrix Science*) y *ProteinPilot*, versión 2.0 (*Applied Biosystems*), para incrementar la detección de homologías con secuencias depositadas en las bases de datos.

El análisis mediante esta metodología del secretoma y del surfoma de *E. caproni*, ha permitido identificar un número importante de proteínas. Los principales grupos de proteínas representadas son las enzimas metabólicas y, particularmente, las enzimas glucolíticas, proteínas estructurales de respuesta frente al estrés, chaperonas o transductoras de señal (Sotillo, *et al.*, 2010). Asimismo, nuestros estudios han permitido detectar modificaciones posteriores a la traslación en el patrón de proteínas de echinostomátidos, como fosforilación de proteínas o glucosilación, lo cual puede ser de gran trascendencia en la adaptación al huésped y el curso de la infección (Toledo, *et al.*, 2011).

El estudio del inmunoma puede resultar de gran utilidad, tanto para llegar a conocer los factores implicados en la expulsión de los helmintos, como en la identificación de dianas diagnósticas o para el desarrollo de vacunas. La aproximación inmunoproteómica realizada ha permitido la identificación de las principales proteínas antigénicas de los productos de excreción o secreción de *E. caproni*, así como algunas modificaciones que pueden afectar a la 'inmunogenia' de estas proteínas. En general, las

proteínas más inmunógenas parecen ser aquellas relacionadas con las estrategias de supervivencia del parásito (Sotillo, *et al.*, 2008).

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos SAF2010-16236 del Ministerio de Ciencia e Innovación (España), PROMETEO/2009/081 de la Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana (Valencia, España), PS09/ 02355 del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, Spain) y FEDER.

Referencias

1. Finkelman F D, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, *et al.* Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological Reviews*. 2004;201:139-55.
2. Sotillo J, Valero L, Sánchez Del Pino M M, Fried B, Esteban JG, Marcilla A, *et al.* Identification of antigenic proteins from *Echinostoma caproni* (Trematoda) recognized by mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. *Parasite Immunology*. 2008;30:271-9.
3. Sotillo J, Valero L, Sánchez Del Pino MM, Fried B, Esteban JG, Marcilla A, *et al.* Excretory/secretory proteome of the adult stage of *Echinostoma caproni*. *Parasitology Research*. 2008;107:691-7.
4. Toledo R, Fried B. Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. *Trends in Parasitology*. 2005;21:251-4.
5. Toledo R, Esteban JG, Fried B. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Advances in Parasitology*. 2006;63:289-370.
6. Toledo R, Esteban JG, Fried B. Recent advances in the biology of echinostomes. *Advances in Parasitology*. 2009;69:147-204.
7. Toledo R, Bernal MD, Marcilla A. Proteomics of food-borne trematodes. *Journal of Proteomics*. 2011. En prensa.



Interactoma redox de *Trypanosoma cruzi*: identificación *in vivo* de blancos moleculares de triparredoxinas

Dolores Piñeyro^{1,2}, Adriana Parodi³, Magdalena Portela⁴, Diego Arias⁵, Sergio Guerrero⁵, Carlos Robello^{1,2}

¹ Unidad de Biología Molecular-Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³ Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁴ Unidad de Proteómica y Bioquímica Analíticas, Instituto Pasteur de Montevideo, y Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁵ Laboratorio Bioquímica Microbiana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral-CONICET, Santa Fe, Argentina

Trypanosoma cruzi tiene un complejo ciclo de vida que alterna entre un huésped vertebrado y uno invertebrado. En el huésped vertebrado estos parásitos invaden distintos tipos celulares y, en particular, ingresan a las células fagocíticas mediante vesículas que crean una vacuola parasitófora donde se sintetizan moléculas oxidantes. Estas especies altamente reactivas requieren de mecanismos de defensa por parte del parásito, que están siendo investigados por varios grupos, por constituir vías metabólicas cuya inhibición haría inviables a estos parásitos; por lo tanto, sus componentes son posibles blancos de acción de fármacos.

De acuerdo con el análisis del genoma de *T. cruzi*, estos parásitos no poseen genes que codifiquen para las enzimas glutatión reductasa, tioredoxina reductasa, catalasa ni glutatión peroxidasa dependientes de selenio. Es que, a diferencia de la mayor parte de los eucariontes, el metabolismo oxidativo del orden *kinetoplastida* se basa en el ditiol de bajo peso molecular N(1), N(8)-bis (glutacionil) espermidina, denominado tripanotión. La homeostasis de tioles reducidos en estos parásitos, dependiente de tripanotión, es mantenida en forma eficiente debido a la participación de diferentes peroxidasa (peroxirredoxinas, glutatión peroxidasa) que forman parte, a su vez, de un complejo conjunto de enzimas que incluyen a la tripanotión sintetasa, tripanotión reductasa y triparredoxinas. Estas enzimas se encuentran exclusivamente en tripanosomátidos.

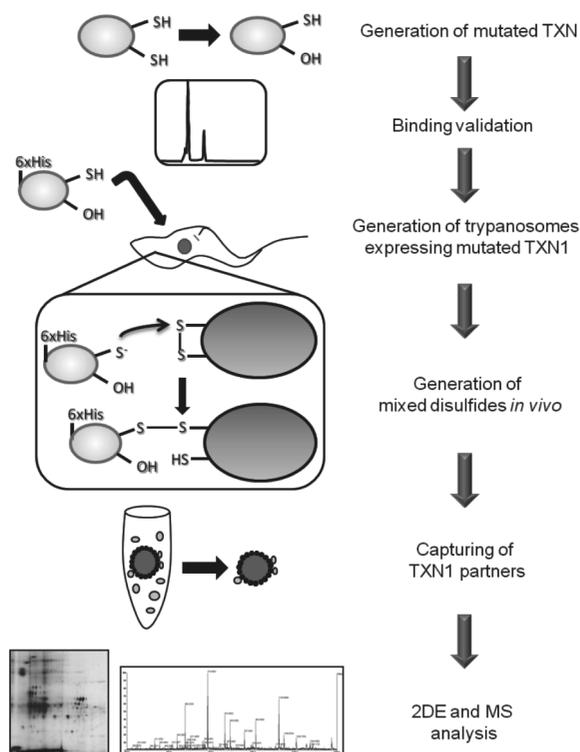
Las triparredoxinas pertenecen a la superfamilia de las tioredoxinas y, al igual que éstas, funcionan transfiriendo equivalentes de reducción desde el tripanotión a las triparredoxina peroxidasa (peroxirredoxinas) y glutatión peroxidasa. Cabe destacar que en la mayor parte de los eucariontes esta función la cumplen las tioredoxinas. Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado que la regulación de la función de proteínas por conversión de disulfuros en tioles mediada por tioredoxinas, es un fenómeno universal que abarca, no solamente las enzimas vinculadas al metabolismo redox, sino también, a proteínas de muy diversas funciones que van desde la síntesis proteica al control sobre factores de transcripción.

Teniendo en cuenta que en los tripanosomas hay una tioredoxina de muy baja expresión y que la misma no es esencial para la supervivencia de estos parásitos, planteamos la hipótesis de que las triparredoxinas cumplen ese papel de modular la actividad de otras proteínas además

de triparredoxina peroxidasa, mediante la interconversión de disulfuros en tioles.

En este trabajo hemos desarrollado una aproximación experimental que consistió en modificar por mutagénesis dirigida a la triparredoxina 1 de *T. cruzi* (*TcTXN1*). Esta versión mutada de *TcTXN1* contiene una sustitución en la cisteína resolutive, así como un extremo amino terminal de seis histidinas. De esta forma, al reaccionar la triparredoxina con un blanco proteico formará el enlace disulfuro mixto y, al no existir la cisteína resolutive, este enlace no puede ser reducido. Esta construcción fue clonada en el vector pTEX y transfectada en *T. cruzi*, para estudiar este fenómeno *in vivo*. Una vez lisados los parásitos, los complejos fueron purificados por cromatografía de afinidad por su extremo de histidinas y se analizaron por electroforesis bidimensional y espectrometría de masa (MALDI/TOF-TOF).

El siguiente esquema resume la estrategia utilizada:



Como puede verse, el paso previo a la transfección fue la validación de la estrategia *in vivo*. Una vez seleccionadas por electroforesis bidimensional las proteínas capturadas por este método, se procedió a su identificación por espectrometría de masa. Identificamos 20 proteínas como posibles sustratos de *TcTXN1*, una de las cuales fue la triparredoxina peroxidasa; todo el resto presentó

cisteínas conservadas que nos permiten sugerir cuál es la cisteína capaz de reaccionar con TcTXN1, y la mayor parte de las mismas pertenecen ya sea a enzimas del metabolismo oxidativo o a enzimas implicadas en la síntesis y degradación de proteínas.

Estos resultados demuestran que las triparredoxinas participan en procesos metabólicos esenciales para el parásito, por lo que proponemos que estas enzimas constituyen buenos candidatos para el diseño de nuevos fármacos.



Los transcriptomas como herramientas para estudios de proteómica: ejemplos en helmintos

Antonio Marcilla

Departamento de Biología Celular y Parasitología, Universitat de València, Burjassot, España

Los helmintos parásitos son responsables de importantes enfermedades y de grandes pérdidas económicas a nivel mundial. En este contexto, se estima que más de 3.000 millones de personas están infectadas con nematodos y, además, estas parasitosis son las que menos atención tienen entre las enfermedades desatendidas (1).

En la mayoría de los casos, los métodos de diagnóstico utilizados en la actualidad son todavía lentos y poco precisos, y se necesitan nuevas herramientas que permitan un diagnóstico rápido y específico. Asimismo, frente a estas parasitosis se dispone de un pobre arsenal de compuestos para su tratamiento, utilizados de manera masiva para el control de las helmintiasis, lo que origina la aparición de resistencias en los helmintos. Es por ello que la identificación de nuevas dianas de tratamiento es también prioritaria.

El tremendo avance de las técnicas experimentales, especialmente en genómica, proteómica y metabolómica, se ha trasladado también al estudio de helmintos parásitos. La secuenciación de genomas, que parecía ser la panacea para identificar rápidamente dianas de tratamiento y vacunas, no ha llenado las expectativas, habiéndose secuenciado genes huérfanos, sin homólogos conocidos en otros organismos y sin función asignada (2). Con la estandarización y mejora de las técnicas de proteómica —entendida como la caracterización sistemática o a larga escala de las proteínas presentes en una célula o un tejido—, numerosos han sido los estudios aplicados a helmintos parásitos con el objetivo de identificar proteínas que pudieran responder a las necesidades anteriormente mencionadas, y actuar como potenciales dianas de tratamiento, vacunas y diagnóstico. Los estudios más recientes han puesto de manifiesto su aplicabilidad en la caracterización de proteínas procedentes de distintos tejidos, sexo o estadio evolutivo de los helmintos, así como de

proteínas implicadas en diversos procesos, como la interacción con el huésped o la generación de resistencia a antihelmínticos (3).

Para caracterizar dichas proteínas, resulta fundamental disponer de buenas bases de datos frente a las cuales comparar los datos obtenidos, por ejemplo, por espectrometría de masas. Y ello sólo es posible cuando se aborda el estudio de organismos cuyo genoma se encuentra secuenciado. En la actualidad son escasos los genomas de helmintos parásitos secuenciados (www.sanger.ac.uk/Projects/Helminths) y, por ello, se recurre o bien a identificaciones por homología con proteínas de aquellos, uso de anticuerpos disponibles, o más recientemente, a la producción de genotecas de expresión (con secuencias parciales, EST) o transcriptomas (entendidos estos como todos los transcritos de un organismo, tejido o célula) y su secuenciación. Los transcriptomas se están mostrando como herramientas esenciales a la hora de disponer de información sobre análisis de la expresión génica, fenómenos de regulación e, incluso, en estudios sobre la función de determinados genes en parásitos.

Las técnicas de *microarrays* de ARN y de secuenciación masiva de nueva generación (en sus tres versiones en la actualidad, plataformas Illumina/Solexa, Roche 454 y SOLiD), están permitiendo disponer, en poco tiempo y con una inversión relativamente baja, de una gran cantidad de secuencias de transcritos, generándose ahora el problema de su ensamblaje y anotación de manera precisa.

En la presente comunicación se mencionan proyectos de secuenciación de transcriptomas existentes para helmintos parásitos, centrándose fundamentalmente en trematodos y nematodos. Con base en la experiencia de nuestro grupo de investigación, se aborda el proceso de obtención de dichos transcriptomas, sus aplicaciones en

la mejora de identificaciones en proteomas de helmintos parásitos (4,5), así como la problemática existente, incluyendo la caracterización funcional de dichas proteínas, que requiere, además, del desarrollo de herramientas bioinformáticas fáciles de usar (6).

Estudios financiados por los proyectos CGL2005-0231/BOS y SAF2010-16236 del Ministerio de Ciencia e Innovación (España) y FEDER (Unión Europea); PS09/02355 del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Ciencia e Innovación (España) y FEDER; y UV-AE-10-23739 de la Universitat de València (Valencia, España), así como del programa PROMETEO/2009/081 de la Generalitat Valenciana.

Referencias

1. Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet*. 2009;373:1570-5.
2. Barrett J. Forty years of helminth biochemistry. *Parasitology*. 2009;136:1633-42.
3. Toledo R, Bernal D, Marcilla A. Proteomics of foodborne trematodes. *J Proteomics*. 2011, en prensa (doi:10.1016/j.jprot.2011.03.029).
4. Marcilla A, Sotillo J, Pérez-García A, Igual-Adell R, Valero ML, Sánchez-Pino MM, *et al*. Proteomic analysis of *Strongyloides stercoralis* L3 larvae. *Parasitology*. 2010;137:1577-83.
5. Sotillo J, Valero ML, Sánchez Del Pino MM, Fried B, Esteban JG, Marcilla A, *et al*. Excretory/secretory proteome of the adult stage of *Echinostoma caproni*. *Parasitol Res*. 2010;107:691-7.
6. Ranganathan S, Menon R, Gasser, RB. Advanced *in silico* analysis of expressed sequence tag (EST) data for parasitic nematodes of major socio-economic importance. Fundamental insights toward biotechnological outcomes. *Biotechnol Adv*. 2009;27:439-48.

