



Figura 1. Geles monodimensionales teñidos con Coomassie Coloidal de muestras enriquecidas en proteínas de citoesqueleto. Izquierda: Tampón High-salt; Derecha: Tampón Low-Salt. Cnt: Macrófagos control; Int: Macrófagos tras la interacción con *C. albicans*.

Para realizar el iTRAQ habría que igualar la concentración de las muestras antes de marcar. Si lo hiciéramos con las muestras extraídas con el tampón High Salt, estaríamos aumentando las concentraciones de las proteínas de la muestra de los macrófagos control, alterando los resultados de la comparación. Con el objeto de cuantificar esta expresión diferencial tan importante, hemos decidido igualar en el número de células de partida en todos los casos y resuspender en el mismo volumen final antes de marcar con iTRAQ.

5.3 Proteómica de Parásitos

Problemática en la identificación de proteínas de parásitos

Javier Sotillo¹, Ana Pérez García¹, María Trelis¹, Dolores Bernal², Carla Muñoz-Antolí¹, José Guillermo Esteban¹, Rafael Toledo¹, Antonio Marcilla¹

¹Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de València

El principal problema al que se enfrentan los investigadores que trabajan en proteómica parasitaria es la falta de genomas completos de los parásitos estudiados. Tan solo se encuentran disponibles los de *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*, [1,2], además de numerosas entradas de DNA depositadas en bases de datos. El hecho de que existan tantas entradas de *Schistosoma* en bases de datos de proteínas ha posibilitado la identificación de numerosas proteínas de otros trematodos como los echinostomátidos [3]. Sin embargo, no siempre

Vamos a comenzar el análisis de las muestras extraídas con el tampón Low-salt, el cual no plantea problemas de concentración y después se procederá al análisis de las muestras extraídas con el tampón High-salt, donde hay un aumento del 150% de las proteínas tras la interacción con la levadura.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología (proyecto BIO-2009-07654) por las ayudas financieras recibidas.

Referencias

- [1] Funchal C, de Almeida LM, Oliveira Loureiro S, Vivian L, de Lima Pelaez P, Dall Bello Pessutto F, *et al.* In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain research* 2003;11:111-8.

pueden usarse bases de datos de otros parásitos para la identificación debido a la falta de homología entre proteínas. Ha de tratarse de proteínas conservadas que mantengan una cierta homología entre diferentes géneros de parásitos. Además, en el caso de *Schistosoma*, casi la mitad de proteínas identificadas de sus transcriptomas no tienen función conocida o son incluso especie-específicas [4,5].

En el caso de *Echinostoma*, no sólo no se tiene el transcriptoma entero, sino que existen muy pocas

ESTs. Tan solo existe una biblioteca de ESTs disponible para *Echinostoma parensei*. Además, esta biblioteca puede considerarse muy pobre con 358 secuencias depositadas si la comparamos con otros trematodos como *Fasciola hepatica* o *Schistosoma haematobium* (con más de 15000 ESTs cada uno). Cuando se intenta identificar el proteoma de *E. caproni*, sólo un pequeño porcentaje de las moléculas analizadas son identificadas correctamente (Figura 1).

Otra de las limitaciones con la que se encuentran los investigadores que trabajan en proteómica

nostomátidos como la enolasa, la GST, la GAPDH, la aldolasa o la Hsp-70 [3,6].

Sin embargo, sigue siendo de vital importancia el dedicar tiempo y esfuerzo en la secuenciación de nuevas EST o de genomas completos de parásitos que ayuden a la identificación de proteínas y que puedan ser de utilidad en la investigación con otros parásitos del mismo orden. Además de la secuenciación genómica, también las herramientas bioinformáticas podrían contribuir al progreso en proteómica parasitaria.

ID Statistics (Protein-Thresholded): 13462 total spectra, 13462 non-empty spectra; 5585305 proteins searched

Unused (Conf) Cutoff	Proteins Detected	Proteins Before Grouping	Distinct Peptides	Spectra Identified	% Total Spectra
>2.0 (99)	19	2490	262	442	3.3
>1.3 (95)	58	4006	532	915	6.8
>0.47 (66)	295	6014	1388	2346	17.4
Cutoff Applied: >1.3 (95%)	58	4006	532	915	6.8

Figura 1. Porcentajes de identificación por Protein Pilot de proteínas de *Echinostoma caproni*. Debido a la poca información útil en las bases de datos, sólo se logra identificar el 6,8% de todos los péptidos cuando se usa un cut-off >1.3 (95%).

parasitaria es la escasez de material parasitario. Los estudios de proteínas se encuentran limitados por la sensibilidad de la espectrometría de masas, y, en última instancia, dependen en gran medida de la cantidad y calidad de material disponible. Debido a la costosa obtención de materiales procedentes del parásito se hace muy difícil la identificación de proteínas parasitarias. Para la mayoría de parásitos (incluido *Echinostoma*) es muy difícil su cultivo *in vitro*, y se depende únicamente de su obtención a partir de hospedadores definitivos. Además, como la mayoría tienen ciclos complejos donde intervienen varios hospedadores intermediarios, además del hospedador definitivo, pocos investigadores pueden disponer del ciclo completo en su laboratorio, habiéndose de conformar con las muestras que les llegan de otros laboratorios, hospitales o pacientes aislados.

Una de las posibles soluciones que pueden ayudar en la identificación de proteínas es usar anticuerpos heterólogos en diferentes técnicas como la de western-blot. Gracias a la mayor sensibilidad de esta técnica respecto de las tinciones de geles, se minimiza la limitación por falta de material en la identificación de proteínas. Aunque esta técnica sólo se pueda usar con proteínas altamente conservadas y pueda ser una técnica muy cara en algunos casos (si se emplean diferentes anticuerpos comerciales), ha servido para identificar muchas proteínas de echi-

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por el proyecto CGL-2005-0231/BOS del Ministerio de Educación y Ciencia (España) y FEDER (EU), los proyectos GV07/006, GVPRE/2008/049 y PROMETEO/2009/081 de la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana. Este trabajo ha sido llevado a cabo mientras el primer autor (J.S.) era beneficiario de una beca predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) y el segundo autor de las becas BC06-284 y BC08-098 de la Universitat de València.

Referencias

- [1] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 2009;460:352-8.
- [2] Schistosoma japonicum Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium, Zhou Y, Zheng H, Liu F, Hu W, Wang ZQ, Gang L, Ren S. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature* 2009;460:345-51.
- [3] Sotillo J, Valero L, Sánchez del Pino MM, Fried B, Esteban JG, Marcilla A, Toledo R. Identification of antigenic proteins from *Echi-*

- nostoma caproni* (Trematoda) recognized by Mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. *Parasite Immunol* 2008;30:271-79.
- [4] Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EAL, Guimaraes PEM, Ojopi EPB et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet* 2003;35:148-57.
- [5] Wilson RA, Ashton, PD, Braschi S, Dillon, GP, Berriman M, Ivens A. "Oming" in on schistosomes: prospects and limitations for post-genomics. *Trends Parasitol* 2003;23:14-20.
- [6] Bernal D, Carpena I, Espert A, De la Rubia JE, Esteban JG, Toledo R, Marcilla A. Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. *Proteomics* 2006;9:2835-43.

Las técnicas de proteómica aplicadas al estudio de las relaciones parásito/hospedador en la dirofilariosis animal y humana

Javier González-Miguel¹, Rodrigo Morchón-García¹, Ana Oleaga², Mar Siles-Lucas², Ricardo Pérez-Sánchez², Fernando Simón¹

¹Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca. ²Laboratorio de Parasitología, IRNA Salamanca (CSIC)

Resumen

En el presente trabajo se emplean técnicas de electroforesis 2D, western blot y espectrometría de masas para analizar la existencia de una base molecular en las relaciones que *Dirofilaria immitis* establece con sus diferentes hospedadores. Se han identificado similitudes y diferencias en las moléculas parasitarias que parecen jugar un papel fundamental en dichas relaciones, en cada hospedador.

Dirofilaria immitis es el agente causante de la dirofilariosis cardiopulmonar canina y felina y de la dirofilariosis pulmonar humana. Tanto el desarrollo del parásito, como las implicaciones clínicas, son diferentes en cada uno de sus 3 hospedadores. En el perro los vermes adultos de *D. immitis* pueden vivir durante más de 7 años produciendo microfilarias y la enfermedad tiene, generalmente, un desarrollo crónico. En el gato los adultos viven solamente 2 años y las infecciones son siempre amicrofilarémicas. La patología tiene un curso imprevisible y habitualmente agudo. En el hombre, *D. immitis* no alcanza el estado adulto. En algunas ocasiones, vermes preadultos se alojan en una rama de la arteria pulmonar, donde embolizan y causan un

nódulo pulmonar benigno que puede confundirse con cáncer en radiología. La comprensión de las relaciones parásito/hospedador en la dirofilariosis precisa de datos sobre las moléculas del parásito y el papel que desempeñan, tanto en el estímulo de los mecanismos patológicos e inmunes, como de los mecanismos de supervivencia. Las técnicas de proteómica son una herramienta muy útil para identificar dichas moléculas y analizar sus funciones. En el presente trabajo, el proteoma de *D. immitis* y los inmunomas obtenidos en cada hospedador, se relacionan los datos biológicos y clínicos de la enfermedad en cada uno de ellos.

Se utilizó un extracto antigénico soluble de vermes adultos de *D. immitis* (DiSB). El proteoma de *D. immitis* fue obtenido mediante electroforesis 2D del extracto DiSB. Las proteínas se tiñeron con nitrato de plata o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la realización del western blot 2D, en las que se incubaron con pools de sueros de los diferentes hospedadores infectados y de controles sanos. *Los spots* que contenían proteínas inmunógenas, se escindieron manualmente de los geles 2D y fueron enviadas al Servicio de Proteómica del CNIC para su correspondiente identificación por espectrometría de masas [1].