

**UNIVERSITAT DE
VALENCIA**



**FACULTAT DE
FARMACIA**

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

*REALIZADO EN EL DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA DE
LA FACULTAT DE FARMACIA DE LA UNIVERSITAT DE VALENCIA, VALENCIA,
ESPAÑA*

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN EL ÍLEON DE RATÓN ASOCIADAS CON EL DESARROLLO DE INFECCIONES CRÓNICAS POR *ECHINOSTOMA CAPRONI*

Por

MIGUEL GARCÍA FERRÚS

Directores

Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO

Dra. CARLA TERESA MUÑOZ ANTOLÍ-CANDELA

Profesores Titulares de Parasitología
Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

24-27 de julio de 2015

RESUMEN

Entre las enfermedades parasitarias que afectan a la humanidad, las helmintiasis intestinales destacan por su gran morbilidad, ya que actualmente afectan a más de 2000 millones de personas y causan grandes pérdidas económicas relacionadas con la ganadería y la veterinaria. *Echinostoma caproni* es un trematodo intestinal que, por sus características, es utilizado en numerosos estudios como modelo experimental para determinar los factores por los que se resuelve una infección aguda o se desarrolla una infección crónica causada por helmintos intestinales. En este trabajo se analizó la expresión diferencial de proteínas durante una primoinfección, después de un tratamiento farmacológico y durante una reinfección por *E. caproni* en el intestino de ratones ICR, hospedadores en los que el parasito desarrolla infecciones crónicas. Las proteínas extraídas del intestino de los ratones se analizaron mediante 2D-DIGE para determinar su expresión diferencial, y aquellas más significativas fueron identificadas mediante espectrofotometría de masas. Se identificaron un total de 38 proteínas, de las cuales la mayoría pertenecían al metabolismo energético, eran antioxidantes o estaban relacionadas con la restauración del epitelio intestinal. Nuestros resultados indican que los cambios que se producen en estos procesos pueden estar relacionados con el establecimiento de infecciones crónicas por helmintos intestinales.

Palabras Clave: *Echinostoma caproni*, expresión proteica, infección crónica, epitelio intestinal, ratón.

ABSTRACT

Among the parasitic infections that affect the humanity, the intestinal helminthiasis stand out for their great morbidity, as currently over 2000 million of persons are affected and they caused important economic loses related with livestock and veterinary. *Echinostoma caproni* is an intestinal trematode that, due to its characteristics, is used in numerous studies as experimental model to investigate the factors related with the resolution of acute infections or the development of chronic infections caused by intestinal helminths. In this work we have analyzed the differential expression of proteins during a first infection, after the pharmacological treatment, and during the reinfection for *E. caproni* in ICR mice, a host where the parasite develops a chronic infection. The proteins extracts of mice's intestines were analyzed by 2D-DIGE to determinate their differential expression, and the most significant were identified by mass spectrometry. 38 proteins in total were identified. Most of them belonged to energetic metabolism, were antioxidants or were related with the intestinal epithelial restauration. Our results indicate that the changes in these processes can be related with the establishment of chronic infection caused by intestinal helminths.

Key Words: *Echinostoma caproni*, protein expression, chronic infection, intestinal epithelium, mice.

ÍNDICE

MATERIAS	Pág.
1- INTRODUCCIÓN	6
2- OBJETIVOS	7
3- MATERIALES	8
3.1- PROCEDENCIA DEL MATERIAL	8
3.2- MATERIAL PARASITOLÓGICO	8
3.3- MATERIAL FARMACOLÓGICO	9
3.4- MATERIAL PROCEDENTE DE HOSPEDADORES	9
4- METODOLOGÍA	11
4.1- MÉTODOS DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL	11
4.1.1- OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE METACERCARIAS	11
4.1.2- INFECCIÓN DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS	11
4.1.3- TRATAMIENTO DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS	12
4.1.4- CONTROL DE INFECCIÓN DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS	14
4.1.5- REINFECCIÓN DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS	15
4.2- MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS	16
4.2.1- SACRIFICIO DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS	16
4.2.2- RECUENTO DE ESPECÍMENES ADULTOS	17
4.2.3- OBTENCIÓN DE LA MUCOSA INTESTINAL	17
4.2.4- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO	19

4.3- MÉTODOS DE ANÁLISIS	20
4.3.1- ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE)	20
4.3.2- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS GELES	21
4.3.3- TINCIÓN CON PLATA DE LOS GELES	22
4.3.4- IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	22
5- RESULTADOS	24
5.1- RESULTADOS DEL RECuento DE ESPECÍMENES ADULTOS	24
5.2- RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE)	25
5.3- RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	29
6- DISCUSIÓN	33
7- CONCLUSIONES	37
8- BIBLIOGRAFÍA	38

1. INTRODUCCIÓN

Las helmintiasis intestinales son enfermedades con grandes repercusiones socio-económicas y en la sanidad humana y animal. Los estudios realizados calculan que alrededor del mundo hay más de 2000 millones de personas infectadas (1). Entre las complicaciones que estas enfermedades pueden causar se encuentran graves problemas gastrointestinales, anemia, retraso en el crecimiento, malnutrición o desarreglos en la función cognitiva, que afectan especialmente a los niños (1-2). Algunos estudios han puesto de manifiesto que los años de vida potencialmente perdidos (DALY) cada año como consecuencia de las helmintiasis intestinales en el mundo suponen más de 39 millones, un valor superior al de otras enfermedades graves como la malaria (3)

Actualmente, la continua aparición de resistencias frente a los fármacos habituales dificulta el control de las infecciones por helmintos (4). Frente a este problema, el desarrollo de vacunas parece el método más efectivo para la prevención y control de estas enfermedades, pero a pesar de los grandes estudios realizados, aun no se dispone de vacunas frente a helmintos intestinales. La falta de resultados se debe principalmente a las estrategias empleadas, que seleccionan antígenos de un modo casi aleatorio (5-6). Estudiar los mecanismos que determinan una infección aguda o una infección crónica de estos parásitos resulta de vital importancia para desarrollar nuevas estrategias dirigidas en la búsqueda de vacunas (6-7).

Frente a este problema, numerosos autores han optado por usar modelos experimentales para estudiar los cambios que condicionan la expulsión o permanencia de los helmintos intestinales en su hábitat. El modelo *E. caproni*-roedor utilizado en este trabajo ha sido ampliamente utilizado en estudios previos, debido a que se trata de un echinostómato bien estudiado, que presenta un ciclo sencillo, fácil y económico de mantener en el laboratorio; y diversos hospedadores definitivos, permitiendo comparar variables solo dependientes del hospedador (8). Este trabajo busca estudiar la expresión proteica diferencial, como una de estas variables, en el intestino de ratones ICR.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo Final de Grado es un proyecto experimental que tiene como principal objetivo estudiar la diferente expresión proteica entre la primoinfección crónica y la reinfección crónica de *Echinostoma caproni* en ratones de la cepa ICR. Para ello, en el presente trabajo se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- Estudiar la capacidad infectante de *Echinostoma caproni* en reinfecciones crónicas mediante el recuento de las formas adultas en los hospedadores definitivos.
- Comparar las posibles diferencias entre la expresión proteica de los hospedadores que presentan la infección y los que no la presentan.
- Evidenciar las posibles diferencias entre la expresión proteica de los hospedadores que sufren una primoinfección y los que sufren una reinfección.
- Estudiar los cambios en la expresión de proteínas que se producen en la mucosa intestinal de los hospedadores definitivos tras el tratamiento farmacológico de la infección.
- Identificar específicamente aquellas proteínas expresadas diferencialmente en la reinfección respecto a la primoinfección.

3. MATERIALES

3.1- PROCEDENCIA DEL MATERIAL

En este trabajo se ha utilizado el parásito *Echinostoma caproni* (9), un trematodo digénido donado originariamente por el Dr. B. Fried del Departamento de Biología del Lafayette College (Easton, Pennsylvania, EEUU). *E. caproni* posee un ciclo biológico triheteroxeno acuático, sin fases tisulares en el hospedador definitivo, que resulta sencillo de mantener en los laboratorios (10). En el Departamento de Parasitología de la Universidad de Valencia se mantiene su ciclo y se dispone de todos sus estadios evolutivos.

3.2- MATERIAL PARASITOLÓGICO

Las metacercarias de *E. caproni* necesarias para infectar a los hospedadores definitivos fueron recogidas experimentalmente del riñón, cavidad pericárdica, pie, manto y superficie corporal de caracoles de la especie *Biomphalaria glabrata* (8) infectados en los laboratorios con las cercarias del parásito.

Tras infectar a los hospedadores definitivos con las metacercarias recogidas, se obtuvieron los adultos del parásito que se desarrollaron en el íleon de los hospedadores definitivos, en este caso ratones ICR. La posterior necropsia permitió evidenciar su presencia en el hospedador así como el recuento de adultos.

Finalmente, utilizamos también los huevos del parásito que se desarrollaron en los úteros de las formas adultas de *E. caproni*. A pesar de que este trabajo no tiene por estudio este estadio del parásito, los huevos han resultado útiles para confirmar la infección en los hospedadores definitivos, ya que son liberados por los vermes a la luz intestinal y eliminados por las heces del hospedador definitivo (10).

3.3- MATERIAL FARMACOLOGICO

E. caproni es un helminto trematodo y, como tal, su tratamiento farmacológico habitual es la administración de Praziquantel (11), un fármaco antihelmíntico de amplio espectro que actúa sobre el verme paralizando a la forma adulta y facilitando su expulsión. Para el tratamiento de la infección de los hospedadores definitivos en este trabajo se ha utilizado Praziquantel comercial (*Sigma-Aldrich, U.S.A.*).

En este proyecto también se ha utilizado el fármaco Isoflurano para llevar a cabo el sacrificio de los hospedadores definitivos, un anestésico general utilizado comúnmente en veterinaria (12). Para el desarrollo experimental de este trabajo se obtuvo Isoflurano comercial de uso veterinario (*Laboratorios Dr. Esteve, España*).

3.4- MATERIAL PROCEDENTE DE HOSPEDADORES

En este proyecto se ha utilizado como hospedador definitivo de *E. caproni* exclusivamente ratones de la cepa ICR, que son considerados un hospedador de alta compatibilidad con este parásito (13), en el que ocasionan infecciones de carácter crónico. Para ello, se adquirió comercialmente un total de 80 ejemplares de ratón común (*Mus musculus*) de la cepa ICR (*Laboratorios Charles River, U.S.A.*).

Uno total de 64 animales fueron empleados para los experimentos. Un total de 48 ejemplares se infectaron en primer lugar con las metacercarias del parásito, mientras que 16 ejemplares se mantuvieron sin infectar y fueron utilizados como controles. De los ratones infectados, 32 se trataron con Praziquantel para eliminar la infección y 16 no recibieron tratamiento. Finalmente, de los ejemplares tratados, 16 se seleccionaron para ser infectados de nuevo con las metacercarias de *E. caproni*.

Según el diseño descrito y representado en la figura 1, podemos dividir a los hospedadores definitivos en 4 grupos diferentes: Un grupo A de 16 ratones que formaron el grupo control del experimento; un grupo B de 16 ratones infectados de forma primaria; un grupo C de 16 ratones infectados de forma primaria y tratados con Praziquantel; y un grupo D de 16 ratones infectados de forma primaria, tratados con Praziquantel y, posteriormente, reinfectados.

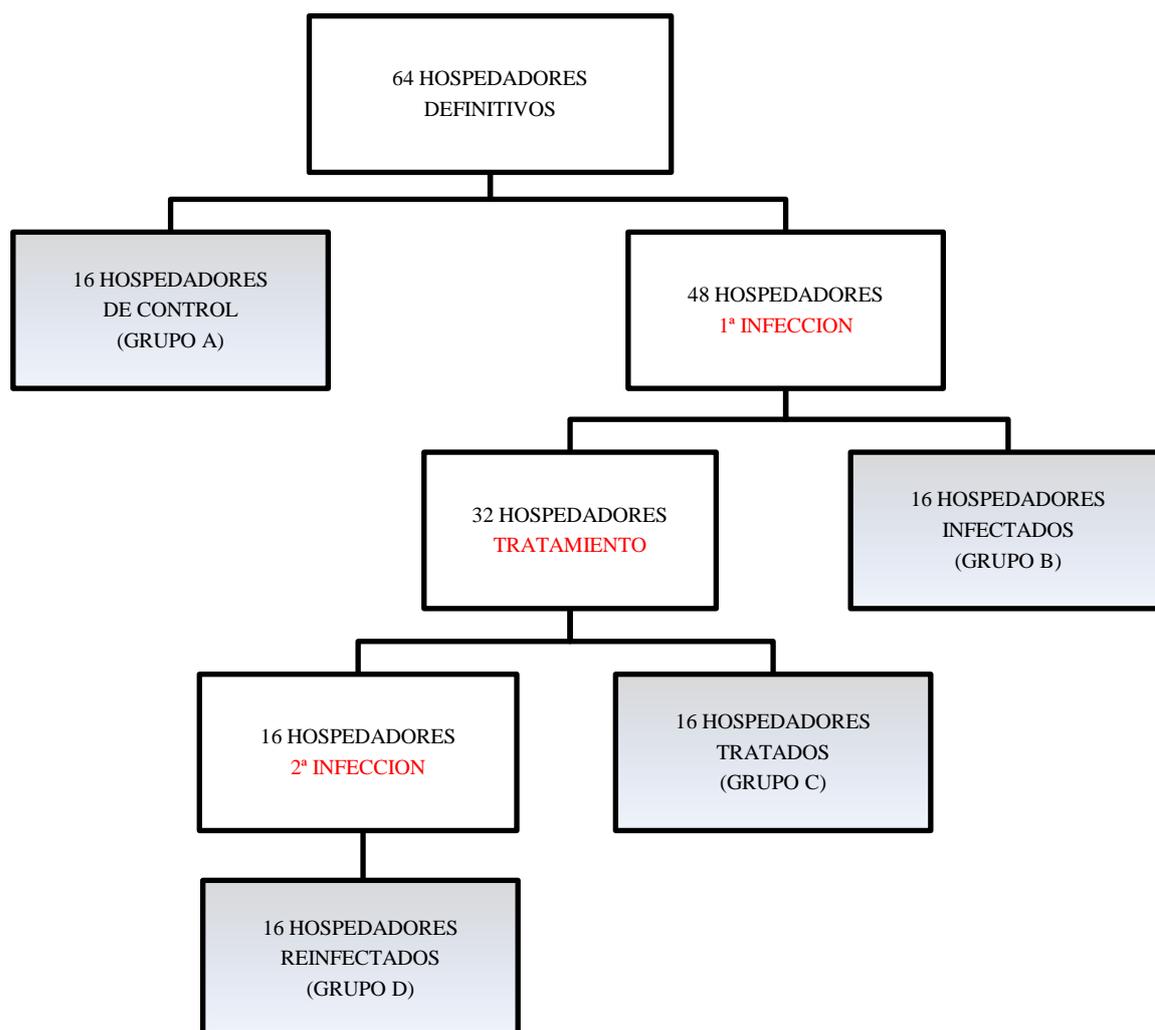


Figura 1.- Diseño del proyecto experimental. Organigrama de los grupos de hospedadores definitivos.

Todos los animales utilizados se mantuvieron en el estabulario del SCSIE (Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental) situado en la Facultad de Farmacia, que cuentan con el certificado de calidad ISO 9001:2008 (14). Todos los animales se mantuvieron en las condiciones adecuadas según la normativa vigente (15-17), con un régimen estándar y alimentados *ad libitum*.

4. METODOLOGÍA

4.1- MÉTODOS DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1.1- OBTENCION Y CONSERVACION DE LAS METACERCARIAS

En su ciclo biológico, la metacercaria de *E. caproni* es la forma infectante para el hospedador definitivo. Esta forma parásita se encuentra presente en los segundos hospedadores intermediarios (*B. glabrata*), por lo que mantener a estos hospedadores y obtener de ellos las metacercarias resulta de especial importancia.

El cuidado de los segundos hospedadores intermediarios y las técnicas experimentales necesarias para su infección se realiza de forma rutinaria en los laboratorios (18). Una vez infectados con las cercarias, las metacercarias enquistadas se localizan principalmente en la zona pericárdica y en los riñones de los gasterópodos que actúan como segundos hospedadores intermediarios.

Para obtener las metacercarias es necesario diseccionar al caracol y realizar una cuidadosa búsqueda de los quistes. Si no se utilizan de forma inmediata para infectar a hospedadores definitivos, las metacercarias permanecerán viables si se recogen en viales de vidrio cerrados, rellenos de agua mineral natural y se conservan en un medio refrigerado a 4°C hasta su utilización.

4.1.2- INFECCION DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS

El procedimiento seguido para las infecciones primarias y secundarias de los ratones fue idéntico. Los ratones utilizados como hospedadores definitivos en este trabajo fueron infectados cada uno con 50 de las metacercarias obtenidas de la disección de los especímenes de *B. glabrata*.

Para llevar a cabo la infección, las metacercarias se recolectan en grupos de 50, utilizando para ello la ayuda de una lupa binocular y una lanceta. Una vez agrupadas se recogen con una pipeta Pasteur y se separan en una serie de placas Petri acondicionadas con agua mineral natural. Las placas Petri preparadas se trasladan a la zona de manipulación animal del estabulario de la Facultad y allí se lleva a cabo esta infección. Para que la infección tenga lugar, las metacercarias deben ser ingeridas por el hospedador definitivo y, por este motivo, la técnica de infección consiste en la introducción de una cánula que actuará como sonda gástrica. En el mínimo volumen posible de agua se recogen las 50 metacercarias con una jeringuilla de 1 ml de capacidad, a la que se acopla una cánula metálica con unas dimensiones de 0.8 x 25 mm. Finalmente, se inmoviliza al ratón, se le introduce la cánula a modo de sonda gástrica y las metacercarias se le administran por vía oral.

4.1.3- TRATAMIENTO DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS

El tratamiento de elección para tratar la infección por *E. caproni* es el fármaco Praziquantel, un derivado sintético de la isoquinolina-pirazina. El Praziquantel es un fármaco antihelmíntico muy eficaz y de amplio espectro. Su principal mecanismo de acción es la alteración de la homeostasia del ion calcio en el verme. El Praziquantel se une selectivamente a la subunidad β de los canales de calcio regulados por voltaje situados en la membrana plasmática del parásito y facilita la entrada de este ion. El aumento de la concentración de calcio en el citoplasma del parásito induce una contracción muscular rápida y prolongada, desencadenando una parálisis espástica y la muerte del verme, que pierde su capacidad de fijación a la microvellosidades intestinales. Además, el Praziquantel rompe el tegumento del parásito, desenmascarando nuevos antígenos al sistema inmune del hospedador, que hacen al parásito más sensible a las respuestas inmunitarias normales (19). En general, el Praziquantel es considerado un fármaco seguro y de mínimos efectos adversos a dosis terapéuticas. Salvo contadas excepciones, en las que se ha demostrado mejores resultados con fármacos alternativos, se considera al Praziquantel el fármaco de primera elección para la mayoría de las especies de tremátodos y algunos céstodos, así como para el tratamiento masivo de infecciones múltiples, al ser útil, selectivo, seguro y eficaz en una sola dosis oral (20).

Para establecer la dosis de Praziquantel que había que administrar a los hospedadores definitivos se tuvo en cuenta el estudio publicado por *Ferraz et al.* (2012) (21), en el que se determinó que la dosis de Praziquantel óptima para tratar un ratón *M. musculus* infectado con 75 metacercarias era de 100 mg de fármaco por cada Kg de peso corporal disueltos en Cromophor al 2%. A pesar de que la dosis infectante empleada en este trabajo contuvo un número un poco menor de metacercarias (50 metacercarias), se decidió mantener la dosis de tratamiento y aplicar dos dosis totales a días alternos para garantizar la erradicación total de los parásitos, ya que de esta parte dependían los resultados de las fases posteriores de la experimentación. La cantidad de Praziquantel necesaria por dosis se calculó teniendo en cuenta que el peso medio de los 32 hospedadores a tratar era de 38 g y que cada ratón podía ingerir un volumen de 120 μ l de la disolución medicamentosa. Para alcanzar la dosis de 100 mg/kg, se necesitaba 3,8 mg de Praziquantel por hospedador definitivo, lo cual implicaba una concentración de la disolución medicamentosa de 31,6 mg/ml. El volumen total se estableció en 5 ml, al calcular el volumen exacto que consumirían los hospedadores (3,84 ml) y sumarle una cantidad extra que permitiera manejar la disolución cómodamente en el laboratorio. Al multiplicar la concentración deseada por los 5 ml que se querían preparar se calculó unos 158 mg necesarios de Praziquantel. La disolución medicamentosa final se obtuvo a mezclar la cantidad total de Praziquantel en 5 ml de una disolución de Cromophor al 2%. Como el Praziquantel es poco soluble en el Cromophor, esta disolución debe prepararse en agitación continua para garantizar que el fármaco se disuelva y evitar que sedimente.

El tratamiento de los hospedadores definitivos infectados por *E. caproni* se realizó mediante una jeringuilla unida a una cánula metálica, similar a la utilizada para la infección. A cada animal se le administraron dos dosis orales de 3,8 mg de Praziquantel en 120 μ l mediante sonda gástrica a días alternos, acompañada después por un poco de agua natural para limpiar los posibles restos de fármaco que quedarán en la jeringuilla y la cánula. Cabe recordar que, de los 48 hospedadores definitivos que fueron infectados, se trató solo a 32 en total: un grupo de 16 ratones para estudiar el efecto del tratamiento, y otro grupo de 16 ratones para estudiar la reinfección. El tratamiento tuvo lugar a las 4 semanas post-infección.

4.1.4- CONTROL DE INFECCION EN LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS

Debido a la importancia que tiene el correcto tratamiento farmacológico en el desarrollo experimental, se decidió realizar un control de infección en los 32 hospedadores tratados con Praziquantel para garantizar que el tratamiento había resultado efectivo. Este control consistió en un examen de las heces de cada animal para detectar la presencia de huevos de *E. caproni*. Para ello, transcurridos 15 días del tratamiento que aseguraron la total expulsión de los vermes, se colocaron los hospedadores definitivos tratados con Praziquantel en jaulas individuales y se recogieron sus heces por separado. Se estableció una muestra suficiente de 3 muestras de heces por cada ejemplar, que se recogieron en viales secos, estériles y cerrados herméticamente hasta el momento de su examen. Finalmente se procedió al análisis de las heces para detectar la presencia de huevos de *E. caproni* mediante la técnica de Kato-Katz (22). Esta técnica permite la detección y cuantificación de huevos de helmintos en heces formes sin necesidad de añadirles ningún fijador, y consiste en deshacer las heces raspándolas sobre una superficie dura con una espátula plana y hacerlas pasar a través de una rejilla de 500 μm de diámetro, para limpiarlas lo máximo posible de fibras y restos de alimentos sin digerir. Una vez filtradas, se recogen con la espátula y se deposita en un portaobjetos la cantidad que cabe en el molde de una placa o plantilla de 6 x 1,5 mm específica para esta técnica, que corresponde a 41,7 mg de muestra. Finalmente, se añade sobre las heces un cuadro de papel celofán impregnado en una solución de colorante verde de Malaquita y se extiende la muestra de forma uniforme por compresión. Tras el tiempo necesario para que actúe la disolución, se observa la muestra al microscopio y se buscan los huevos, que permanecerán sin teñir y resaltarán sobre el fondo verde de la preparación. Los huevos de *E. caproni* se pueden reconocer por presentar una morfología característica: son ovalados, operculados y de unas dimensiones de 122 X 75 μm (23).

El objetivo principal de la realización de la técnica de Kato-Katz a las heces de los hospedadores definitivos tratados con Praziquantel es determinar la presencia o no de una infección por *E. caproni*. En el caso de que no haya presencia de huevos del parásito se considera que la prueba ha dado un resultado negativo y es indicador de que la infección del hospedador definitivo se ha resuelto correctamente. En el caso de que se evidencie la presencia de huevos del parásito y la prueba de un resultado positivo significa que el tratamiento farmacológico no ha sido eficaz y que aún persiste la infección de *E. caproni*. En este caso es necesario repetir el tratamiento con Praziquantel y la técnica de Kato-Katz hasta comprobar que el tratamiento ha resultado eficaz. En nuestro caso, el tratamiento

farmacológico resulto eficaz en todos los hospedadores definitivos y a las 2 semanas se procedió a la necropsia de 16 animales.

4.1.5- REINFECCION DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS

Para llevar a cabo la reinfección fue necesario asegurarse de que el tratamiento con el Praziquantel administrado había sido efectivo en los hospedadores definitivos seleccionados. En este caso, ya se había comprobado la efectividad del tratamiento la técnica de Kato-Katz en todos los hospedadores tratados, así que podemos estar seguros de que la infección primaria de *E. caproni* se resolvió correctamente.

Las técnicas de reinfección se aplicaron sobre uno de los grupos de 16 hospedadores definitivos que recibieron el tratamiento farmacológico a las 2 semanas de la última dosis de Praziquantel. La reinfección se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento experimental con el que se llevó a cabo la infección. Se agruparon dosis de 50 metacercarias en placas Petri con agua mineral natural, se recogieron en una jeringuilla de 1 ml con el mínimo volumen posible, y se administraron al hospedador definitivo por vía oral a través de una cánula que actuó como una sonda gástrica.

4.2- MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS

4.2.1- SACRIFICIO DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS

Para poder realizar el desarrollo experimental de este trabajo fue necesaria la disección de los hospedadores definitivos. La disección se llevó a cabo en el laboratorio tras el sacrificio indoloro de los animales mediante la inhalación de una sobredosis de Isoflurano, un fármaco sedante autorizado para uso veterinario. El Isoflurano es un anestésico general que se administra por vía inhalatoria y que actúa de forma inespecífica sobre el sistema nervioso central, principalmente sobre el tálamo, hipocampo, medula espinal y corteza cerebral. Su mecanismo de acción consiste en la disminución de la transmisión sináptica, inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitadores, abriendo los canales de potasio y potenciando la acción del GABA (19). Como consecuencia, se produce una pérdida de la consciencia, una disminución de respuesta a los estímulos dolorosos y una pérdida de los reflejos, lo que lo convierte en un fármaco idóneo para el sacrificio incruento de los hospedadores definitivos (24).

Los hospedadores eran colocados individualmente en un recipiente de vidrio cerrado herméticamente, en el que se había introducido algodones empapados en el fármaco volátil. Tras la inhalación del Isoflurano los animales quedaban sedados y, tras unos minutos, terminaban por fallecer por la acción depresora del medicamento sobre los reflejos cardiovasculares y respiratorios.

Tras el sacrificio, los animales fueron diseccionados inmediatamente para evitar que el transcurso del tiempo facilitara la migración intraorgánica de los vermes. Para la disección se realiza un corte longitudinal en el abdomen, que va desde la zona anal hasta el esternón y, posteriormente, se realizan sendos cortes transversales a nivel torácico. Una vez abierto se extraen las vísceras para recoger el intestino delgado, ya que el íleon es el lugar de fijación de las formas adultas del parásito.

4.2.2- RECUENTO DE ESPECÍMENES ADULTOS

A la hora de realizar la disección del intestino delgado de los hospedadores definitivos se analizó la presencia de *E. caproni* en dos de los diferentes grupos de nuestro proyecto experimental: en el grupo de la primoinfección y en el grupo de la reinfección. Para ello, se realizó un recuento del número de adultos del parásito en cada uno de los hospedadores definitivos tal como se describe a continuación: el intestino delgado se colocó cuidadosamente en una placa Petri con solución fisiológica y, bajo una lupa binocular, se procedió a su apertura longitudinal. Durante este procedimiento se buscaron minuciosamente los adultos de *E. caproni* fijados a las microvellosidades intestinales, prestando especial atención a aquellas zonas del intestino que se observaban distendidas o inflamadas. Utilizando pinzas quirúrgicas los adultos se recuperaban y se trasladaban con cuidado a nuevas placas Petri con solución fisiológica. Al finalizar la apertura, se recontaban las formas adultas y se registraba el valor obtenido.

4.2.3- OBTENCION DE LA MUCOSA INTESTINAL

Para estudiar la expresión proteica de los hospedadores definitivos en las diferentes condiciones experimentales de la infección por *E. caproni* fue necesario recoger sus mucosas intestinales, tejido celular en el que tiene lugar la infección y la respuesta inmunitaria local del hospedador.

Como en el grupo de los hospedadores definitivos controles y en el grupo de los hospedadores tratados con Praziquantel no hay parásitos, la apertura de los intestinos delgados se realiza en el momento de obtener su mucosa intestinal. Para evitar que aparezcan diferencias entre estos grupos y los que sí presentan parásito, una vez abiertos el intestino y buscado las formas adultas de *E. caproni*, se procede a realizar el protocolo de obtención de mucosa intestinal inmediatamente. De esta forma evitamos que la mucosa de los intestinos abiertos pueda degradarse por la acción del tiempo.

Se decidió analizar un total de 4 muestras por cada grupo de hospedadores definitivos. Para que la cantidad de proteínas de cada muestra fuera suficientemente elevada para su análisis, se optó porque cada muestra fuera una réplica biológica constituida por la misma cantidad de proteínas procedentes de 4 hospedadores definitivos. De este modo se cuadruplica el número de animales a analizar, aumenta la cantidad de proteínas presentes en cada muestra y se asegura obtener unos resultados claros con menor error debido a variaciones individuales. Para obtener las células de la mucosa intestinal de los hospedadores se procedió a realizar el protocolo de aislado de células intestinales descrito por *Hansson et al.* (2011) (25) que se detalla a continuación.

En primer lugar se abre el intestino longitudinalmente y se limpia de contenido con 40 ml de una disolución de HBSS (solución salina equilibrada de Hank) a 4°C y FCS (suero de ternera fetal) al 2%. Este lavado se realiza en agitación vigorosa durante 3 min y se repite tantas veces como sea necesario, renovando la solución de lavado hasta obtener un sobrenadante limpio y claro. A continuación, se prepara una disolución de HBSS que contenga FCS al 10%, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a 1 mM, DTT (1,4-ditiotreitol) a 1 mM, 100 unidades de Penicilina por ml de disolución y Estreptomicina a 100 ng/ml. Los 4 intestinos de cada muestra se cortan en trozos de 1 cm de largo y se colocan juntos en agitación vigorosa durante 20 minutos a 37°C en esta solución de disociación. Se recoge el sobrenadante con la suspensión de células, se guarda en frío y se repite el proceso una vez más. El sobrenadante que se obtiene se mezcla con el anterior. A continuación, se hace pasar la suspensión obtenida por un filtro para células de 100 µm y se recoge en un tubo Falcon. Este filtro dejará pasar las células intestinales y retendrá las impurezas que la suspensión pueda contener. Finalmente, se centrifuga la suspensión celular a 500 rpm durante 20 minutos a 4°C para precipitar las células. El sobrenadante se desecha y las células precipitadas se resuspenden en 2 ml de PBS (tampón fosfato salino) a 4°C para su conservación.

4.2.4- OBTENCION DEL EXTRACTO PROTEICO

Una vez obtenidas las células intestinales de los hospedadores definitivos es necesario extraer las proteínas que contienen las células. La extracción de la fracción proteica se llevó a cabo con el tampón de lisis comercial *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent* (*Thermo Scientific, U.S.A.*) y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, modificado en el laboratorio y descrito a continuación: En primer lugar se coloca la suspensión celular en un tubo Falcon y se centrifuga a 250 g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y se realiza un lavado añadiendo otros 2 ml de PBS limpio y volviendo a centrifugar de igual manera. Tras el lavado, se estima el volumen que ocupa el precipitado de células y se añaden 20 volúmenes iguales del tampón de lisis. Este tampón está formado por detergentes no desnaturizantes que disuelven las membranas plasmáticas. En nuestro procedimiento experimental se estimó un volumen de precipitado de 100 μ l y se añadieron 2 ml del tampón de lisis a cada una de las muestras. Además del tampón de lisis, por cada 10 ml de reactivo añadidos se debe incorporar a las muestras 100 μ l de IC (Cóctel de inhibidores de proteasas) adquirido a la misma marca, que evitará la degradación de las proteínas por la acción de las proteasas presentes en las células. Como previamente introducimos un total de 2 ml de tampón de lisis, se añade la cantidad de 20 μ l de IC a nuestras muestras. Una vez incorporado, se resuspende el precipitado por la acción de un agitador vórtex. La mezcla obtenida se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Una vez finaliza la incubación, se clarifica el lisado de células centrifugándola a 18000 g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado estará formado por los restos celulares y se desechará, mientras que el sobrenadante, que contiene la fracción proteica extraída de las células, se recoge en un tubo de microcentrifuga y se almacenará a -80°C hasta el momento de su análisis.

4.3- MÉTODOS DE ANÁLISIS

4.3.1- ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE)

Las 4 muestras con los extractos proteicos procedentes de los 4 grupos de hospedadores definitivos se sometieron a análisis mediante 2D-DIGE. Esta técnica consiste en el marcado de las proteínas con fluoróforos CyDye y su separación por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. La finalidad de utilizar esta técnica es identificar aquellas proteínas que se expresan en diferente cantidad según las condiciones experimentales a las que se somete cada grupo de hospedadores. Este método se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del SCSIE, a cargo de la Dra. L. Cantero González-Salazar.

El primer paso de esta técnica es el marcado de las proteínas con un kit comercial de marcado por fluoróforos CyDye (*GE Healthcare, U.K.*). Empleamos fluoróforos CyDye Cy3 o Cy5 para marcar el extracto proteico de las muestras, y fluoróforo CyDye Cy2 para marcar el estándar interno de los geles. Todos los fluoróforos se reconstituyeron y se utilizaron según las especificaciones del fabricante. El estándar interno se prepara a partir de alícuotas de cada una de las muestras que participan en el experimento, es decir, a partir de las 16 muestras. Este estándar permite que cada proteína presente en una muestra esté representada en todos los geles al mismo tiempo. Con esto se conseguía mejorar el posterior análisis diferencial, aumentando la fiabilidad del emparejamiento de los diferentes puntos del gel (*spots*) y los cálculos estadísticos entre los distintos geles. A continuación se preparan 8 geles para las 4 muestras del grupo control, las 4 muestras del grupo infectado, las 4 muestras del grupo tratado y las 4 muestras del grupo reinfectado. En cada gel se colocan 2 muestras y el estándar interno marcados con fluoróforos diferentes, ya que esta técnica permite la separación de hasta 3 muestras proteicas en un mismo gel. Esta característica permite que distintas muestras puedan estar sujetas a las mismas condiciones de corrido. Cada fluoróforo se utilizó en la mitad de las muestras para evitar variabilidad. El diseño final del experimento 2D-DIGE puede verse en la Tabla 1.

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	EI	C-1	T-1
2	EI	C-2	T-2
3	EI	T-3	C-3
4	EI	T-4	C-4
5	EI	I-1	R-1
6	EI	I-2	R-2
7	EI	R-3	I-3
8	EI	R-4	I-4

Tabla 1.- Diseño de los experimentos 2D-DIGE con extractos de proteínas de células epiteliales intestinales de hospedadores definitivos control (C), infectados con *E. caproni* (I), tratados con Praziquantel (T) y reinfectados con *E. caproni* (R). Cada muestra de cada grupo de hospedadores definitivos se encuentra numerada del 1 al 4. EI: Estándar Interno.

Una vez preparados los geles, se aplica la técnica de electroforesis bidimensional para separar las diferentes proteínas en función de su punto isoeléctrico y su peso molecular. Al finalizar la técnica obtenemos un gel en el que las proteínas están distribuidas diferencialmente entre la primera y segunda dimensión.

4.3.2- ANALISIS DE LOS GELES

La misma proteína marcada con fluoróforos distintos se encontrará en la misma posición del gel, y se podrá visualizar de forma independiente utilizando las longitudes de ondas específicas para cada fluoróforo. El programa informático *Typhoon 9400 Variable Mode Imager* permitió crear imágenes digitales de cada uno de los geles para su posterior análisis. Una vez obtenidas las imágenes, el análisis estadístico diferencial se realizó con el programa informático *DeCyder Differential Analysis Software*. Este programa detecta, cuantifica, empareja y analiza estadísticamente las imágenes de los geles obtenidos por el método 2D-DIGE. El programa obtiene datos sobre diferencias en los niveles de proteínas obtenidos con cada fluoróforo y proporciona su significación estadística teniendo en cuenta el estándar interno.

4.3.3- TINCIÓN CON PLATA DE LOS GELES

Una vez se analizó las diferencias en la expresión de las proteínas procedentes de las distintas muestras se realizó una tinción con plata de los geles de referencia de cada experimento 2D-DIGE. Esta tinción es la habitual para revelar la presencia de los *spots* de proteínas en geles de poliacrilamida, ya que permite su visualización directa sin otras fuentes de iluminación alternativas y es compatible con la técnica de espectrofotometría de masas para análisis posteriores. Se realiza añadiendo un reactivo de Nitrato de Plata (AgNO_3), de modo que el ion de plata (Ag^+) reacciona con algunos grupos funcionales de las proteínas reduciéndose a plata (Ag^0) y revelando la presencia de los *spots* en el espectro visible.

4.3.4- IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS

Una vez realizado el análisis diferencial y haber aplicado a los datos los requisitos estadísticos descritos en el apartado 5.2 de la sección de Resultados de este trabajo, se procedió a la identificación de los *spots* proteicos. Se extrajeron las porciones del gel que contenían cada *spot* y se sometieron a la técnica de espectrofotometría de masas, que nos proporcionó para cada *spot* el identificador *GenInfo* (número GI) de las proteínas presentes en él. Este número, asignado por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), es único para cada secuencia proteica e independiente de la fuente de datos que se utilice. Se seleccionó el GI de aquellas proteínas con mayor presencia en el *spot* y se utilizó para identificar la proteína, de forma contrastada, en dos bases de datos diferentes: *PubMed* y *UniProt*. Estas bases de datos nos proporcionaron el nombre de la proteína, su secuencia de aminoácidos, su función biológica y su localización a nivel celular. Posteriormente se utilizó la secuencia de la proteína para determinar su punto isoelectrico y peso molecular aproximado en la base de datos *ExpASy*, y comprobar que se adecuara a la posición del gel en la que se encontraba con respecto a otras proteínas.

La base de datos *BLAST* fue utilizada para aquellos casos en los que el GI de la proteína mayoritaria correspondiera a un producto proteico no identificado. En esta situación se selecciona el GI de la segunda proteína mayoritaria en el *spot* y se identificó. A continuación se comparó su secuencia de aminoácidos con la de la proteína no identificada en una de las herramientas que ofrece *BLAST*. En la totalidad de nuestros casos las secuencias eran idénticas a excepción de unos pocos aminoácidos, por lo que concluimos que se trataban de polimorfismos de las mismas proteínas.

5. RESULTADOS

5.1- RESULTADOS DEL RECuento DE ESPECIMENES ADULTOS

Los resultados del recuento de las formas adultas que se encontraron cuando se abrieron los intestinos delgados de los 32 ratones infectados por *E. caproni* aparecen en la tabla 2. Estos resultados se expresan como la media de los adultos encontrados en cada una de las muestras de los diferentes grupos, siendo cada una de ellas una réplica biológica constituida por el intestino de 4 hospedadores definitivos.

GRUPO DE INFECCIÓN PRIMARIA				GRUPO DE REINFECCIÓN			
I-1	I-2	I-3	I-4	R-1	R-2	R-3	R-4
31,75	32	33,50	19,75	20	8,50	12	10

Tabla 2.- Media de las formas adultas del parásito encontradas en los intestinos delgados de los hospedadores definitivos infectados con *E. caproni* (I) y re infectados con *E. caproni* (R). Cada muestra de cada grupo está formada por 4 hospedadores definitivos y se encuentra numerada del 1 al 4.

Los resultados muestran que las medias de los adultos de *E. caproni* encontrados en las muestras del grupo de la reinfección son en general menores que las encontradas en el grupo de la infección primaria. Además, en el momento de la necropsia se pudo apreciar a simple vista que los adultos obtenidos del grupo de la reinfección eran de menor tamaño que los obtenidos del grupo de la infección primaria.

5.2- RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DIFERENCIAL EN GELES BIDIMENSIONALES (2D-DIGE)

La comparación a las 4 semanas post-infección entre los perfiles de expresión proteica del hígado de los ratones controles, infectados, tratados y reinfectados con *E. caproni* reveló un total de 521 *spots* con un 85% de presencia (7 de 8 geles) en los diferentes geles del experimento 2D-DIGE. Se realizó un análisis estadístico multivalente de estos datos para ver si, de acuerdo a los perfiles de expresión proteica globales, se podían agrupar las diferentes muestras del estudio según los similares que fuesen (26). En este trabajo se aplicaron dos de las principales herramientas estadísticas utilizadas en proteómica: el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de patrones por agrupamiento jerárquico. En las figuras 2 y 3 se puede ver los resultados de los análisis aplicados.

Como se observa en las figuras 2 y 3 tanto el PCA como el análisis de patrones por agrupamiento jerárquico son capaces de separar nuestras muestras en dos grupos: los que presentan infección por *E. caproni* y los que no la presentan. La figura 2 muestra los resultados del PCA y se observa como las muestras de ambos grupos parecen separadas por el primer componente principal (vertical) y dentro de la elipse de normalidad (95% de confianza).

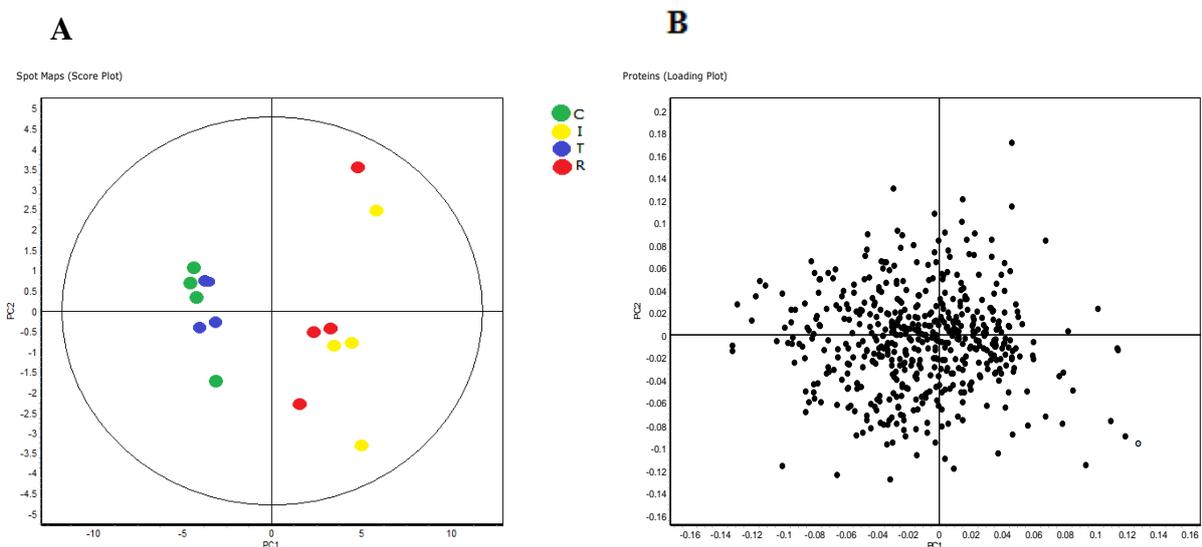


Figura 2.- Representación esquemática de los resultados del PCA aplicado al set de 521 proteínas con un 85% de presencia aisladas de las muestras de hígado de hospedadores definitivos control (C), infectados con *E. caproni* (I), tratados con Praziquantel (T) y reinfectados con *E. caproni* (R). El gráfico de puntuación A representa la separación de las muestras estadísticamente similares, mientras que el gráfico de contribución B muestra como contribuye estadísticamente a la separación cada una de las 521 proteínas.

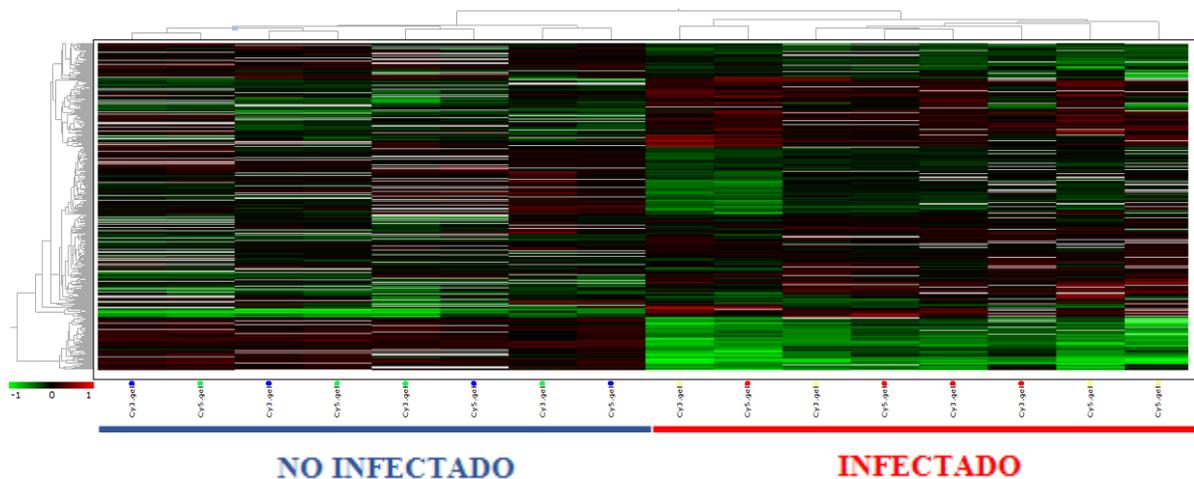


Figura 3.- Resultados del agrupamiento jerárquico aplicado al set de 521 proteínas con un 85% de presencia. El dendograma horizontal agrupa las diferentes muestras según su similitud en infectados por *E. caproni* y no infectados, mientras que el dendograma vertical agrupa las diferentes proteínas según el mismo criterio en sobreexpresadas (Rojo) e infraexpresadas (Verde).

La figura 3 muestra los resultados del análisis de patrones por agrupamiento jerárquico. Cada columna representa uno de las muestras del experimento y cada fila una de las proteínas. Como se puede ver en el dendograma horizontal, el análisis estadístico es capaz de agrupar las muestras en dos grupos (infectados con *E. caproni* o no) y las proteínas del dendograma vertical en otros dos (infraexpresadas o sobreexpresadas).

El análisis estadístico, que se llevó a cabo con el programa *DeCyder Differential Analysis Software* utilizando un t-test de Student, un Anova One Way y aplicando el factor *False Discovery Rate* (FDR), resolvió de forma automática un total de 254 proteínas expresadas de forma diferencial entre los 4 grupos de muestras, aplicando un p-valor \leq a 0,05 (95% de confianza). Ante este gran número de proteínas diferencialmente expresadas se optó por aplicar una serie de criterios que nos permitieran seleccionar aquellas con mayor diferencia y significación estadística: se restringió el p-valor a \leq 0,01 (99% de confianza) y se validó manualmente la presencia y calidad de cada uno de los *spots*. Aplicando los diferentes criterios de selección se escogieron los 51 *spots* más representativos y se extrajeron de los geles de poliacrilamida para ser identificados por espectrometría de masas. La figura 4 muestra de forma esquemática los resultados obtenidos en el 2D-DIGE y los criterios de selección aplicados.

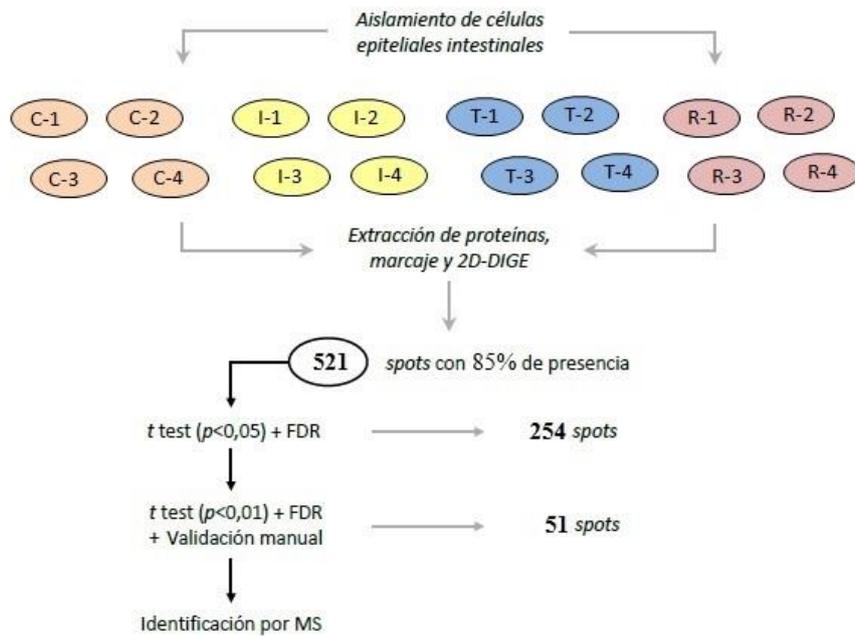


Figura 4.- Representación esquemática de los resultados del experimento 2D-DIGE y los criterios aplicados para la selección de los *spots* con mayor diferencia y significación estadística en la comparación de 4 muestras de íleon de hospedadores definitivos control (C), infectados con *E. caproni* (I), tratados con Praziquantel (T) y reinfectados con *E. caproni* (R).

Una vez aplicados los criterios de selección, se realizó un nuevo PCA y un nuevo análisis de patrones por agrupamiento jerárquico, esta vez solo teniendo en cuenta los *spots* diferencialmente expresados. Los resultados pueden verse en las figuras 5 y 6. Al realizar los análisis con las proteínas diferencialmente expresadas ambos métodos estadísticos vuelven a separar las muestras en dos grupos (los que presentan infección por *E. caproni* y los que no la presenta), poniendo de manifiesto que estas diferencias de expresión son suficientes para explicar las diferencias existentes entre ambos grupos biológicos. La figura 5 muestra los resultados del PCA, separando ambos grupos por el componente principal 1 (vertical) y sin mostrar valores extremos o atípicos. Los resultados del análisis de patrones por agrupamiento jerárquico aparecen en la figura 6, que muestra como los dendogramas horizontal y vertical separan en dos grupos las muestras y las proteínas de forma más clara que en el caso anterior. En ambos casos, los métodos estadísticos no fueron capaces de separar los 4 grupos de muestras entre sí, indicado similitud en el patrón de expresión proteica entre los hospedadores controles y los hospedadores tratados con Praziquantel y entre los hospedadores infectados con *E. caproni* y los hospedadores reinfectados.

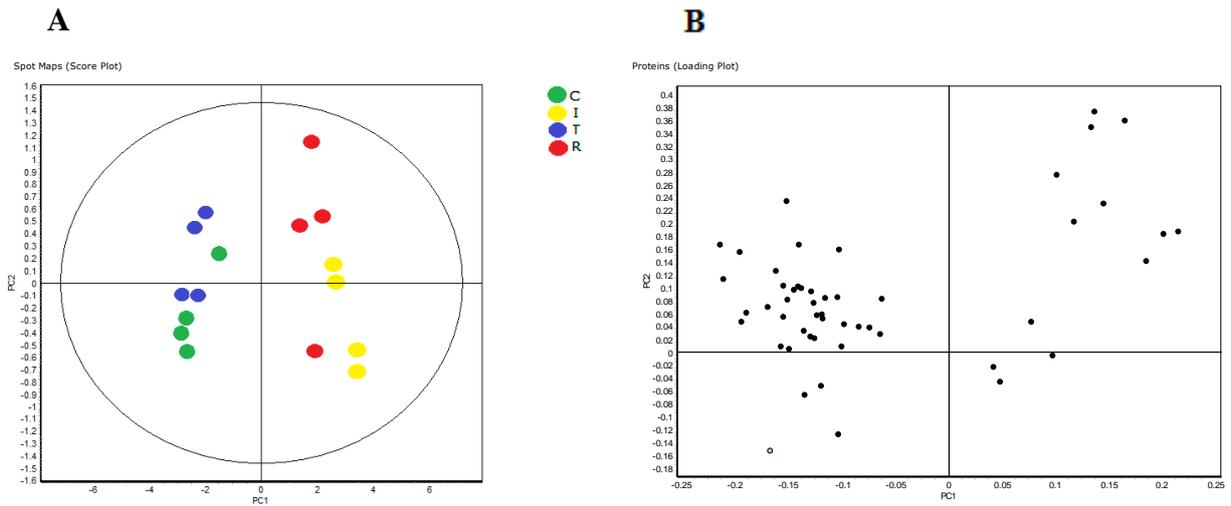


Figura 5.- Representación esquemática de los resultados del PCA aplicado al set de 521 proteínas con un 85% de presencia aisladas de las muestras de fleon de hospedadores definitivos control (C), infectados con *E. caproni* (I), tratados con Praziquantel (T) y reinfectados con *E. caproni* (R). El gráfico de puntuación A representa la separación de las muestras estadísticamente similares, mientras que el gráfico de contribución B muestra como contribuye estadísticamente a la separación cada una de las 521 proteínas.

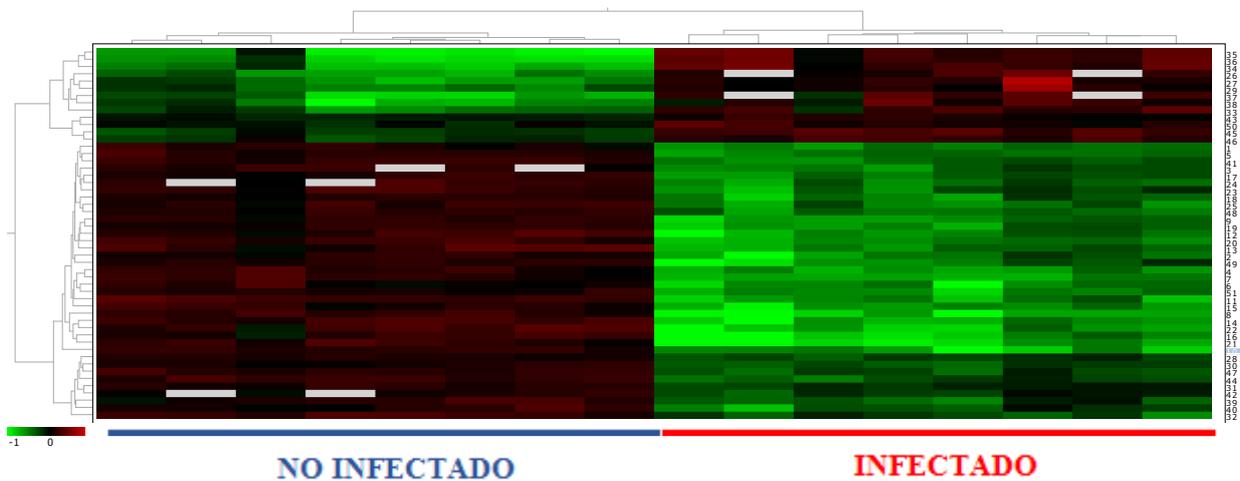


Figura 6.- Resultados del agrupamiento jerárquico aplicado al set de las 51 proteínas seleccionadas. El dendograma horizontal agrupa las diferentes muestras según su similitud en infectados por *E. caproni* y no infectados, mientras que el dendograma vertical agrupa las diferentes proteínas según el mismo criterio en sobreexpresadas (Rojo) e infraexpresadas (Verde).

El análisis estadístico de los 51 *spots* reveló que no existían diferencias en la expresión proteica del grupo tratado con Praziquantel respecto al grupo control. Sin embargo, aunque el análisis multivariante no ha sido capaz de separar las muestras, sí que existen diferencias en la expresión de 14 *spots* entre la primoinfección y la reinfección (t-test $\leq 0,05$). Los resultados estadísticos pueden verse en la tabla 3 y muestran los 14 *spots* con sus valores en el t-test de Student y su Av. Ratio, que cuantifica la diferencia de expresión en el grupo de la reinfección respecto al grupo de la primoinfección indicando, el número de veces en la que es superior la cantidad de proteína.

Grupo Infección vs Reinfección		
Spot	Av. Ratio	t-test
1184	+1,98	0,041
1234	+1,91	0,0067
1262	+2,74	0,0085
1305	+1,59	0,0292
1316	+1,88	0,0093
1330	+1,82	0,0336
1547	+2,48	0,0133
1555	+2,1	0,0228
1556	+1,86	0,0311
1897	+1,37	0,0021
2630	+1,88	0,0432
2651	+1,62	0,0167
3653	+2,49	0,012
4025	+1,43	0,0954

Tablas 3.- Resultados de los análisis estadísticos para los 14 *spots* expresados diferencialmente entre las muestras de los hospedadores infectados y las muestras de los hospedadores reinfectados. La expresión diferencial está cuantificada mediante el Av. Ratio.

5.3- RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Los *spots* proteicos seleccionados por el análisis diferencial para su identificación por espectrofotometría de masas pueden verse en la figura 7. Esta figura muestra la imagen de un gel 2D-DIGE representativo teñido con plata, en el que se encuentra marcados los 51 *spots* expresados diferencialmente.

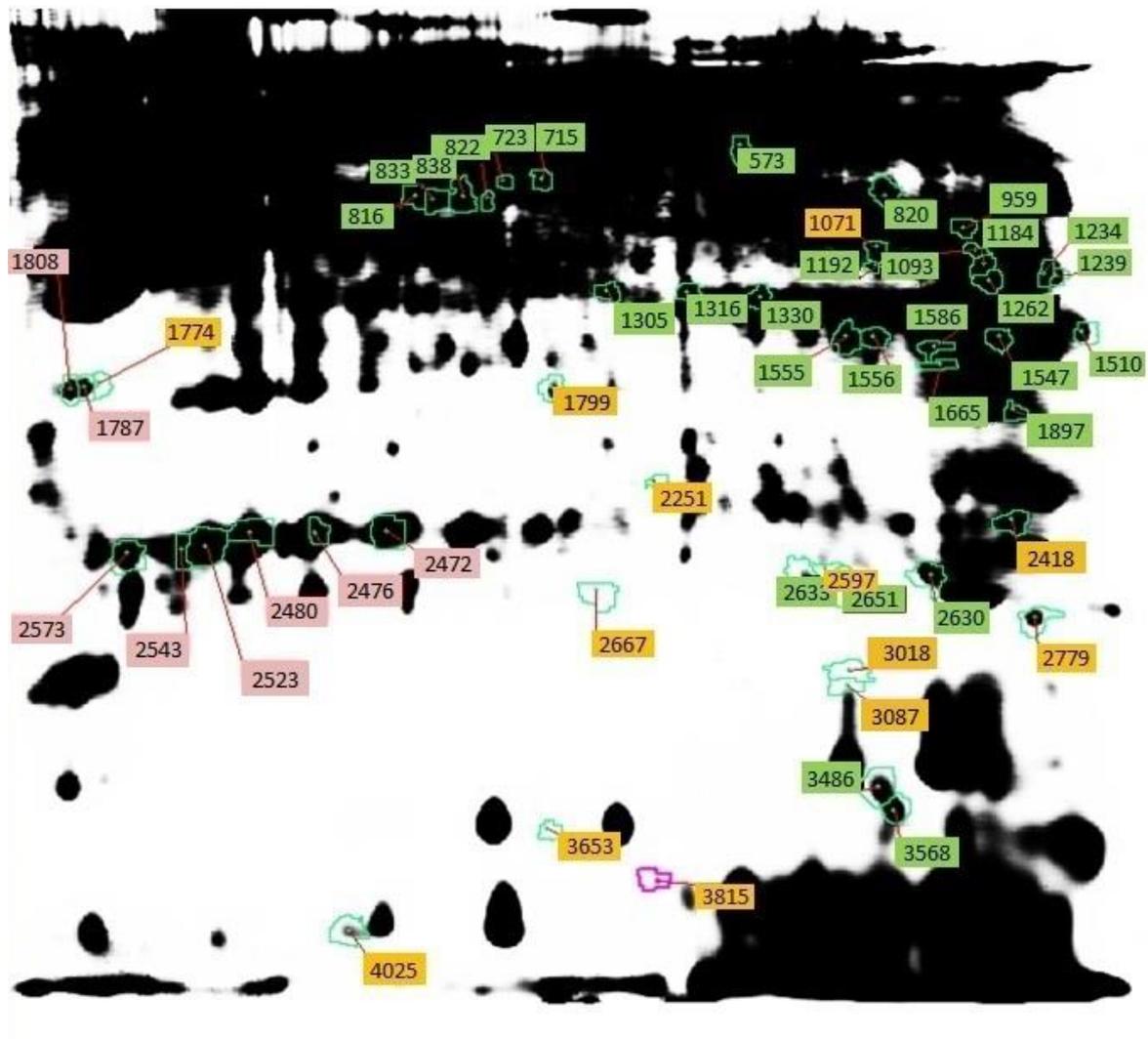


Figura 7.- Imagen representativa de un gel 2D-DIGE teñido con plata. Los 51 *spots* seleccionados para ser analizados por espectrofotometría de masas aparecen señalados según su expresión diferencial en: sobreexpresados (Rojo), infraexpresados (Verde) o no identificados (Amarillo). La identificación de los *spots* puede verse en la Tabla 4.

Los resultados de los datos proporcionados por la espectrofotometría de masas y analizados según está descrito en el apartado 4.3.4 de la sección de Métodos y Técnicas aparecen resumidos en la tabla 4. La identificación de las proteínas solo fue posible para 38 de los 51 *spots* seleccionados por el análisis diferencial, debido a que solo se pudo extraer de forma segura del gel 42 *spots*, y a que los 4 *spots* restantes (1799, 2418, 3018 y 3087) correspondían a contaminaciones de las muestras por queratinas humanas. Para cada *spot* se proporciona los datos de su identificación por espectrofotometría, los datos de la proteína identificada y su expresión diferencial, según si la infección por *E. caproni* induce o inhibe su expresión con respecto al grupo de hospedadores control.

Spot	Identificación	Especie (GI)	Exp.	Rol celular	Localización	Cov. (%)	Score
573	Glutamato Deshidrogenasa	Mus musculus (6680027)	-	Metabolismo del Glutamato	Matriz Mitocondrial	60,39	51.9
715	Alfa Enolasa o Enolasa 1B	Mus musculus (70794816)	-	Glicolisis	Citoplasma y Membrana Celular	39,86	22.55
723	Ornitina Aminotransferasa	Mus musculus (8393866)	-	Metabolismo de la Ornitina	Matriz Mitocondrial	32,57	17.85
816	Ornitina Aminotransferasa	Mus musculus (8393866)	-	Metabolismo de la Ornitina	Matriz Mitocondrial	44,87	34.31
820	Fumarato Hidratasa	Mus musculus (226823367)	-	Ciclo de Krebs	Matriz Mitocondrial	37,08	18.2
822	Prelamina A/C	Mus musculus (74220666)	-	Componente Estructural de la Lámina Nuclear	Núcleo	12,46	11.22
833	Ornitina Aminotransferasa	Mus musculus (8393866)	-	Metabolismo de la Ornitina	Matriz Mitocondrial	33,71	19.89
838	Ornitina Aminotransferasa	Mus musculus (8393866)	-	Metabolismo de la Ornitina	Matriz Mitocondrial	35,76	22.09
959	Fosfoglicerato Kinasa 1	Mus musculus (74216774)	-	Glicolisis	Citoplasma	44,12	20.26
1093	Subun. 2 del Complejo Citocromo bc1	Cricetulus griseus (537196799)	-	Fosforilación Oxidativa	Membrana Mitocondrial	10,80	6.02
1184	Fructosa Bifosfato Aldolasa A	Mus musculus (7548322)	-	Glicolisis y Gluconeogénesis	Citoplasma	37,09	23.34
1192	Queratina tipo I citoesqueleto 19	Mus musculus (6680606)	-	Componente Estructural del Músculo	Periferia Celular	25,81	16.18
1234	Aspartato Aminotransferasa	Mus musculus (6754036)	-	Metabolismo de Aminoácidos y Transporte Lipídico	Matriz Mitocondrial y Membrana Celular	29,30	22.76
1239	Aspartato Aminotransferasa	Mus musculus (74213886)	-	Metabolismo de Aminoácidos y Transporte Lipídico	Matriz Mitocondrial y Membrana Celular	11,41	4.20
1262	Fructosa Bifosfato Aldolasa	Mus musculus (74195643)	-	Glicolisis	Citoplasma	50,27	37.33
1305	Aldosa 1-Epimerasa	Mus musculus (28892785)	-	Metabolismo de Carbohidratos	Citoplasma	7,31	4.0
1316	Transaldolasa	Mus musculus (33859640)	-	Vía de las Pentosas Fosfato	Citoplasma	34,42	9.97
1330	Alcohol Deshidrogenasa	Mus musculus (74226780)	-	Metabolismo de Xenobioticos	Citoplasma y Membrana Apical	36,31	13.1
1510	Malato Deshidrogenasa	Fukomys damarensis (731204855)	-	Ciclo de Krebs	Matriz Mitocondrial	31,66	10.38
1547	Malato Deshidrogenasa	Mus musculus (31982186)	-	Ciclo de Krebs	Matriz Mitocondrial	52,96	31.43

1555	Lactato Deshidrogenasa	Mus musculus (74208131)	-	Fermentación Láctica	Citoplasma, MP, Núcleo y Mitochondrias	46,67	27.16
1556	Lactato Deshidrogenasa	Mus musculus (74208131)	-	Fermentación Láctica	Citoplasma, MP, Núcleo y Mitochondrias	37,58	18.12
1586	Lactato Deshidrogenasa	Mus musculus (74208131)	-	Fermentación Láctica	Citoplasma, MP, Núcleo y Mitochondrias	29,09	13.99
1665	Annexina A2	Mus musculus (6996913)	-	Proteína de Unión a Membrana Regulada por Calcio	Citoplasma y Membrana Celular	16,81	10.6
1787	Annexina A5	Mus musculus (74188752)	+	Coagulación Sanguínea	Membrana Celular	22,57	9.56
1808	Annexina A5	Mus musculus (74188752)	+	Coagulación Sanguínea	Membrana Celular	16,30	6.47
1897	Queratina tipo II citoesqueleto 1	Fukomys damarensis (676264984)	-	Componente Estructural	Periferia Celular	5,29	5.73
2472	Queratina tipo I citoesqueleto 19	Mus musculus (6680606)	+	Componente Estructural del Músculo	Periferia Celular	23,08	12.38
2476	Queratina tipo I citoesqueleto 19	Mus musculus (6680606)	+	Componente Estructural del Músculo	Periferia Celular	23,08	14.5
2480	Queratina tipo I citoesqueleto 19	Mus musculus (6680606)	+	Componente Estructural del Músculo	Periferia Celular	13,15	8.54
2523	Queratina tipo I citoesqueleto 19	Mus musculus (6680606)	+	Componente Estructural del Músculo	Periferia Celular	13,65	7.97
2543	Queratina tipo II citoesqueleto 1	Fukomys damarensis (676264984)	+	Componente Estructural	Periferia Celular	5,15	9.61
2573	Queratina tipo I citoesqueleto 19	Microtus ochrogaster (532051023)	+	Componente Estructural	Periferia Celular	15,14	9.4
2630	Glutación S-Transferasa P1	Mus musculus (10092608)	-	Metabolismo de Xenobioticos	Citoplasma, Núcleo y Mitochondrias	3,54	2.0
2633	Superóxido Dismutasa	Mus musculus (832851)	-	Enzima con Actividad Oxidoreductasa	Matriz Mitocondrial	6,31	2.0
2651	Peroxiredoxina 1	Mus musculus (74198890)	-	Enzima con Actividad Peroxidasa	Citoplasma	5,03	2.0
3486	Petidil-Protil Cis-Trans Isomerasa A	Cricetulus griseus (625224152)	-	Enzima con Actividad Isomerasa	Núcleo	6,98	3.93
3568	Peroxiredoxina 5	Mus musculus (74220848)	-	Enzima con Actividad Peroxidasa	Mitochondrias	5,29	2.0

Tabla 4.- Identificación por espectrofotometría de masas de las proteínas expresadas diferencialmente. Los números de los *spots* corresponden a los indicados en la Tabla 3 y Figura 7. La expresión de los *spots* está indica sobreexpresión (+) o infraexpresión (-).

6. DISCUSIÓN

El conocimiento de los cambios que se producen en las células del epitelio intestinal (CEI) durante las infecciones por helmintos intestinales es de especial importancia para esclarecer los mecanismos y circunstancias que llevan a que se establezca una infección aguda o una crónica en el hospedador. Nuestro estudio se ha centrado en determinar los principales cambios en la expresión proteica de las CEI de ratones en una primoinfección y en una reinfección a las 4 semanas post-infección secundaria.

La expresión diferencial de proteínas a las 2 semanas post-infección en ratones infectados por *E. caproni* ha sido estudiada recientemente por Cortés et al. (27). Los resultados de nuestro estudio muestran que las proteínas más afectadas por la infección de *E. caproni* a las 4 semanas post-infección primaria son las proteínas del metabolismo energético, lo que corrobora los resultados obtenidos en su estudio. La infraexpresión de la fumarato hidratasa (AVR: -4,17) y la malato deshidrogenasa (AVR: -16,56) muestran una disminución del ciclo de Krebs en las CEI del íleon de los ratones infectados, mientras que la infraexpresión de la subunidad 2 del complejo citocromo bc₁ (AVR: -7) indica una disminución en la fosforilación oxidativa. Estos fenómenos se han relacionado con un deterioro de la función mitocondrial, de la producción de ATP y, en general, del mantenimiento de la homeostasis energética de las células (28).

La disfunción mitocondrial se ha relacionado con numerosas enfermedades y con el envejecimiento, porque provoca un incremento del estrés oxidativo a nivel intracelular (29). La disminución de la fosforilación oxidativa que muestran nuestros resultados está relacionada con el escape de electrones de la cadena respiratoria y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (30). El aumento de las ROS en la célula produce daño en su DNA, lípidos y proteínas, que termina por inducir la muerte celular y provocar daño tisular (29). Normalmente las enzimas antioxidantes se inducen como respuesta al estrés oxidativo para contrarrestar el efecto de las ROS, por lo que la infraexpresión de enzimas, como la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD; AVR: -4,26), que observamos en las CEI de nuestro estudio favorece la acumulación de ROS en las células (31).

La MnSOD es una enzima mitocondrial que cataliza la reacción de conversión del ion superóxido a agua oxigenada y oxígeno, y se ha demostrado que inactivar su expresión en ratones induce toxicidad por ROS y apoptosis celular (32). La infección del parásito en el íleon de los ratones se caracteriza por un daño tisular y una respuesta inflamatoria local (33). Nuestros resultados parecen confirmar lo propuesto en el estudio de la infección a las 2 semanas post-infección (27): que la inhibición de la MnSOD tiene un papel positivo en la restitución epitelial. Además de su papel disminuyendo el estrés oxidativo, otros autores han demostrado que la deficiencia MnSOD promueve el recambio celular (34), por lo que la inhibición de esta enzima puede estar relacionado con la hiperproliferación celular inducida por la infección crónica de *E. caproni*.

La infraexpresión de la MnSOD se encuentra relacionada con el metabolismo de la ornitina (27). En nuestro estudio la ornitina aminotransferasa (AVR: -13,81) se infraexpresa en las muestras de los hospedadores infectados con *E. caproni*, confirmando el resultado obtenido en el estudio previo de Cortés et al (27). Estos autores proponen que la inhibición del metabolismo de la ornitina favorece su biodisponibilidad para la síntesis de poliaminas, como la espermidina, la espermina o la putrescina, moléculas involucradas en la proliferación celular (35). Del mismo modo, otro indicador importante de esta hiperproliferación celular son las queratinas, como la queratina tipo I citoesqueleto 19 (AVR: +7,74), cuya sobreexpresión en nuestros resultados se relaciona con la presencia de hiperplasia en el íleon de ratones (27).

A pesar de todas las similitudes con el estudio realizado a 2 semanas post-infección (27), nuestros resultados muestran diferencias en el patrón de expresión diferencial de algunas proteínas. Cortés et al. (27) encontraron sobrepresadas enzimas que intervienen en la glicólisis y en el metabolismo anaerobio, tales como la α -enolasa o la lactato deshidrogenasa (LDH), proponiendo un incremento de la vía anaerobia como fuente alternativa de energía para la célula. Sin embargo, las CEI aisladas del íleon de los ratones a las 4 semanas post-infección primaria ven inhibidas ambas vías del metabolismo energético. Nuestro estudio demuestra una infraexpresión de la LDH (AVR: -11,26) y de la α -enolasa (AVR: -5,61), al mismo tiempo que la de otras enzimas que intervienen en las mismas vías metabólicas y en el metabolismo de carbohidratos, como la fosfoglicerato kinasa 1 (AVR: -5,84) o la transaldolasa (AVR: -5,18). Estas diferencias en la expresión de las proteínas parecen ser debidas al diferente periodo post-infección que existe entre ambos estudios. Nuestros

resultados indican que la expresión proteica de las CEI varía a lo largo del tiempo post-infección, lo que abre una nueva línea de estudio para futuras investigaciones.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de los grupos control y tratados farmacológicamente muestran que no existen diferencias significativas en su expresión proteica. Esto indica que, tras la eliminación del parásito, el epitelio intestinal se regenera rápida y completamente y que las CEI vuelven a presentar su expresión proteica normal, lo que hace más relevantes los resultados obtenidos en la reinfección de los hospedadores y explicados más adelante. Las alteraciones en la homeostasia del epitelio intestinal pueden comprometer la estabilidad de los parásitos y dar lugar a su eliminación, aunque la efectividad este mecanismo depende en gran medida de cada modelo parasito-huésped y los mecanismos de evasión del helminto (36). Estudios recientes han demostrado que la expresión de proteínas implicadas en la formación y mantenimiento del epitelio intestinal dificultan el establecimiento y el desarrollo de las formas adultas de *E. caproni* en el intestino de sus hospedadores (37). Nuestro estudio pone de manifiesto que la regeneración de las CEI en ratones ICR es rápida y efectiva tras la eliminar la primoinfección, de modo que el recambio de las CEI y la expresión de estas proteínas podría ser mecanismos que explicaran el menor recuento y tamaño de adultos hallados en nuestros resultados.

Al igual que entre el grupo tratado y el grupo control, nuestros resultados indican que no existe una diferencia significativa entre el patrón de expresión proteica general entre el grupo de la primoinfección y el grupo de la reinfección. Esta similitud en la expresión proteica de los animales resulta coherente, si se tiene en cuenta que los ratones de la cepa ICR son hospedadores definitivos de alta compatibilidad con *E. caproni*, en los que el parásito es capaz de establecer infecciones de carácter crónico incluso tras una primoinfección (13). Sin embargo, nuestros resultados muestran que sí que existen proteínas que se expresan de forma diferencial en la reinfección con respecto a la primoinfección. A pesar de que la infección por *E. caproni* inhibe su expresión con respecto a la de los controles, 9 proteínas metabólicas, 1 queratina y 2 proteínas antioxidantes se han hallado en mayores cantidades en las CEI de los ratones re infectados. Las 9 proteínas metabólicas expresadas diferencialmente forman parte del metabolismo energético y del metabolismo de carbohidratos, destacando en su expresión la fructosa bifosfato aldolasa (AVR: +2,74) de la glicólisis, la malato deshidrogenasa (AVR: +2,48) del ciclo de Krebs y la LDH (AVR: +2,1) de la fermentación láctica. Como sugieren

nuestros resultados, poseer un metabolismo energético más activo podría ser uno de los mecanismos adaptativos de las CEI a reinfecciones por *E. caproni*.

Finalmente, es necesario que se lleven a cabo un mayor número de estudios en modelos experimentales sobre los cambios que se producen en el epitelio intestinal en este tipo de infecciones antes de que podamos esclarecer los mecanismos por los que se establecen estas parasitosis.

7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden obtener de este Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

- El establecimiento y el desarrollo de *E. caproni* se ve afectado en aquellos hospedadores que ya han sido expuestos previamente a una infección primaria, puesto que las medias y el tamaño de las formas adultas encontradas es notablemente menor.
- La administración de dos dosis de 100 mg/Kg de Praziquantel a días alternos es completamente eficaz para la erradicación de una dosis infectiva de 50 metacercarias de *E. caproni*.
- La disfunción mitocondrial y la hiperproliferación inducidas en las células del epitelio intestinal infectadas con *E. caproni* pueden ser dos de los mecanismos que contribuyen al establecimiento de infecciones crónicas en los ratones ICR.
- Las células del epitelio intestinal de los ratones ICR vuelven a presentar su expresión proteica normal tras una infección primaria por *E. caproni*, lo que indica que el epitelio intestinal se regenera rápida y completamente.
- La reinfección crónica induce una mayor expresión del metabolismo energético en las células epiteliales intestinales de los ratones ICR, lo que puede ser un mecanismo adaptativo a la exposición repetida de *E. caproni*.
- El sistema *E. caproni*-ratón es un buen modelo experimental para el análisis de las interacciones parasito-hospedador y los mecanismos por los que se establecen las infecciones por helmintos intestinales.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1- World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2008.
- 2- Drake LH, Jukes MCH, Sternberg RJ & Bundy DAP. Geohelminth infections (ascariasis, trichuriasis, and hookworm): Cognitive and developmental impacts. *Sem Pediatr Inf Dis*. 2000; 11(4): 245-51.
- 3- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich-Sachs S & Sachs JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med*. 2006; 3(5): e102.
- 4- Stepek G, Buttle D.J, Duce IR & Behnke JM. Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required?. *Int J Exp Pathol*. 2006; 87(5): 325-41.
- 5- Elliott DE & Weinstock JV. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Ann NY Acad Sci*. 2012; 1247: 83-96.
- 6- Vercruyse J, Knox DP, Schettters TP & Willadsen P. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol*. 2004; 20(10): 488-92.
- 7- Harris NL. Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design? *Trends Parasitol*. 2011; 27(7): 288-93.
- 8- Toledo R, Muñoz-Antolí C, Marcilla A, Fried B & Esteban JG. Los echinostomátidos como modelo para el estudio de las interacciones parásito-hospedador. *Rev Ibérica Parasitol*. 2006; 66(1-4): 83-93.
- 9- Fujino T & Fried B. Expulsion of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) Kanev, 1985 and retention of *E. caproni* Richard, 1964 (Trematoda: Echinostomatidae) in C3H mice: pathological, ultrastructural, and cytochemical effects on the host intestine. *Parasitol Res*. 1993; 79(4): 286-92.
- 10- Toledo, R. & Fried, B. Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. *Trends Parasitol*. 2005; 21(6): 251-4.
- 11- Laboratory identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern (DPDx). Echinostomiasis: Treatment Information [Monografía de Internet]. Atlanta: Center of Diseases Control and Prevention (CDC); 2015 [Acceso 1 de Julio de 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/dpdx/echinostomiasis/tx.html>

- 12- Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Medicamentos Veterinarios Autorizados [Monografía de Internet]. Madrid: AEMPS; 2015 [Acceso 1 de Julio de 2015]. Disponible en: www.aemps.gob.es/medicamentosVeterinarios/Med-Vet-autorizados/home.htm
- 13- Cortés A, Muñoz-Antolí C, Martín-Grau C, Esteban JG, Grecis RK & Toledo R. Differential alterations in the small intestine epithelial cell turnover during acute and chronic infection with *Echinostoma caproni* (Trematoda). *Parasit Vectors*. 2015; 8(1): 334.
- 14- Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental. Ficha de la Sección de Producción Animal [Monografía de Internet]. Valencia: Universitat de Valencia; 2015 [Acceso 23 de Abril de 2015]. Disponible en: www.uv.es/otri/buscador-de-oct/RECURSOS/OCTRS-SCSIE-ANI.pdf
- 15- Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Modificada por: Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- 16- Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- 17- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- 18- Toledo R, Muñoz-Antoli C & Fried B. The use of echinostomes to study host-parasite relationships between larval trematodes and invertebrate and cold-blooded vertebrate hosts. *Parasitol Res*. 2007; 100(6): 1177-85.
- 19- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ & Henderson G. *Farmacología*. 7ª Ed. Barcelona: Elsevier; 2012.
- 20- Katzung BG, Masters SB & Trevor AJ. *Farmacología básica y clínica*. 12ª Ed. Mexico: Mc Graw Hill; 2013.
- 21- Ferraz J, Souza J, Costa-Silva M, Torres E, Santana A, Lanfrendi R, et al. Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. *Parasitol Res*. 2012; 111(1): 143-8.
- 22- Sohn WM, Kim HJ, Yong TS, Eom KS, jeong HG, Kim JK, et al. *Echinostoma ilocanum* infection in Oddar Meanchey Province, Cambodia. *Korean j Parasitol*. 2011; 49(2): 187-90.
- 23- Fujino T, Nakano T, Washioka H, Tonosaki A, Ichikawa H & Fried B. Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni*, and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol Res*. 2000; 86 (5): 427-30.
- 24- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoht EM, Bromage N, Bunyan J, et al. Recommendation for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Lab anim*. 1996; 30(1): 293-316.

- 25- Hansson J, Panchaud A, Favre L, Bosco N, Mansourian R, Benyacoub J, et al. Time-resolved quantitative proteome analysis of in vivo intestinal development. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10(3): M110.005231
- 26- Meunier B, Dumas E, Piec I, Béchet D, Hébraud M & Hocquette J. Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. *J Proteome Res*. 2007; 6(1): 358-66.
- 27- Cortés-Carbonell, A. Análisis de las interacciones parasito-hospedador en el modelo *Echinostoma caproni*, con énfasis en los factores que determinan el curso de la infección. Tesis Doctoral, dirigida por Toledo R. 2015; Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Valencia.
- 28- Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005; 39: 359-407.
- 29- Song BJ, Akbar M, Abdelmegeed MA, Bvun K, Lee B, Yoon SK, et al. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox Biol*. 2014; 3: 109-23.
- 30- Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, et al. Evidence of ROS generation by mitochondrial in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*. 2007; 7(1-2): 106-18.
- 31- Ji LL, Gomez-Cabrera MC & Vina J. Role of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007; 32(5): 930-5.
- 32- Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA & Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the SOD2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(5): 2278-83.
- 33- Trelis M, Sotillo J, Monteagudo C, Fried B, Marcilla A, Esteban J.G, et al. *Echinostoma caproni* (Trematoda): Differential in vivo cytokine responses in high and low compatible hosts. *Exp Parasitol*. 2011; 127(2): 387-97.
- 34- Zhao Y, Oberley TD, Chaiswing L, Lin SM, Epstein CJ, Huang TT, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene*. 2002; 21(24): 3836-46.
- 35- Wallace HM, Fraser AV & Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*. 2003; 376(1): 1-14.
- 36- Grencis RK. Immunity to Helminths: Resistance, Regulation, and Susceptibility to Gastrointestinal Nematodes. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33: 201-25.
- 37- Muñoz-Antoli C, Cortés A, Sotillo J, Fried B, Esteban JG & Toledo R. Differential expression and glycosylation of proteins in the rat ileal epithelium in response to *Echinostoma caproni* infection. *J Proteomics*. 2014; 101: 169-78.