

Informe final publicable de proyecto

Proteómica comparativa y mecanismos de reparación del tegumento de cestodos, una estructura esencial en la interacción hospedero-parásito

Código de proyecto ANII: FCE_1_2021_1_166701

Fecha de cierre de proyecto: 01/12/2024

KOZIOL ANTMANN, Uriel (Responsable Técnico - Científico)

GARCÍA, Jonathan (Investigador)

IRIARTE ODINI, Andrés (Investigador)

RAMÍREZ MENZA, Gabriel (Investigador)

ROSENZVIT, Mara (Investigador)

VELAZCO, Rafael (Investigador)

GUARNASCHELLI ROVIRA, Inés (Becario)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Los platelmintos parásitos (cestodos, trematodos y monogéneos) causan numerosas enfermedades de importancia para la salud humana y animal, especialmente en países en vías de desarrollo. En lugar de una epidermis clásica, estos parásitos cuentan con un tegumento especializado, que consiste en un sincitio superficial (llamado tegumento distal) conectado mediante puentes citoplasmáticos a cuerpos celulares sumergidos debajo de la membrana basal. El tegumento distal es la superficie de interacción con el hospedador, y enfrenta por lo tanto diferentes tipos de daños físicos, químicos y mecánicos durante los procesos de infección. En este proyecto, realizamos estudios proteómicos comparativos del tegumento de tres especies de cestodos: *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis microstoma* y *Mesocestoides corti*. Identificamos proteínas enriquecidas en el tegumento de estas especies, confirmando la expresión tegumentaria de un subgrupo de las mismas. Mediante la comparación de nuestros resultados con los ya existentes en la literatura, identificamos proteínas tegumentarias compartidas entre cestodos y trematodos, definiendo por lo tanto un núcleo central de proteínas presentes en el tegumento de platelmintos parásitos. Entre estas proteínas enriquecidas en el tegumento de todos los platelmintos parásitos, identificamos a una proteasa de tipo calpaína. El análisis funcional de esta proteína mediante inhibidores farmacológicos y silenciamiento génico sugirió que no es esencial para los procesos de mantenimiento y reparación del tegumento.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Parasitología Molecular

Palabras clave: Tegumento / Cestodos / Proteómica /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Los platelmintos parásitos (cestodos, trematodos y monogéneos) causan numerosas enfermedades de importancia para la salud humana y animal, especialmente en países en vías de desarrollo (1). La larva del cestodo *Echinococcus granulosus* es el agente causal de la hidatidosis, una enfermedad de gran importancia a nivel mundial y en particular en Uruguay, dónde es endémica (2, 3). Para las infecciones con *Echinococcus* spp. que no pueden ser tratadas mediante cirugía, la única quimioterapia disponible consiste en la utilización de benzimidazoles (4). Sin embargo, los benzimidazoles no son tolerados por todos los pacientes, y en el caso de *E. multilocularis* son solamente parasitostáticos, por lo que urge el desarrollo de nuevas opciones quimioterapéuticas (5, 6).

En lugar de una epidermis clásica, los platelmintos parásitos cuentan con un tegumento superficial altamente especializado (7). Este tejido es el principal sitio de contacto con el hospedador (en el caso de cestodos, que carecen de aparato digestivo, es el único). La organización del tegumento es sumamente peculiar, ya que se trata de un tegumento sincitial compuesto de dos grandes regiones. Por un lado, existe una región del citoplasma denominado tegumento distal que cubre completamente la superficie del parásito, y que se apoya sobre una membrana basal. La membrana plasmática apical de este tegumento distal tiene diversas modificaciones en diferentes grupos, como por ejemplo los microtricos (microvellosidades especializadas) en cestodos. Por otro lado, los núcleos de este sincitio se encuentran en cuerpos celulares (denominados citones) sumergidos por debajo de la membrana basal, que se comunican con el tegumento distal a través de puentes citoplasmáticos. En estudios clásicos, se demostró que la síntesis proteica ocurre en los citones, y que las nuevas proteínas y glicoconjugados son transportados hacia el tegumento distal para su renovación constante (8, 9).

En los trematodos, la composición del tegumento distal ha sido caracterizada extensamente por métodos

proteómicos, a partir de fracciones enriquecidas en proteínas tegumentarias (revisado por (10)). Estos estudios han resultado por ejemplo en la generación de vacunas experimentales utilizando proteínas tegumentarias recombinantes (10, 11). Adicionalmente, estudios recientes de secuenciación masiva de ARN de células únicas del trematodo *Schistosoma mansoni* han profundizado en la descripción de los patrones de expresión génica de los citones tegumentarios (12, 13). En cambio, es muy poco lo que se sabe a nivel molecular sobre la composición del tegumento de cestodos, excepto por unas pocas proteínas caracterizadas a nivel individual en diferentes especies, incluyendo estudios previos de nuestro grupo (14–16). Adicionalmente, en las décadas de 1970-1980 se desarrollaron métodos para obtener fracciones enriquecidas en proteínas tegumentarias, pero las proteínas nunca fueron identificadas (17, 18). Solo hay un reporte reciente de proteómica a baja escala de extractos tegumentarios de *Echinococcus granulosus*, pero este estudio utilizó condiciones más agresivas para la extracción de proteínas solubles, y no se confirmó el enriquecimiento de proteínas tegumentarias utilizando marcadores específicos (19).

La superficie del tegumento de los platelmintos parásitos (la membrana plasmática apical) sufre diferentes tipos de agresiones físicas, químicas y mecánicas a lo largo de su ciclo de vida. Esto incluye los ataques del sistema inmune, el impacto de las enzimas proteolíticas y sales biliares del tracto digestivo del hospedador, y los efectos de drogas antiparasitarias (20–27). Incluso es esperable que existan daños generados por los movimientos normales de los parásitos, como ocurre en varios tejidos animales que son mecánicamente activos (27, 28). Los mecanismos activos de reparación de la membrana plasmática, necesarios para reparar daños grandes (aperturas mayores a unos pocos nanómetros), son ubicuos en organismos eucariotas (27, 28). Los mecanismos inmediatos (segundos a minutos) de resellado de la membrana plasmática incluyen entre otros: 1) exocitosis de vesículas con la membrana plasmática; 2) fusión de vesículas entre sí y con la membrana plasmática para formar parches; 3) formación de tapones formados por entrecruzamiento de vesículas y complejos proteicos; 4) remodelado del citoesqueleto cortical. Todos estos mecanismos coinciden en que la señal necesaria para su puesta en marcha es la entrada de iones de calcio (Ca^{++}) al citoplasma durante la ruptura de la membrana plasmática (27, 28). En cuanto a las moléculas asociadas a estos mecanismos, se incluyen entre otras a las calpaínas y las ferlinas (27–31). Las calpaínas son proteasas activadas por Ca^{++} , no degradativas, que clivan a otras proteínas para modificar su actividad. Se ha demostrado en diferentes modelos que las calpaínas son esenciales para los mecanismos de reparación de la membrana plasmática, asociándose a la misma y procesando a proteínas del citoesqueleto, adhesiones celulares, e incluso a proteínas de tipo ferlina, entre otros blancos (27, 28, 32–34). Las ferlinas, por otro lado, son proteínas de membrana que cuentan con dominios C2 de interacción con Ca^{++} y fosfolípidos, y que participan de procesos de remodelado de membranas y de exocitosis dependientes de Ca^{++} (29, 30). En particular, la disferlina es reclutada a sitios dañados de la membrana plasmática y es indispensable para la fusión de vesículas durante su reparación en el músculo esquelético de vertebrados (27–29, 35). Además, esta y otras ferlinas tienen roles similares en otros tipos celulares. Posteriormente a estos procesos tempranos de resellado, la membrana plasmática es remodelada mediante procesos de endocitosis, exocitosis y de secreción de exosomas, para restaurar su composición y organización normal (27, 28). Si bien se sabe muy poco sobre la reparación de la membrana plasmática del tegumento en platelmintos parásitos (36, 37), es de esperar que existan mecanismos similares, dada la antigüedad evolutiva de estos procesos, que se remontan al origen de las células eucariotas (27, 28). Sin embargo, es posible que existan también mecanismos específicos de estos parásitos: recientemente, se describió en *S. mansoni* que una proteína de tipo Venom Allergen-Like (SmVAL6) (38), no vinculadas a estos procesos en mamíferos, es necesaria en el mantenimiento de la función de barrera.

Por lo tanto, el tema central que enmarca a este proyecto es la biología del tegumento de platelmintos parásitos, en particular los mecanismos involucrados en su organización y mantenimiento. Dentro de este tema, planteamos dos grandes enfoques.

1) Proteómica del tegumento en cestodos

El proyecto identificó los principales componentes proteicos del tegumento distal. Por lo tanto, es un paso esencial para identificar las proteínas que participan de la interacción directa entre hospedador y parásito. Esta es la primera vez que se caracteriza a nivel proteómico a gran escala este tejido en cestodos. El enfoque comparativo permitió identificar un núcleo central de proteínas y procesos que ocurren en el tegumento de cestodos en diversas especies y estadios del ciclo de vida, y la comparación con los estudios previos de trematodos (10, 39) permitió expandir este análisis a platelmintos parásitos en general. Los resultados permitirán en el futuro inferir localizaciones tegumentarias para los homólogos en otros platelmintos parásitos a partir de datos genómicos (40).

2) Reparación de la membrana plasmática en el tegumento de cestodos: mecanismos dependientes de Ca^{++} , calpaína y ferlinas.

Por otro lado, en este proyecto analizamos los procesos de reparación de la membrana plasmática apical del tegumento, apoyándonos en la detección de proteínas relacionadas con estos procesos en nuestros estudios proteómicos preliminares. Para esta sección del proyecto, utilizamos al cestodo modelo *M. corti* (syn. *M. vogae*). Las larvas de *M. corti* son un modelo excelente para el estudio de la biología celular y molecular de cestodos. Estas larvas pueden ser obtenidas en grandes cantidades in vivo (41). Además, se han puesto a punto métodos robustos para su cultivo in vitro, permitiendo diferentes manipulaciones experimentales (42–45). La ultraestructura del tegumento de esta especie ha sido descrita en detalle (46), y un estudio demostró a nivel ultraestructural la existencia de daño y reparación del tegumento inducido por tripsina, pero a tiempos largos (a partir de las 24 horas), por lo que no identificaron los procesos iniciales de reparación, ni los mecanismos subyacentes (20). Recientemente, se ha publicado su genoma (47) y disponemos de su transcriptoma. Un limitante del modelo, que es común a todos los cestodos, es la imposibilidad hasta el momento de manipularlos genéticamente.

En el marco de este proyecto, describimos la reparación de la membrana plasmática del tegumento de *M. corti*. Adicionalmente, realizamos análisis funcionales para determinar la importancia de una calpaína y de dos proteínas de la familia de las ferlinas en los procesos de reparación. En el caso de las ferlinas, existen solamente dos codificadas en el genoma de cestodos (basado en su estructura de dominios (29), se trata de una tipo I, "Ferlina-I", y una tipo II, "Ferlina-II"). Estas proteínas, si bien tienen diversos roles, están bien caracterizadas en los procesos rápidos iniciales de reparación de la membrana plasmática en otros organismos (27–31). Además, han sido detectadas específicamente en el tegumento de trematodos, tanto por métodos transcriptómicos y proteómicos como por inmunofluorescencia (10, 48–52). Los análisis funcionales fueron exitosos en el caso de la calpaína, y sugirieron que esta proteína no tiene un rol esencial en la reparación del tegumento.

Metodología/Diseño del estudio

1. Análisis proteómico del tegumento de *E. multilocularis*, *H. microstoma* y *M. corti*

Las larvas de *Mesocostoides corti* y los adultos de *Hymenolepis microstoma* fueron obtenidos mediante cultivo en ratones (Laboratorio de Experimentación Animal, FQuim, UdelaR – Protocolo C.E.U.A., expedientes 101900-000111-19 y 101900-000252-15). El material obtenido de *Echinococcus canadensis* a partir de infecciones naturales detectadas en frigoríficos fue insuficiente, por lo que en su lugar estudiamos larvas de *Echinococcus multilocularis*, provistas por nuestro colaborador Klaus Brehm (Universidad de Würzburg).

El fraccionamiento para el aislamiento de proteínas tegumentarias ha sido descrito para *Hymenolepis* y *Echinococcus* (17, 18), y fue optimizado en nuestro laboratorio para *M. corti*. Consiste en un tratamiento suave con detergente en hielo, seguido por el desprendimiento mecánico del tegumento superficial. Fragmentos del tegumento distal son colectados mediante centrifugación a bajas velocidades y lavados, resultando en fracciones enriquecidas del tegumento distal (FETs). Confirmamos este enriquecimiento

mediante Western Blot, comparando con extractos totales (ETs), utilizando marcadores del tegumento distal (glicoproteínas detectables con la lectina WGA) y de las fibras musculares internas (anticuerpos anti-tropomiosina, (14, 53)). Las FETs y ETs fueron analizados mediante espectrometría de masas a gran escala ("shotgun"). Este trabajo se realizó en colaboración con las Dra. Rosario Durán y Analía Lima, Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur, Uruguay. Las mezclas proteicas fueron digeridas con enzimas proteolíticas y los péptidos resultantes analizados en un nano-HPLC (UltiMate 300, Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido Q-Orbitrap (Q-Exactive Plus, Thermo Scientific). La identificación de las proteínas fue llevada a cabo utilizando PatterLab for proteomics (70), basados en los proteomas predichos de estas especies (40). La cuantificación fue realizada mediante conteo espectral (71), identificando aquellas proteínas enriquecidas en las fracciones tegumentarias en comparación con los extractos totales ((72); es una estrategia conservativa de definir las proteínas tegumentarias, para excluir contaminantes). Este análisis se realizó a partir de cuadruplicados biológicos (para *H. microstoma* y *M. corti*) o triplicados biológicos (para *E. multilocularis*).

2. Análisis comparativo de los proteomas tegumentarios

En colaboración con el Dr. Andrés Iriarte (Instituto de Higiene, Fcien, UdelAR), determinamos el solapamiento del proteoma tegumentario entre especies de cestodos (a partir de los datos de este proyecto), y de trematodos (a partir de la literatura; (10, 39)). Esto implicó la identificación de ortología entre las proteínas de diferentes especies.

3. Validación

Ya que no hay prácticamente anticuerpos comerciales para proteínas de cestodos, validamos la expresión tegumentaria de diez genes utilizando hibridación in situ fluorescente "whole-mount", siguiendo nuestro protocolo previamente publicado (14, 54). La expresión en los citones tegumentarios se confirmó mediante su marcado con dextrano fluorescente, siguiendo el método de Wendt et al (69).

4. Reparación de la membrana plasmática tegumentaria en *M. corti*

Realizamos ensayos de daño a la membrana plasmática tegumentaria mediante shock osmótico y mecánico (3 minutos en agua destilada en combinación con agitación por vortex), para analizar su reparación tras diferentes tiempos de recuperación. Esto incluyó:

4.1. El resellado de la membrana plasmática, mediante el análisis de la permeabilidad al yoduro de propilo (IP, 50 ug/ml; (74, 75)). El IP fue añadido tras diferentes tiempos de recuperación en PBS con o sin Ca++ (hasta 5 minutos) y los parásitos vivos fueron analizados inmediatamente mediante microscopía de fluorescencia. Como controles, se incluyeron larvas no tratadas (no son teñidas), y larvas permeabilizadas con Triton 0.1% (control positivo de tinción).

4.2. Análisis de inmunofluorescencia para analizar el remodelado del citoesqueleto de tubulina (anticuerpo monoclonal AA4.3, DSHB) y de actina (con faloidina fluorescente, ABCAM).

5. Calpaína y ferlinas en *M. corti*

5.1. Localización

Obtuvimos anticuerpos contra calpaína, ferlina-I y ferlina-II de *M. corti*, generados por proveedores comerciales utilizando péptidos sintéticos conjugados a KLH. Fueron validados por Western Blot con extractos totales de *M. corti*. En el caso de ferlina-II, los anticuerpos obtenidos no resultaron específicos por lo que no se continuó trabajando con esta proteína. Los anticuerpos fueron utilizados para determinar la

localización subcelular en el tegumento mediante inmunofluorescencia (57).

5.2. Análisis funcional

En el caso de la calpaína, utilizamos dos inhibidores específicos permeables ya validados en invertebrados (calpeptin y una versión modificada permeable del péptido calpastatin (32, 33, 52)), y adicionalmente realizamos el silenciamiento del gen, mediante la introducción de oligos morfolinolinos antisentido en el tegumento ((76); uno de bloqueo traduccional y otro de bloqueo del splicing). Un morfolino irrelevante fue utilizado como control negativo. Los oligos fueron introducidos específicamente en el tegumento utilizando el método de shock osmótico, validados utilizando un morfolino fluorescente. Determinamos si el silenciamiento fue exitoso tras 24 a 72 horas de cultivo in vitro mediante Western Blot y mediante RT-PCR para analizar el efecto en el splicing. Analizamos si existieron defectos en el resellado de la membrana apical como se describe en 4.1.

En el caso de las ferlinas, también se intentó el silenciamiento mediante morfolinolinos, pero tras varios intentos y variando las condiciones experimentales, solo se observó silenciamiento parcial mediante RT-PCR en algunos casos para ferlina-I, por lo que no se analizó el efecto sobre la reparación tegumentaria.

Resultados, análisis y discusión

1. Análisis proteómico comparativo del tegumento de *E. multilocularis*, *H. microstoma* y *M. corti*

La metodología de extracción y enriquecimiento de proteínas tegumentarias fue exitosa en las tres especies. Los resultados de este procedimiento fueron validados inicialmente mediante Western Blot, demostrando niveles mínimos de contaminación con otras proteínas en las FET, y un alto grado de enriquecimiento en proteínas tegumentarias.

Identificamos más de doscientas proteínas enriquecidas en la FET para cada especie de cestodo analizada (270 en *M. corti*, 335 en *H. microstoma*, y 222 en *E. multilocularis*). Estas proteínas incluyen por ejemplo transportadores de membrana para diferentes nutrientes, proteínas relacionadas con el tráfico vesicular, así como homólogos de antígenos tegumentarios previamente descritos en cestodos. El análisis comparativo de homología entre las proteínas detectadas en las diferentes especies demostró que existe un solapamiento muy importante, y estadísticamente significativo (Chi-cuadrado, $p < 0.001$ para todas las comparaciones), entre las proteínas tegumentarias de estas especies (por ejemplo, existen 61 proteínas compartidas enriquecidas en el tegumento de *M. corti* y *H. microstoma*, y 33 proteínas compartidas en el tegumento de todas las especies). Adicionalmente, comparando nuestros resultados con los datos disponibles en la literatura para el trematodo *Schistosoma mansoni* (10), identificamos 6 grupos de ortólogos enriquecidos en el tegumento de todos los platelmintos parásitos analizados a la fecha: estos incluyen a un parólogo de la calpaína, una ferlina tipo I, una ferlina tipo II, un transportador de fosfolípidos, y las proteínas relacionadas al tráfico vesicular Rab-27 y Rap-1b. Más allá de estos ejemplos de grupos de ortólogos compartidos, también identificamos casos en los que, si bien no existía ortología uno a uno entre las especies, sí existía enriquecimiento de la misma familia génica. El ejemplo más llamativo fue el de la familia de antígenos tegumentarios que presentan dominios de tipo Dynein Light Chain (DLC) y/o EF-Hand (en algunos casos las proteínas poseen ambos tipos de dominios, mientras que en otros uno solo), encontrando numerosos miembros de esta familia expresados en el tegumento de todos los platelmintos parásitos. Estos resultados demuestran que existen componentes y procesos conservados en el tegumento de los diferentes platelmintos parásitos, y estos son por lo tanto candidatos interesantes para el desarrollo de tratamientos de amplio espectro contra los mismos.

2. Validación de los resultados de proteómica y análisis de expresión genes tegumentarios

Analizamos mediante hibridación in situ fluorescente la expresión de ARNm que codifican para un subgrupo

(10 genes) de las proteínas tegumentarias identificadas en *H. microstoma* y *E. multilocularis*. Además de analizar a grandes rasgos la localización de la expresión, determinamos la expresión en particular en los citones del tegumento mediante co-localización con dextrano fluorescente, introducido al tegumento mediante shock osmótico/mecánico (69). Entre estos genes se incluyeron varios genes conservados entre cestodos de función desconocida. Todos los genes analizados para los que se detectó señal por hibridación *in situ* (9 en cada especie) demostraron expresión en el tegumento. En casi todos los casos la expresión fue detectada principal o únicamente en los citones tegumentarios, con una única excepción (el gen *rab27* de *E. multilocularis*, con una expresión que es aparentemente ubicua). Sorprendentemente, detectamos una gran variedad de patrones de expresión de los genes tegumentarios entre los citones de las diferentes regiones del tegumento. Por un lado, existen genes que se expresan en todos o casi todos los citones, mientras que hay otros cuya expresión está ausente en grandes regiones (por ejemplo, de expresión ausente en todo el escólex o cabeza), presente en subpoblaciones pequeñas de citones especializados (por ejemplo, de expresión en el tegumento del rostelo, un órgano de fijación del escólex, pero ausente en el resto del escólex), o incluso de expresión diferencial a lo largo de cada segmento de la estróbila. Esto demuestra que existe una gran heterogeneidad de expresión génica entre los citones tegumentarios, a pesar de compartir un mismo citoplasma. La heterogeneidad de los citones tegumentarios ha sido sugerida también en estudios de secuenciación de célula única en el trematodo *S. mansoni*, si bien en este caso se sugiere que puede deberse en parte a diferentes trayectorias de diferenciación de los progenitores tegumentarios hacia una forma diferenciada común (77).

Adicionalmente, desarrollamos y validamos anticuerpos para la calpaína y la ferlina tipo I de *M. corti*, y los utilizamos para analizar la distribución de las proteínas en esta especie mediante inmunofluorescencia. Las dos proteínas fueron localizadas principalmente en el tegumento distal. En el caso de la calpaína, la localización proteica en el tegumento distal también fue heterogénea, siendo mucho mayor en la región posterior de los animales que en el escólex. Por lo tanto, deben existir mecanismos que restrinjan la movilidad de esta proteína dentro del citoplasma del tegumento distal.

3. Reparación de la membrana plasmática del tegumento y análisis funcional de la calpaína tegumentaria

Nuestros resultados demostraron que existen mecanismos sumamente eficientes de reparación de la membrana plasmática del tegumento. Típicamente, encontramos que el daño generado mediante shock osmótico y mecánico a la función barrera de la membrana del tegumento distal puede ser reparado en tiempos del orden de segundos, y tras cinco minutos la reparación es completa. Adicionalmente, nuestros experimentos demostraron que la reparación requiere calcio, ya que es inhibida en presencia de los quelantes EGTA, y aún en mayor medida de EDTA, pero en forma atípica en comparación con otros modelos, no es necesario que el calcio se encuentre en el medio extracelular (la reparación ocurre por ejemplo en buffer PBS libre de calcio). Estos resultados sugieren que la liberación de calcio necesaria para la reparación ocurre a partir de fuentes internas. Por otro lado, no observamos grandes cambios en el citoesqueleto del tegumento durante el proceso de reparación de la membrana plasmática.

Realizamos el silenciamiento de la calpaína tegumentaria de larvas de *Mesocostoides corti* utilizando morfolinós. Los resultados de RT-PCR demostraron que el *splicing* del ARN mensajero de la calpaína era afectado en presencia de un morfolino que bloquea el sitio 3' de *splicing*; el principal producto de *splicing* aberrante observado fue la retención de este intrón (lo que resulta en la retención de un codón stop en el marco de lectura), si bien en menor medida también ocurrió la no inclusión del exón correspondiente (resultando en un corrimiento del marco de lectura del ARN mensajero). Los efectos del morfolino sobre el *splicing* se mantuvieron por al menos 72 horas, al cabo de las cuales se analizó la capacidad de reparación del tegumento de estas larvas. Sin embargo, no se observaron defectos en la reparación del tegumento. En forma similar, la inhibición de la calpaína utilizando un inhibidor enzimático de cisteín-proteasas fue incapaz de inhibir la reparación del tegumento. Estos resultados sugieren que la calpaína tegumentaria no

participaría de estos procesos.

Conclusiones y recomendaciones

Este proyecto analizó por primera vez la composición proteica del tegumento de cestodos, identificando cientos de proteínas enriquecidas en el tegumento de cada especie, y un núcleo común de proteínas conservadas entre ellas. Teniendo en cuenta que los estadios del ciclo de vida analizados fueron diferentes entre las diferentes especies, y que existe además solapamiento con las proteínas tegumentarias conocidas de trematodos, los resultados sugieren que existen componentes y mecanismos conservados en el tegumento de todos los platelmintos parásitos, y que estos podrían ser blancos terapéuticos importantes para estrategias de combate contra estos parásitos que sean de amplio espectro. Adicionalmente, el proyecto profundizó en aspectos poco comprendidos de la biología del tegumento, incluyendo la heterogeneidad de la expresión génica dentro de este sincitio, y los mecanismos de reparación de la membrana del mismo. Finalmente, se desarrollaron herramientas (incluyendo marcadores para el tegumento distal y métodos para el silenciamiento tejido-específico de genes en el tegumento) que permitirán profundizar esta línea de investigación en el futuro.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Tesis de doctorado	COMPOSICIÓN, ORGANIZACIÓN CELULAR Y MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL TEGUMENTO DE CESTODOS	Inés Guarnaschelli	POS_FCE_2021_1_1010808		En proceso
Tesis de grado/monografías	Estudio de la expresión de HmN 000398100 y HmN 000771800 en el cestodo Hymenolepis microstoma	Jonathan García			En proceso

Referencias bibliográficas

1. P. J. Hotez et al., J. Clin. Invest. 118, 1311–1321 (2008).
2. P. R. Torgerson, C. Carmona, R. Bonifacino, Ann. Trop. Med. Parasitol. 94, 703–713 (2000).
3. C. M. Budke, P. Deplazes, P. R. Torgerson, Emerg. Infect. Dis. 12, 296–303 (2006).
4. M. Siles-Lucas, A. Casulli, R. Cirilli, D. Carmena, PLoS Negl. Trop. Dis. 12, e0006422 (2018).
5. K. Brehm, U. Koziol, Parasite. 21, 72 (2014).
6. B. Lundström-Stadelmann, R. Rufener, D. Ritler, R. Zurbriggen, A. Hemphill, Food Waterborne Parasitol. 15, e00040 (2019).
7. S. Tyler, M. Hooge, Can. J. Zool. 82, 194–210 (2004).
8. R. Lumsden, Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitenkd. 28, 1–13 (1966).
9. J. A. Oaks, R. D. Lumsden, J. Parasitol. 57, 1256–1268 (1971).
10. J. Sotillo, D. Doolan, A. Loukas, Expert Rev. Proteomics. 14, 171–183 (2017).
11. C. T. Fonseca, G. Braz Figueiredo Carvalho, C. Carvalho Alves, T. T. De Melo, J. Parasitol. Res. 2012 (2012), doi:10.1155/2012/541268.
12. G. Wendt et al., Science. 369, 1644–1649 (2020).

13. C. L. Diaz Soria et al., *Nat. Commun.* 11, 6411 (2020).
14. U. Koziol, T. Rauschendorfer, L. Zanon Rodríguez, G. Krohne, K. Brehm, *Evodevo.* 5, 10 (2014).
15. P. Arbildi et al., *Acta Trop.* En prensa (2021).
16. Y. Zheng et al., *Vet. Parasitol.* 255, 107–113 (2018).
17. D. P. McManus, N. J. Barrett, *Parasitology.* 90, 111–129 (1985).
18. W. J. Knowles, J. A. Oaks, *J. Parasitol.* 65, 715–731 (1979).
19. S. Miles et al., *J. Cell. Biochem.* 120, 15320–15336 (2019).
20. I. Espinoza et al., *J. Cell. Physiol.* 205, 211–217 (2005).
21. F. Kawamoto, H. Fujioka, N. Kumada, 315, 309–315 (1986).
22. L. J. Cunningham, P. D. Olson, *Parasit. Vectors.* 3, 123 (2010).
23. M. M. Markoski et al., *Parasitol. Int.* 55, 51–61 (2006).
24. V. Salvador-Recatalà, R. M. Greenberg, *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1, 85–93 (2012).
25. S.-K. Park, J. S. Marchant, *Trends Parasitol.* 36, 182–194 (2020).
26. J. D. Smyth, D. P. McManus, *The physiology and biochemistry of cestodes* (Cambridge University Press, Cambridge, 2007).
27. D. A. Ammendolia, W. M. Bement, J. H. Brumell, *BMC Biol.* 19, 1–29 (2021).
28. S. T. Cooper, P. L. McNeil, *Physiol. Rev.* 95, 1205–1240 (2015).
29. A. V. Bulankina, S. Thoms, *Cells.* 9, 534 (2020).
30. A. Lek, F. J. Evesson, R. B. Sutton, K. N. North, S. T. Cooper, *Traffic.* 13, 185–194 (2012).
31. Y. Ono, T. C. Saido, H. Sorimachi, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 854–876 (2016).
32. C. M. Godell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4751–4756 (1997).
33. R. L. Mellgren, W. Zhang, K. Miyake, P. L. McNeil, *J. Biol. Chem.* 282, 2567–2575 (2007).
34. A. K. Piper et al., *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 318, C1226–C1237 (2020).
35. D. Bansal et al., *Nature.* 423, 168–172 (2003).
36. R. Breternitz, J. R. Kusel, F. Lutz, C. Buehrle, A. Ruppel, *Exp. Parasitol.* 74, 340–347 (1992).
37. I. Espinoza et al., *J. Cell. Physiol.* 205, 211–217 (2005).
38. S. Perally et al., *Int. J. Parasitol.* 6 (2020), doi:10.1016/j.ijpara.2020.09.004.
39. R. A. Wilson et al., *Int. J. Parasitol.* (2011), doi:10.1016/j.ijpara.2011.08.003.
40. K. L. Howe et al., *Nucleic Acids Res.* 44, D774–D780 (2016).
41. D. Specht, M. Voge, *J. Parasitol.* 51, 268–272 (1965).
42. M. Voge, L. S. Coulombe, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 902–907 (1966).
43. N. J. Barrett, J. D. Smyth, S. J. Ong, *Int. J. Parasitol.* 12, 315–322 (1982).
44. M. M. Markoski et al., 89, 27–34 (2003).
45. U. Koziol, M. F. Domínguez, M. Marín, A. Kun, E. Castillo, *Front. Zool.* 7, 1–12 (2010).
46. E. Hess, *Z. Parasitenkd.* 61, 135–159 (1980).
47. A. Coghlan et al., *Nat. Genet.* 51, 163–174 (2019).
48. G. Wendt et al., 1649, 1644–1649 (2020).
49. Y. Xiong et al., *Parasitol. Int.* 62, 522–529 (2013).
50. Y. Xiong et al., *PLoS One.* 8 (2013), doi:10.1371/journal.pone.0066396.
51. S. Chaimon et al., *Parasit. Vectors.* 12, 383 (2019).
52. Q. Wang, A. A. Da'dara, P. J. Skelly, *Sci. Rep.* 7, 12912 (2017).
53. U. Koziol et al., *Mol. Biochem. Parasitol.* 175, 181–191 (2011).
54. M. Preza et al., *Int. J. Parasitol.* 48, 979–992 (2018).
55. J. Montagne, M. Preza, E. Castillo, K. Brehm, U. Koziol, *Dev. Genes Evol.* 229, 89–102 (2019).
56. U. Koziol et al., *Genome Biol. Evol.* 7, 2136–2153 (2015).
57. U. Koziol, G. Krohne, K. Brehm, *Front. Zool.* 10, 24 (2013).
58. S. Förster et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0006959 (2019).

59. M. F. Domínguez et al., *Exp. Parasitol.* 138, 25–29 (2014).
60. U. Koziol, A. I. Lalanne, E. Castillo, *Biochem. Genet.* 47, 100–116 (2009).
61. S. Hemer et al., *BMC Biol.* 12 (2014), doi:10.1186/1741-7007-12-5.
62. N. Macchiaroli et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009297 (2021).
63. M. Preza et al., *Genomics.* 113, 620–632 (2021).
64. A. Schubert et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014), doi:10.1371/journal.pntd.0002870.
65. U. Koziol et al., *Gene.* 443, 1–11 (2009).
66. I. J. Tsai et al., *Nature.* 496, 57–63 (2013).
67. A. A. Siddiqui, R. B. Podesta, *J. Parasitol.* 71, 415–421 (1985).
68. M. E. Ancarola et al., *Int. J. Parasitol.* 47, 675–686 (2017).
69. G. R. Wendt et al., *Elife.* 7, 1–24 (2018).
70. P. C. Carvalho et al., *Nat. Protoc.* 11, 102–117 (2016).
71. D. H. Lundgren, S. Il Hwang, L. Wu, D. K. Han, *Expert Rev. Proteomics.* 7, 39–53 (2010).
72. J. R. Yates, A. Gilchrist, K. E. Howell, J. J. M. Bergeron, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 702–714 (2005).
73. S. Carbon et al., *Nucleic Acids Res.* 47, D330–D338 (2019).
74. M. Corrotte, T. Castro-Gomes, A. B. Koushik, N. W. Andrews, Approaches for plasma membrane wounding and assessment of lysosome-mediated repair responses (Elsevier Ltd, 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.11.009>), vol. 126.
75. J. Fabbri, M. C. Elisondo, *Parasitol. Res.* 118, 687–692 (2019).
76. J. S. Eisen, J. C. Smith, *Development.* 135, 1735–1743 (2008).
77. Zhao L, Wendt GR, Collins JJ 3rd. *bioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/2024.07.12.603265 (2024).

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)