



Boletín Médico del Hospital Infantil de México

www.elsevier.es/bmhim



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Análisis proteómico de los productos de excreción-secreción de cuatro aislados de *Trichinella spiralis* obtenidos de hospederos accidentales



Luz Ofelia Franco-Sandoval^a, Enedina Jiménez-Cardoso^{a,*},
Héctor Quezada-Pablo^b y Ana Laura Guzmán-Ortiz^b

^a Laboratorio de Investigación en Parasitología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México

^b Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México

Recibido el 10 de febrero de 2017; aceptado el 3 de julio de 2017

Disponible en Internet el 26 de noviembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Trichinella spiralis;
Productos de
excreción-secreción
(PES);
Espectrometría de
masas;
Larva muscular

Resumen

Introducción: *Trichinella spiralis* es un nemátodo tisular que se aloja en el músculo esquelético de humanos y otros mamíferos y causa una serie de alteraciones fisiológicas. Las proteínas de los productos de excreción-secreción de *T. spiralis* juegan un papel importante en la aparición y regulación de estas alteraciones. Sin embargo, aún no se conoce el efecto de estos productos en la infección e invasión del parásito al hospedero.

Métodos: Mediante un análisis electroforético en una dimensión, Western blot y espectrometría de masas, se evaluaron las diferencias y similitudes entre proteínas antigénicas y de superficie de cuatro aislados de *T. spiralis* obtenidos de hospederos accidentales (perros) y la cepa de referencia aislada de cerdos (MSUS/MEX/91/CM).

Resultados: Utilizando ontología de genes, se encontraron cinco proteínas exclusivas de los hospederos accidentales. Después del análisis, se encontró que estas proteínas forman parte de la matriz extracelular del parásito, cuentan con actividad catalítica y están implicadas en la adhesión a las células del hospedero. La actividad antigénica de las cuatro cepas aisladas de hospederos accidentales es idéntica a la reportada para *T. spiralis*, visualizándose el triplete antigénico característico de 43, 45 y 47 kDa.

Conclusiones: Las proteínas exclusivas de los hospederos accidentales proveen información para entender el mecanismo de acción de este parásito para penetrar el músculo y evadir la respuesta inmune en el hospedero.

© 2017 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jimenezce@yahoo.com.mx (E. Jiménez-Cardoso).

KEYWORDS

Trichinella spiralis;
Products of
excretion-secretion;
Mass spectrometry;
Muscle larvae

Proteomic analysis of the excretion-secretion products of four *Trichinella spiralis* isolates obtained from accidental hosts

Abstract

Background: *Trichinella spiralis* is an intestinal and tissue nematode specific for mammalian skeletal muscle, causing a series of physiological alterations. *T. spiralis* excretory-secretion products play an important role in the appearance and regulation of these alterations. However, the effect of these products on the infection and invasion of the parasite to the host is unknown. **Methods:** Differences and similarities between antigenic proteins and surface proteins of four accidental hosts isolates (dogs) of *T. spiralis* and the reference strain isolated from pigs (MSUS/MEX/91/CM) were assessed by electrophoresis, western blot and mass spectrometry.

Results: Using gene ontology, five proteins exclusive to the accidental hosts were analyzed. The results showed that these proteins are part of the extracellular matrix of the parasite, present catalytic activity, and bind to host cells. The antigenic activity the four strains showed the antigenic triplet characteristic of *T. spiralis* of 43, 45 and 47 kDa.

Conclusions: Five proteins exclusive to dog isolates provided information to understand the mechanism of action of this parasite to penetrate the muscle and evade the immune response in the host.

© 2017 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introducción

La triquinelosis es una enfermedad zoonótica causada por nemátodos del género *Trichinella*, constituido por ocho especies y cuatro genotipos (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. murrelli*, *T. britovi*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis*, *T. papue*, *T. zimbabwensis*, T-6, T-8, T-9 y T-12)¹⁻³. Estas especies se encuentran distribuidas alrededor del mundo, afectando a carnívoros, humanos y hospederos accidentales⁴. De 2004 a 2009, ocurrieron 15 brotes de triquinelosis humana en China, con 1387 casos y cuatro defunciones. En México, particularmente en Zacatecas, se reportaron aproximadamente 758 casos de triquinelosis humana durante el periodo entre 1952 y 1997. La mayoría de los brotes ocurrieron debido al consumo de carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida⁵. De 1970 a 1990 se reportaron ocho casos de triquinelosis en niños, cuyo diagnóstico se realizó mediante antecedentes epidemiológicos, clínicos y por exámenes de laboratorio. La mayor frecuencia se presentó en el grupo de 10 a 14 años proveniente de un nivel socioeconómico bajo⁶. Actualmente, existen alrededor de 11 millones de personas infectadas por nemátodos del género *Trichinella* spp⁷.

La importancia de la triquinelosis en hospederos accidentales como el perro se demostró en estudios realizados en China, donde se analizaron 13 provincias. En las carnicerías municipales se encontró una prevalencia del 16.2%, con un rango de 1.2 a 44.8%, mientras que la prevalencia encontrada en los mercados fue del 3.5%, lo que representó un serio problema de salud pública.

En países como Finlandia se reportó el riesgo de triquinelosis en perros domésticos en el 19.4%, mientras que la infección con *Trichinella nativa* se encontró con mayor frecuencia en perros de vida libre multiparasitados con otras especies de *Trichinella*. Esto incrementa la posibilidad de contagio cuando la carne de estos animales, cruda

o mal cocida, es ingerida por los humanos y huéspedes sinantrópicos^{8,9}. De esta manera, la posibilidad de contraer esta parasitosis se incrementa al tener más hospederos con potencial de infección, y abre nuevas rutas de contagio para los humanos.

Es importante puntualizar que la triquinelosis es una zoonosis potencialmente mortal, por lo que es importante conocer todas las probables fuentes de contagio y el mecanismo de infección del parásito, así como analizar las proteínas involucradas en la patogenicidad e infección. Debido a que es una enfermedad que aún es mal diagnosticada y confundida con algunas enfermedades gastrointestinales, lo anterior proveerá de herramientas adecuadas para su tratamiento.

2. Métodos

2.1. Animales y tratamiento

Se infectaron ratas de la cepa Wistar con aproximadamente 1000 larvas L1 por vía intragástrica. Treinta días post-infección, los animales fueron sacrificados para extraer las larvas infectivas del músculo esquelético mediante digestión artificial, utilizando pepsina-HCl al 1% a 37 °C en agitación constante durante 3 h.

El manejo de los animales se llevó a cabo en función de las normas oficiales y de los lineamientos del Comité de Ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

2.2. Obtención de productos de excreción-secreción de larvas L1 de *Trichinella* spp.

Las larvas obtenidas por digestión artificial se mantuvieron en cajas de cultivo bajo una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C

durante 20 días. Posteriormente, se determinó la concentración de los productos de excreción-secreción (PES).

2.3. Electroforesis de los productos de excreción-secreción de larvas de *T. spiralis*

Se analizaron 2.5 µg de proteína mediante electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Los geles fueron teñidos con plata. Las muestras de proteína posteriormente se analizaron por Western blot.

2.4. Preparación de las muestras de proteína

Se añadieron 500 µl de amortiguador de lisis (4% SDS, 100 mM DTT, 100 mM de Tris pH 8.6 y cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas, Halt, Thermo Scientific) a las muestras de PES. La mezcla fue incubada a 40 °C durante 30 min para reducir las proteínas. Posteriormente, se agregó Tris a una concentración final de 300 mM y yodo acetamida (IAM) 200 mM para alquilar la mezcla de proteínas, la cual se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 min. Las proteínas se precipitaron añadiendo nueve volúmenes de etanol absoluto, incubando a -20 °C toda la noche. Las proteínas se solubilizaron en cloruro de guanidinio 50 mM y Tris 20 mM. La digestión proteolítica se realizó con tripsina 1:50, incubando toda la noche a 37 °C.

La mezcla de péptidos fue acidificada al 0.1% con ácido trifluoroacético (TFA) y desalada en cartuchos Sep-Pak® C18. Los péptidos se lavaron tres veces con 0.1% de TFA, y posteriormente fueron eluidos con 1 ml de acetonitrilo al 60% y TFA al 0.1%. La solución eluida se secó por completo usando una centrifuga SpeedVac® y los péptidos secos fueron congelados a -80 °C.

2.5. Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La mezcla de péptidos fue resuspendida en 50 µl de ácido fórmico al 0.1% y colocada en un vial de inyección para ser separada en un Ultimate 3000 RSLC nano HPLC (Thermo Scientific®) por una columna de preconcentración de C18 PepMap 100, 5 µm, 100 Å (Thermo Scientific®) conectada a columna analítica C18 de 75 µm de diámetro interior y 15 cm de longitud (Agilent Technologies®). Los péptidos fueron eluidos con un gradiente no lineal de 2% a 40% de solución B (0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo) en 240 min a 250 nl/min, y analizados en línea en un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo-TOF Impact II (Bruker Daltonics®), el cual fue operado en modo positivo con una fuente CaptiveSpray®.

2.6. Análisis de datos proteómicos

Los espectros de masas fueron procesados mediante el programa Data Análisis (Bruker Daltonics®) y comparados con la base de datos de proteínas SwissProt®, utilizando el motor de búsqueda Mascot®. Los datos se buscaron con una tolerancia de masa de péptido de 7 ppm, y con una tolerancia de 0.05 Da y una longitud mínima de péptido de cinco aminoácidos para los productos de

fragmentación. La carbamidometilación de cisteínas se consideró como modificación fija, y la oxidación de metioninas, como variable. Se permitieron hasta dos omisiones de corte de la proteasa tripsina. La comparación de las proteínas identificadas en cada una de las réplicas en la muestra control y experimental se realizó mediante diagramas de Venn (<http://genevnn.sourceforge.net/usm.edu>, implementado por Mehdi Pirooznia). Solamente las proteínas que estuvieran en las tres réplicas de cada muestra se tomaron como válidas para la comparación entre la muestra control y la experimental.

2.7. Caracterización de proteínas por ontología de genes

Las proteínas exclusivas de hospederos accidentales fueron categorizadas usando Web Gene Ontology Annotation Plot (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>)^{10,11}. Los datos de estas proteínas fueron analizados y comparados, mostrando las funciones biológicas características en un gráfico.

3. Resultados

3.1. Animales y tratamiento

Se reprodujo el ciclo biológico de *Trichinella spiralis* en ratas de la cepa Wistar inoculadas vía intragástrica con larvas L1. Se obtuvieron 20,000 larvas L1/ML de los aislados Z1, Z2, Z3 y Z4 de *T. spiralis*, así como de la cepa obtenida de cerdo (fig. 1).

3.2. Obtención de productos de excreción-secreción de larvas L1 de *T. spiralis* y las cepas obtenidas de hospederos accidentales

Los PES se obtuvieron semanalmente, midiendo la concentración de proteínas en el medio de cultivo con el espectrofotómetro Epoch Gen5®. El rango de concentración osciló entre 0.5 y 4.5 µg/µl.

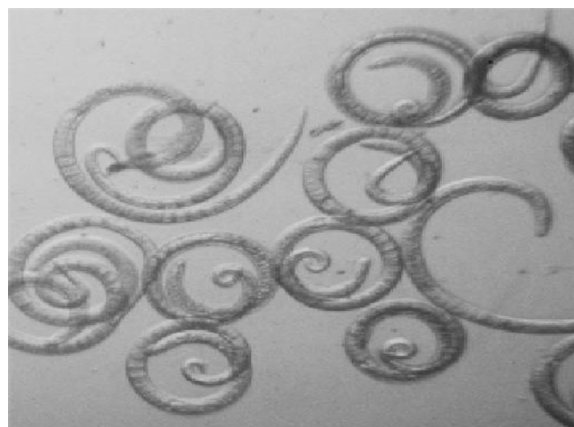


Figura 1 Larvas L1 de *Trichinella spiralis*. Larvas obtenidas por la técnica de digestión artificial y recuperadas mediante el embudo de Baermann modificado. Microscopio invertido (40X).

3.3. Electroforesis de los productos de excreción-secreción de larvas de *T. spiralis*

Se realizó la electroforesis para conocer el total de proteínas expresadas en los PES de cada cepa y, en función del perfil proteico, conocer si existían diferencias o similitudes entre ellas, tomando como punto de comparación la cepa de *T. spiralis* obtenida de cerdo (fig. 2).

3.4. Western blot

Se inocularon conejos para obtener anticuerpos policlonales anti-PES de cada cepa. Se obtuvo el suero y se realizó la técnica de ELISA para verificar la presencia de dichos anticuerpos. El punto de corte fue de 0.995 nm. Se consideraron como positivos aquellos sueros que sobrepasaron este umbral, para utilizarlos para el análisis por Western blot.

En la figura 3 se muestra el triplete antigénico característico de *T. spiralis* de 43, 45 y 47 kDa, corroborando que, efectivamente, Z1, Z2, Z3, Z4 y la cepa de referencia comparten proteínas antigénicas.

Se encontraron diferencias en la expresión de proteínas de alto peso molecular, entre 110 y 180 kDa. Estos resultados mostraron la diferente antigenicidad entre las muestras analizadas. La diferencia entre las proteasas expresadas y el perfil proteínas en los PES permitió demostrar que la

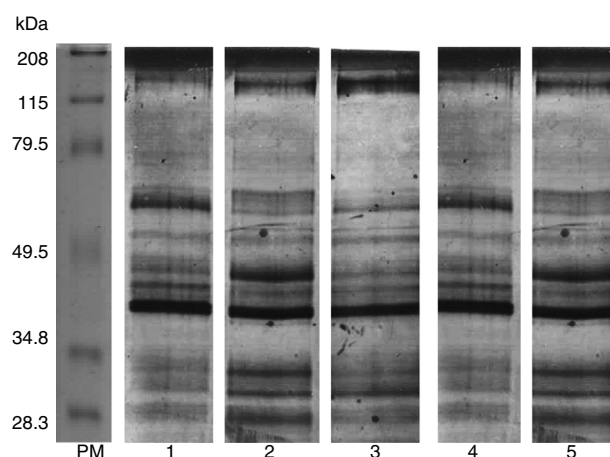


Figura 2 Electroforesis de los productos de excreción-secreción. 1. PES de la cepa de referencia *Trichinella spiralis*; 2. PES Z1; 3. PES Z2; 4. PES Z3; 5. PES Z4. Todos los PES detectados por electroforesis al 10% y teñidos con plata. Se observa que existen diferencias y similitudes en el perfil proteico.

expresión de proteínas en los distintos aislados del parásito se relaciona con la función del propio aislado y del hospedero que parasita.

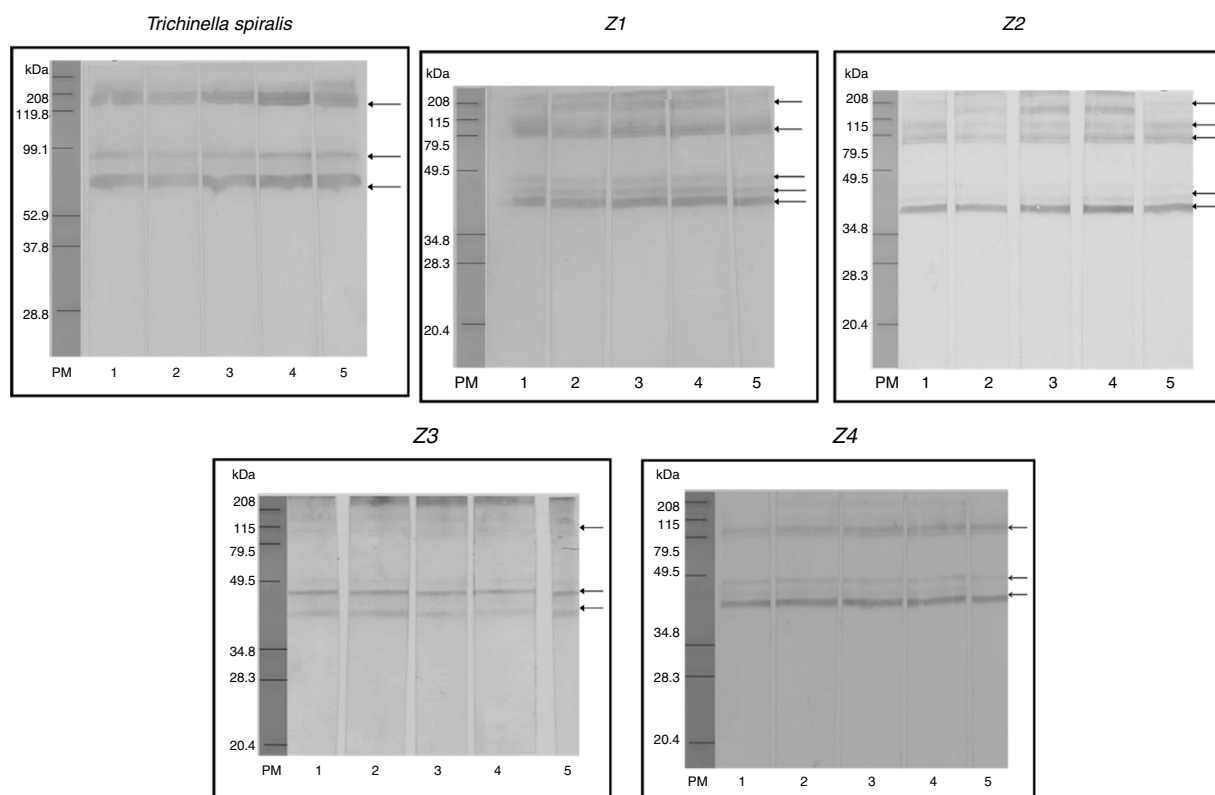


Figura 3 Western blot. Se utilizaron PES de los aislados y la cepa de referencia como antígenos y los sueros obtenidos de los conejos inmunizados como anticuerpos. Primero se probaron como antígenos los PES de *Trichinella spiralis*, y se retaron con los sueros de *T. spiralis*, suero de cepa Z1, suero de cepa Z2, suero de cepa Z3 y suero de cepa Z4. Posteriormente, se analizó la cepa Z1, retándola en el mismo orden con los diferentes sueros, y así sucesivamente con Z2, Z3 y Z4. Las flechas indican las proteínas antigénicas compartidas y expresadas.

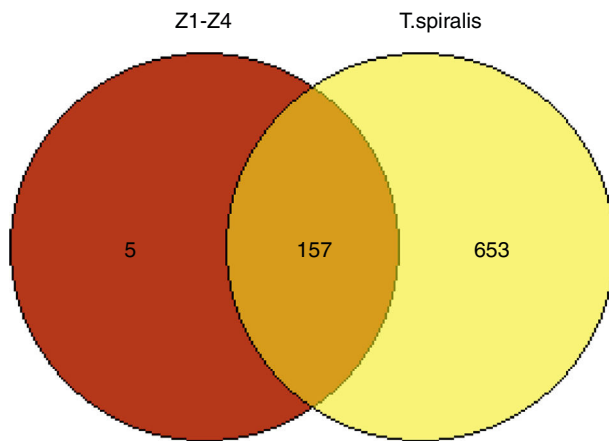


Figura 4 Análisis de proteínas. Se muestra un diagrama de Venn, donde se representan las 157 proteínas compartidas entre la cepa de *T. spiralis* de hospederos accidentales y *T. spiralis* recuperada de cerdos, evidenciando que solamente existen cinco proteínas exclusivas para las muestras de hospederos accidentales. Se compararon únicamente las proteínas presentes en las cuatro cepas provenientes de hospederos accidentales contra el proteoma de *T. spiralis*.

3.5. Identificación y análisis de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a masas

Se identificaron cinco proteínas exclusivas para las muestras de *T. spiralis* provenientes de hospederos accidentales en relación con la cepa de referencia obtenida de cerdo (fig. 4). Estas proteínas exclusivas podrían conferir mayor patogenicidad al parásito, ya que tienen funciones proteolíticas. La capacidad de estas cepas para penetrar el músculo esquelético y establecer la enfermedad es mayor comparada con la cepa de referencia (tabla 1).

3.6. Caracterización de proteínas por ontología de genes

Para entender mejor las funciones de las proteínas identificadas, se utilizó el programa WEGO, categorizando las

proteínas en dos grupos: aquellas que poseen funciones moleculares y las que están inmersas en procesos biológicos (fig. 5). Las cinco proteínas analizadas en este estudio forman parte de la matriz extracelular del parásito, y poseen actividad catalítica y de unión a las células del hospedero.

Las proteínas identificadas tienen funciones moleculares correspondientes a la formación de la matriz extracelular del parásito, actividad catalítica y unión a las células del hospedero.

4. Discusión

Las proteínas presentes en los PES juegan un papel importante en la invasión, la evasión del sistema inmune y la adaptación entre parásitos y la respuesta inmune del hospedero¹².

En un análisis realizado por Nagano y colaboradores, en el 2009, se encontraron tres proteínas principales: 43, 53 y 45 kDa¹³. Los autores establecieron que estas glicoproteínas son mayormente reconocidas por el hospedero durante la infección. Ortega y colaboradores, en 1989, encontraron 28 proteínas en un rango de peso molecular entre 11 y 200 kDa¹⁴. La presente investigación coincide con los resultados obtenidos por los autores mencionados, ya que los PES de los aislados Z1, Z2, Z3, Z4 y de la cepa de referencia mostraron proteínas en un rango de 28 hasta 200 kDa, además de presentar las glicoproteínas de 43 y 45 kDa.

El análisis proteómico mostró proteasas que participan en la interacción huésped-parásito. Este dato es de gran relevancia, ya que muchos patógenos utilizan estas proteínas para facilitar la entrada de los parásitos a la célula blanco del hospedero, iniciándose la infección y evasión de la respuesta inmunitaria. También se encontraron proteínas extracelulares y de unión a las células del hospedero.

Con relación al Western blot, todos los aislados presentaron el triplete de proteínas 43,45 y 47 kDa, correspondiente a las glicoproteínas que contienen tigelosa como agente antigénico. Estas proteínas ya han sido caracterizadas molecularmente y se sabe que son importantes en la formación de la célula nodriza y en la transformación de las células musculares¹⁴.

Tabla 1 Características de las proteínas exclusivas de los hospederos accidentales

ID proteína	Proteína	No. de acceso	Características	Gen
1	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	A0A0V1ARP2	Proteína de unión a hierro y azufre	Cisd1
2	Cathepsin L	A0A0V1B2U5	Actividad de peptidasa de tipo cisteína Componente integral de membrana	Cp1
3	Collagen alpha-1(IV) chain	A0A0V1B3L0	Constituyente estructural de la matriz extracelular	emb-9
4	Laminin subunit alpha-2	A0A0V1BAN4	Proteína receptora mediada por Ca ⁺⁺ que puede tener sitios de unión para esteroides	Lama1
5	Putative parathyroid hormone 2 receptor	E5S945	Desconocidas	Tsp_00265

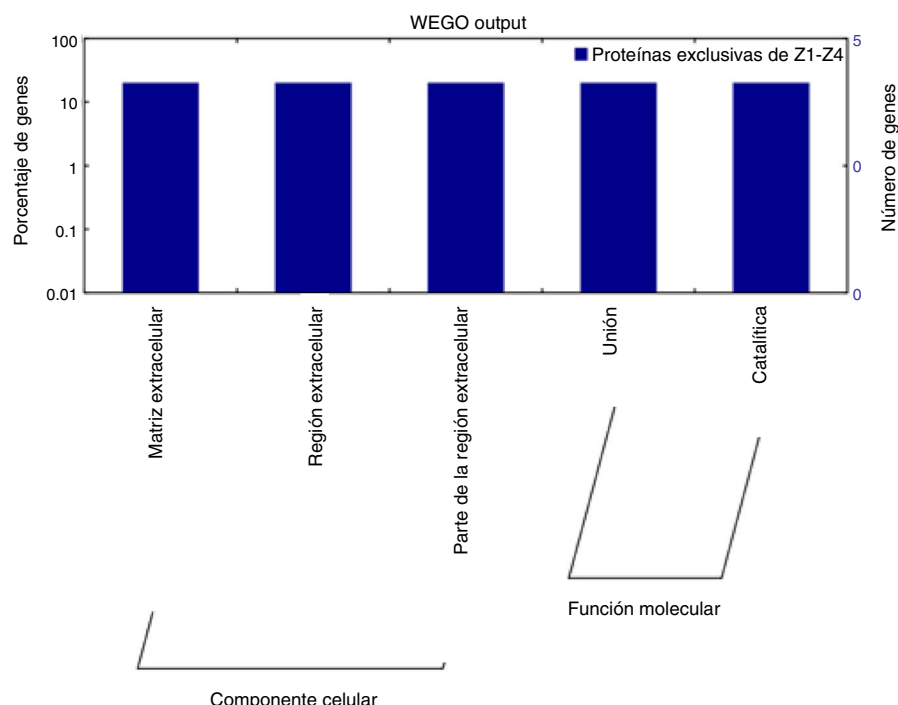


Figura 5 Ontología de genes de los PES de *T. spiralis* y cuatro cepas obtenidas de hospederos incidentales. Las proteínas identificadas tienen funciones moleculares correspondientes a la formación de la matriz extracelular del parásito, actividad catalítica y unión a las células del hospedero.

Cabe destacar que se encontró una expresión diferencial de proteínas que tienen alto peso molecular, entre 110 y 180 kDa.

Este trabajo permitió analizar las características antigénicas de *T. spiralis* e identificar proteínas, compartidas y exclusivas, de cepas obtenidas de hospederos accidentales (no reportados anteriormente) contra la cepa de referencia aislada de cerdos (hospedero habitual de este nemátodo).

Fue importante analizar la participación de este nuevo hospedero en el ciclo biológico de *T. spiralis*, ya que podría ser una vía indirecta de transmisión de esta enfermedad para el hombre al infectar a cerdos ferales utilizados para consumo humano. En este trabajo se presentan las bases para futuras investigaciones encaminadas a conocer los mecanismos de transmisión indirecta a humanos.

El análisis de los PES de larvas de *T. spiralis* obtenidas de hospederos accidentales mostró la presencia de cinco proteínas diferentes a las reportadas en la cepa de referencia aislada de cerdo.

De acuerdo con el análisis por Western blot, estas proteínas tienen mayor patogenicidad con relación a la cepa de referencia, y presentan un patrón diferente de proteasas, lo que les confiere mayor poder invasivo. El análisis de estas proteínas es importante, ya que se puede transferir la información genética para su traducción desde hospederos accidentales hacia hospederos habituales de este parásito, y de ser así, muy frecuentemente la infección a humanos sería más severa y letal.

En las cepas aisladas de perro se presentan proteínas de mayor invasión a las células del hospedero, por lo que el análisis y uso de estas proteínas podría servir como diagnóstico temprano al no presentar reacción cruzada con otros

helminthos, como es el caso de la cepa de *T. spiralis* aislada de cerdos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Bandi C, La Rosa G, Comincini S, Damiani G, Pozio E. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology*. 1993;107:419–24.
- Meslin F, Stöhr K, Heymann D. Public health implications of emerging zoonoses. *Rev Sci Tech*. 2000;19:310–7.
- Murrell K, Lichtenfels R, Zarlenga DS, Pozio E. The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Vet Parasitol*. 2000;93:293–307.

4. Ortega-Pierres M, Arriaga C, Yépez-Mulia L. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Vet Parasitol*. 2000;93:201–25.
5. Cabral J, Villacaña H, Fragoso R, Contreras A. Perfil epidemiológico de la triquinosis en el Estado de Zacatecas. *Salud Publica Mex*. 1990;32:575–82.
6. Yang Y, Zhang Z, Yang J, Chen X, Cui S, Zhu X. Oral vaccination with Ts87 DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* larval challenge. *Vaccine*. 2010;28:2735–42.
7. Tay ZJ, Sánchez VJ, Ruiz SD, Calderón RL, García YY, Alonso T, et al. Estado actual de nuestros conocimientos sobre trichinellosis en la República Mexicana: reporte de nuevas localidades infectadas. *Rev Fac Med UNAM*. 2004;3:96–100.
8. Viveros N, Arriaga C, Banda V, Ortega-Pierres MG, Yépez-Mulia L. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestion, ELISA and PCR. *Parasite*. 2001;8:S257–9.
9. Berumen V, Muñoz J, Moreno M. Trichinellosis in dogs from Zacatecas, México. *Parasitol Latinoam*. 2002;57:72–4.
10. Cui J, Liu R, Wang L, Zhang X, Jiang P, Liu M, et al. Proteomic analysis of surface protein of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasit Vectors*. 2013;6:355.
11. Ye J, Fang L, Zheng H, Zhang Y, Chen J, Zhang Z, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acid Res*. 2006;34:W293–7.
12. Liu L, Blaxter M, Shi A. The 5s ribosomal RNA intergenic region of parasitic nematodes variation in size and presence of SLI RNA. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83:235–9.
13. Nagano I, Wu Z, Yakahashi Y. Functional genes and proteins of *Trichinella sp*. *Parasitol Res*. 2009;104:197–207.
14. Ortega-Pierres G, Muñiz E, Coral-Vázquez R, Parkhouse RM. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol Res*. 1989;75:563–7.