

ESTUDIO DEL PROTEOMA EN MALARIA

Malaria Proteomic Research

Jesús MORÁN¹; Darwin A. MORENO-PÉREZ^{1,2}; Manuel A. PATARROYO^{2,3}; Antonio MURO^{1*}

¹ Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Unidad de Investigación acreditada por la Junta de CyL «Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO)». Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Facultad de Farmacia, Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca, España

² Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Carrera 50 No.26-20, Bogotá, Colombia

³ Universidad del Rosario, Carrera 63D No.24-31, Bogotá, Colombia

*Correo-e: ama@usal.es

RESUMEN: La malaria sigue siendo una de las principales enfermedades transmisibles del planeta, especialmente en áreas tropicales y subtropicales. Dentro de las diversas especies causantes de esta enfermedad, en los últimos años ha ganado relevancia el estudio de *P. vivax* debido a sus características propias, que la hacen especialmente difícil de erradicar.

En el presente estudio, nos proponemos analizar e identificar las proteínas de la fase hemática de *P. vivax* mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS).

Los resultados del estudio nos permitieron identificar 743 proteínas, de las que 522 no habían sido previamente descritas en la especie *P. vivax*. Además, la comparación del perfil de expresión de estas proteínas con el perfil transcripcional de *P. vivax* nos permitió corroborar lo descrito en estudios anteriores: el cambio adaptativo en el perfil transcripcional de la cepa de referencia Sal-I de *P. vivax*.

Palabras clave: *P. vivax*; proteoma; espectrometría de masas; proteínas.

ABSTRACT: Malaria is one of the main infectious diseases in the world, particularly in tropical and subtropical areas. Among the species that can cause this disease, in recent years *P. vivax* has been growing due to its own attributes, which make it highly difficult to eradicate.

This study was focused on analyzing and identifying the proteome of *P. vivax* during the blood stage through a mass spectrometry analysis (LC-MS-MS).

Results allowed us to identify 743 proteins, of which 522 never had been described before. Furthermore, the comparison of the expression of these proteins with *P. vivax* transcriptional profile allowed us to corroborate the adaptive change in the *P. vivax* VCG-1 strain transcriptome, previously described.

Key words: *P. vivax*; Proteome; Mass spectrometry; Proteins.

INTRODUCCIÓN

La malaria continúa siendo a día de hoy una de las enfermedades transmisibles más importantes del planeta. Según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2012 se registraron aproximadamente 135-287 millones de casos de esta enfermedad, causando entre 473.000 y 789.000 muertes (WHO 2013). De las 5 especies causantes de malaria en humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*), *P. falciparum* ha sido señalada como la más importante durante más de 30 años, considerándose las infecciones por el resto de especies como benignas. No obstante, en los últimos años se ha comenzado a reconocer la importancia de *P. vivax* debido a la alta carga de morbilidad que genera y al grave deterioro de la calidad de vida de los individuos que sufren la enfermedad (Mendis *et al.* 2001). Además, el mayor rango de distribución geográfica de *P. vivax* hace que amenace a un 40% de la población mundial (Price *et al.* 2007). Esta mayor distribución se justifica en que las condiciones de temperatura y altitud que necesita el parásito para reproducirse dentro del mosquito son menos exigentes que para otras especies. Otra de las características diferenciales de *P. vivax* es que requiere de la presencia de una molécula específica en la superficie de los glóbulos rojos conocido como el antígeno Duffy (también conocido como DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*)) para poder invadirlos (Arévalo-Herrera *et al.* 2010); por ende, a pesar de ser África el continente con más casos registrados de malaria, *P. vivax* no mantiene esta tendencia, ya que la presencia de este antígeno es una característica poco común entre la población del Centro y Oeste de dicho continente mientras que se encuentra ampliamente distribuida en zonas tropicales de Sudamérica y del Sudeste asiático (Howes *et al.* 2011).

Otra de las razones por las que el estudio de esta especie ha ganado relevancia en los últimos tiempos es debido a que se ha demostrado que es más difícil de controlar y erradicar que *P. falciparum* (Gething *et al.* 2012). En este hecho influyen dos características propias del parásito: la aparición temprana de gametocitos (fase vital que es tomado por el mosquito para continuar el ciclo de vida) antes de que se diagnostique la infección y aparezcan los síntomas clínicos (WHO 2013); y la formación de hipnozoitos, los cuales son formas latentes que se localizan en el hígado y que pueden activarse en un momento determinado, produciendo recaídas de la enfermedad (Baird 2013).

A pesar del creciente interés en *P. vivax*, su estudio al momento de iniciar este trabajo era muy limitado por la dificultad que tiene su cultivo *in vitro*, debido a que el crecimiento de este parásito en células sanguíneas se produce de manera preferente en reticulocitos, glóbulos rojos inmaduros de difícil obtención debido a su escasez en la sangre humana (Moreno-Pérez *et al.* 2013).

En el momento actual, tanto el genoma como el transcriptoma de *P. vivax* han sido ya publicados, pero estos estudios no son completamente representativos de la complejidad biológica de esta especie, ya que no tienen en cuenta diferentes factores de regulación postranscripcionales. Por ello, parece necesario el estudio cualitativo del proteoma con el fin de conocer de manera exacta cómo evoluciona el parásito a lo largo de su ciclo vital.

En el marco del estudio proteómico de *P. vivax*, se han hecho varias aproximaciones usando diversas técnicas: separación por electroforesis 2D seguida de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) (Roobson *et al.* 2011); electroforesis 2D y posterior espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Ray *et al.* 2012); y espectrometría de masas directa ESI-Q TOF (Acharya *et al.* 2011). La técnica espectrométrica utilizada en este estudio, la espectrometría de masas con disociación iónica inducida por colisión (MS-CID), es una de las más utilizadas en la actualidad para el análisis de moléculas iónicas y destaca por su alta sensibilidad en la detección de péptidos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las proteínas de la fase hemática de *Plasmodium vivax* con el fin de conocer parcialmente la biología del parásito durante la infección en los reticulocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el ensayo, se procesaron muestras del parásito de la cepa VCG1 de *P. vivax* enriquecidas en las principales formas de desarrollo dentro de la célula (anillos,

trofozoitos y esquizontes) en el laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Las muestras fueron lisadas con un buffer de saponina 0.02 mM que contenía K_2HPO_4 7 mM, NaH_2PO_4 1 mM, $NaHCO_3$ 11 mM, KCl 58 mM, NaCl 56 mM, $MgCl_2$ 1 mM y glucosa 14 mM, pH 7.5. Luego, las proteínas se precipitaron mediante el método metanol/cloroformo, se digirieron con Lys-C y tripsina y se purificaron por cromatografía en fase reversa usando columnas StageTips C_{18} .

El análisis por espectrometría de masas se llevó a cabo en la Unidad de proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de la Universidad de Salamanca. Los péptidos fueron analizados en NanoUPLC-ESI-MS/MS usando un cromatógrafo líquido de nanoflujo (nanoAcquity UPLC system, Waters Corp., Milford, MA) acoplado en línea con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher, San Jose, CA). Cada muestra se analizó cuatro veces, por lo que el número total de resultados obtenidos fue de 12.

El algoritmo Sequest HT se utilizó para buscar los espectros MS/MS adquiridos, usando el software Discoverer de Thermo Scientific (v. 1.4.0.288), en un conjunto de proteomas compuesto de secuencias de referencia del parásito *P. vivax* (5.389 secuencias de aminoácidos), de la familia de monos del nuevo mundo (42.013 moléculas) y de contaminantes comunes (ej. queratinas humanas, tripsina, Lys-C and BSA), descargados de la base de datos Uniprot en abril de 2014.

Las proteínas identificadas fueron comparadas con aquellas publicadas en estudios de proteoma previos y con el análisis del transcriptoma reportado en la base de datos PlasmDB (último acceso 28 de mayo de 2014) (Aurrecoechea *et al.* 2009). La anotación funcional de moléculas involucró el uso de la base de datos para la anotación, visualización y descubrimiento integrado DAVID 6.7 2003-2014 (de sus siglas en inglés *Functional annotation involved using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*) (Huang *et al.* 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de proteínas

La comparación de los espectros MS/MS frente a la base de datos de proteomas construida mostró un total de 1304 proteínas que cumplieron el criterio de inclusión del algoritmo Sequest HT con alto nivel de confianza (valor $p=0.01$ estimado por Percolator), de las cuales 743 fueron identificadas como proteínas pertenecientes a *P. vivax*, 551 de primates del género *Aotus* y otras 10 se describieron como proteínas contaminantes (Figura 1).

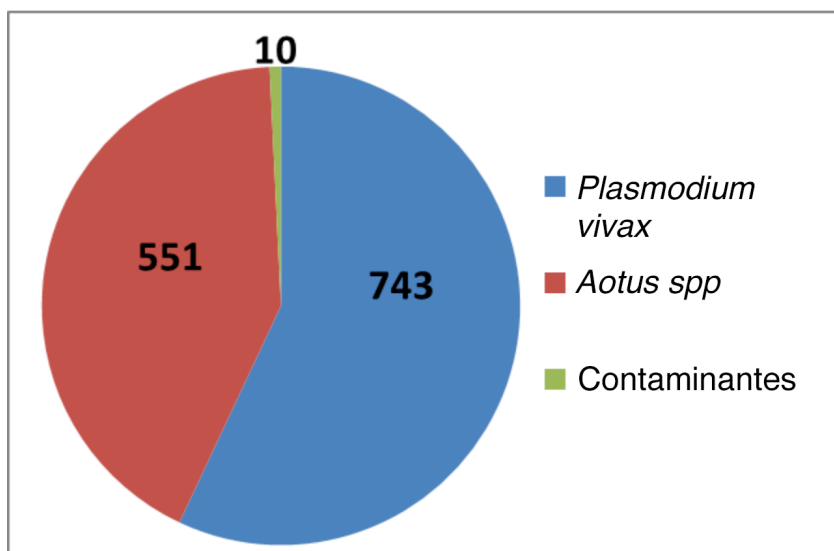


FIGURA 1: Distribución de las proteínas identificadas en el ensayo en función de su origen.

Al realizar la comparación de las 743 proteínas de *P. vivax* identificadas frente a las 415 moléculas descritas en estudios anteriores, 522 resultaron no haber sido descritas con anterioridad, mientras que 195 de las proteínas descritas en la bibliografía no fueron identificadas en el ensayo, lo cual probablemente se debe a que la complejidad de la muestra enriquecida en esquizontes en dichos estudios fue reducida, optimizando así la detección de péptidos pertenecientes a proteínas de baja abundancia.

De las 743 proteínas encontradas pertenecientes a *P. vivax*, 178 (23.96%) eran consideradas como hipotéticas (*hypothetical proteins*), las cuales son descritas en base a la similitud con secuencias de las proteínas de *P. falciparum* descritas en PlasmoDB.

Comparación con el perfil transcripcional de P. vivax

Los resultados del análisis de evidencias de transcripción de los genes correspondientes a las proteínas aquí identificadas se resumen en la Tabla 1. De particular interés, se encontraron 8 proteínas de las que no había constancia de su expresión *in vivo*, las cuales se describen en la Tabla 2. La presencia de proteínas aquí encontradas que no tienen ningún dato reportado de transcripción, soporta la noción de que hay un cambio en el perfil transcripcional de la cepa VCG1 de

P. vivax, lo que coincide con los estudios previos realizados por los grupos de Bozdech (Bozdech *et al.* 2008) y Westenberger (Westenberger *et al.* 2010), quienes han identificado diferencias en el perfil de transcripción genético en parásitos de *P. vivax* aislados de pacientes provenientes de Tailandia y Perú.

TABLA 1: Número total de proteínas que muestran su máxima expresión en cada periodo de tiempo.

TIEMPO ESTIMADO DE MÁXIMA EXPRESIÓN	NÚMERO TOTAL DE PROTEÍNAS
9 horas	104
13 horas	54
17 horas	79
20 horas	90
23 horas	66
29 horas	110
35 horas	111
40 horas	62
43 horas	59
Sin expresión reportada	8

TABLA 2: Proteínas sin evidencia de expresión.

CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
PVX_086055	Hypothetical protein, conserved
PVX_091992	Hypothetical protein
PVX_096292	HAM1 domain containing protein
PVX_097577	Tryptophan-rich antigen (Pv-fam-a)
PVX_113574	Hypothetical protein, conserved
PVX_116635	Dihydrofolate synthase/folylpolyglutamate synthase, putative
PVX_118162	Hypothetical protein
PVX_123597	Arginyl-tRNA synthetase, putative

Anotación de ontología génica (OG)

Con el fin de clasificar las proteínas identificadas en la cepa VCG1 de *P. vivax* en categorías relacionadas con sus correspondientes procesos biológicos se realizó un análisis de anotación de genes en términos de ontología génica usando el software DAVID. En este análisis se categorizaron solo 328 de las 743 proteínas, lo que posiblemente se debe a que la mayoría de las proteínas de *P. vivax* no tienen similitud con aquellas para las cuales su función ha sido descrita en las distintas bases de datos. El enriquecimiento de términos mostró una clara correlación entre los procesos biológicos conformados por un mayor número de proteínas identificadas y las necesidades del parásito. Por ejemplo, durante el periodo de división y maduración se destacan los procesos de síntesis y maduración de proteínas (173 proteínas identificadas), síntesis de otras macromoléculas (133), movimiento de orgánulos y macromoléculas en el interior de la célula (64) y procesos catabólicos para la obtención de energía (39). Resulta bastante significativo el bajo número de proteínas implicadas en procesos de síntesis de nucleótidos y nucleósidos (29) y aminoácidos (26), condición que podría estar debida al carácter propio de *P. vivax*, ya que la utilización de aminoácidos y nucleótidos provenientes de la degradación de moléculas de la célula hospedadora haría innecesaria su síntesis, aunque también puede deberse a que estas proteínas, expresadas en pequeña cantidad, hayan quedado eclipsadas a la hora de la determinación por otras proteínas más abundantes, o incluso por las proteínas contaminantes.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio, con la descripción de 743 proteínas de las que 522 nunca antes habían sido descritas, puede aportar un avance significativo en el análisis de los procesos biológicos de la fase hemática de *P. vivax*, además de servir como muestra del poco interés que ha suscitado el estudio de esta especie en los últimos años.

La alta proporción de proteínas provenientes de primates identificadas en las primeras fases del estudio (42.25%) resalta la necesidad de conseguir un adecuado sistema de purificación del extracto de *P. vivax*, ya que la identificación de proteínas contaminantes presentes en gran cantidad en la muestra debido a la necesidad de utilizar sangre de estos animales para su cultivo *in vivo*, puede eclipsar la identificación de proteínas poco expresadas en el parásito.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHARYA, P., PALLAVI, R., CHANDRAN, S., DANDAVATE, V., SAYEED, S. K. *et al.*: Clinical proteomics of the neglected human malarial parasite *Plasmodium vivax*. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26623.
- ARÉVALO-HERRERA, M., CHITNIS, C. y HERRERA, S.: Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Hum Vaccin*. 2010; 6(1): 124-132.
- AURRECOECHEA, C., BRESTELLI, J., BRUNK, B. P., DOMMER, J., FISCHER, S., GAJRIA, B., GAO, X., GINGLE, A., GRANT, G., HARB, O. S. *et al.*: PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: D539-543.
- BAIRD, J. K.: Malaria caused by *Plasmodium vivax*: recurrent, difficult to treat, disabling, and threatening to life- averting the infectious bite preempts these hazards. *Pathog Glob Health*. 2013; 107(8): 475-9.
- BOZDECH, Z., MOK, S., GUANGAN, H., IMWONG, M., JAIDEE, A. *et al.*: The transcriptome of *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. *PNAS*. 2008; 105(42): 16290-5.
- GETHING, P. W., ELYAZAR, I. R. F., MOYES, C. L., SMITH, D. L., BATTLE, K. E., *et al.*: A Long Neglected World Malaria Map: *Plasmodium vivax* Endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(9): e1814.
- HOWES, R. E., PATIL, A. P., PIEL, F. B., NYANGIRI, O. A., KABARIA, C. W. *et al.*: The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun*. 2011; 2: 266.
- HUANG, D. W., SHERMAN, B. T. y LEMPICKI, R. A.: Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*. 2009; 4(1): 44-57. Disponible en: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/> [Último acceso 6 de junio de 2014].
- MENDIS, K., SINA, B. J., MARCHESINI, P. y CARTER, R.: Neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 64(1,2): 97-106.
- MORENO-PÉREZ, D. A., RUIZ, J. A. y PATARROYO, M. A.: Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. *Biol Cell*. 2013; 105: 251-260.
- PRICE, R. N., TJITRA, E., GUERRA, C. A., YEUNG, S., WHITE, N. J. *et al.*: Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77(6 Suppl): 79-87.
- RAY, S., RENU, D., SRIVASTAVA, R., GOLLAPALLI, K., TAUR, S. *et al.*: Proteomic investigation of falciparum and vivax malaria for identification of surrogate protein markers. *PLoS One*. 2012; 7(8): e41751.
- ROOBSONG, W., ROYTRAKUL, S., SATTABONGKOT, J., LI, J., UDOMSANGPETCH, R. *et al.*: Determination of the *Plasmodium vivax* schizont stage proteome. *J Proteomics*. 2011; 74(9): 1701-10.
- WESTENBERGER, S. J., MCCLEAN, C. M., CHATTOPADHYAY, R., DHARIA, N. V., CARLTON, J. M., *et al.*: A systems-based analysis of *Plasmodium vivax* lifecycle transcription from human to mosquito. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(4): e653.
- WHO: World malaria report 2013. WHO global malaria programme; 2013.