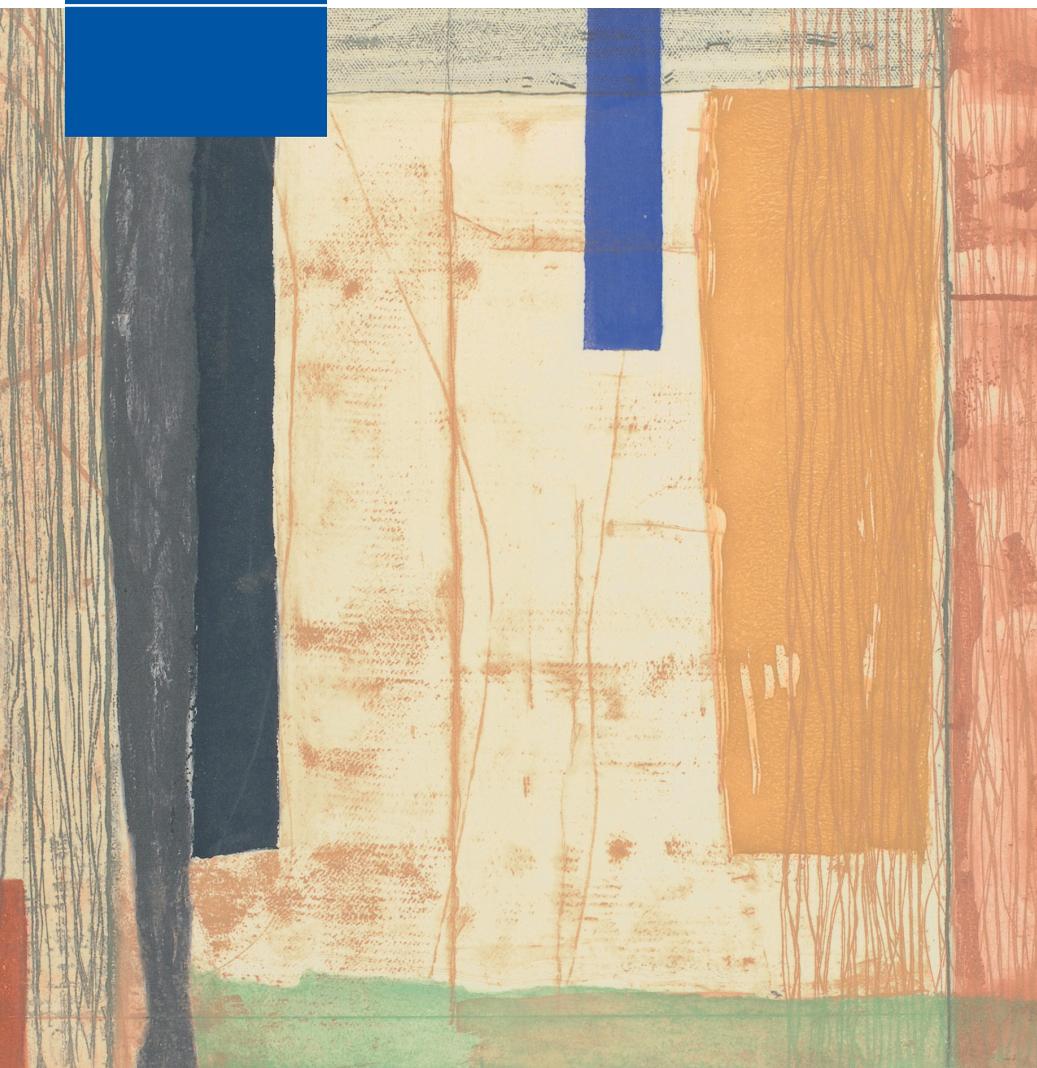


LA LUCHA FRENTE A LAS ENFERMEDADES DE LA POBREZA

Responsabilidad y necesidad

Vicente Larraga Rodríguez de Vera (Ed.)

Fundación **BBVA**



**LA LUCHA FRENTE A
LAS ENFERMEDADES DE LA POBREZA**

La lucha frente a las enfermedades de la pobreza

Responsabilidad y necesidad

Edición a cargo de

Vicente Larraga Rodríguez de Vera

<i>Raquel Afonso Leshman</i>	<i>Marta López de Diego</i>
<i>Belkisyolé Alarcón de Noya</i>	<i>Manuel Carlos López López</i>
<i>Pedro Albajar-Viñas</i>	<i>Jacob Lorenzo Morales</i>
<i>Pedro José Alcolea Alcolea</i>	<i>María Angelita Lorenzo Sarmiento</i>
<i>Ana Alonso Ayala</i>	<i>Sandra Losada Gallegos</i>
<i>Henry A. Bermúdez Ramírez</i>	<i>Francisco Macías Huete</i>
<i>Agustín Benito Llanes</i>	<i>Concepción Marañón Lizana</i>
<i>Beatriz Camps Carmona</i>	<i>Enrique Martínez Carretero</i>
<i>Patricia E. Carreira Moreno</i>	<i>Laura Murcia Flores</i>
<i>Bartolomé Carrilero Fernández</i>	<i>José Luis Nieto-Torres</i>
<i>Cecilia Colmenares</i>	<i>Óscar Noya González</i>
<i>Daniel Deniz García</i>	<i>Michael Parkhouse</i>
<i>Zoraida Díaz-Bello</i>	<i>Concepción Judith Puerta Bula</i>
<i>Adriana Egui Machado</i>	<i>José Ángel Regla-Nava</i>
<i>Luis Enjuanes Sánchez</i>	<i>Beatriz Rojas Ruiz</i>
<i>Elizabeth Ferrer Jesús</i>	<i>Raiza Ruiz-Guevara</i>
<i>Pilar Foronda Rodríguez</i>	<i>Manuel Segovia Hernández</i>
<i>Teresa Gárate Ormaechea</i>	<i>María del Carmen Thomas Carazo</i>
<i>Marta García Cañadas</i>	<i>Marilyan Toledo Alfonso</i>
<i>Luis Miguel González Martínez</i>	<i>Basilio Valladares Hernández</i>
<i>María Asunción Iborra Bendicho</i>	<i>Mar Velarde Rodríguez</i>
<i>José Manuel Jiménez-Guardeño</i>	<i>Reinaldo Zavala Jaspe</i>
<i>Vicente Larraga Rodríguez de Vera</i>	

Fundación **BBVA**

La decisión de la Fundación BBVA de publicar el presente libro no implica responsabilidad alguna sobre su contenido ni sobre la inclusión, dentro de esta obra, de documentos o información complementaria facilitada por los autores.

No se permite la reproducción total o parcial de esta publicación, incluido el diseño de la cubierta, ni su incorporación a un sistema informático, ni su transmisión por cualquier forma o medio, sea electrónico, mecánico, reprográfico, fotoquímico, óptico, de grabación u otro sin permiso previo y por escrito del titular del *copyright*.

DATOS INTERNACIONALES DE CATALOGACIÓN

La lucha frente a las enfermedades de la pobreza : responsabilidad y necesidad / edición a cargo de Vicente Larraga Rodríguez de Vera ; Raquel Afonso Leshman... [et al.]. — 1.ª ed.
— Bilbao : Fundación BBVA, 2011.
229 p. ; 24 cm
ISBN: 978-84-92937-00-4
1. Prevención y control de las enfermedades infecciosas.
2. Prevención de epidemias. I. Larraga Rodríguez de Vera, Vicente, ed. II. Afonso Leshman, Raquel. III. Fundación BBVA, ed. 614.4

Primera edición, marzo 2011

© los autores, 2011

© Fundación BBVA, 2011
Plaza de San Nicolás, 4. 48005 Bilbao

IMAGEN DE CUBIERTA: © Mela FERRER, 2011
Huella de color, 2007
Aguafuerte, aguatinta y barniz blando, 760 x 570 mm
Colección de Arte Gráfico Contemporáneo
Fundación BBVA - Calcografía Nacional

ISBN: 978-84-92937-00-4

DEPÓSITO LEGAL: M-12.677-2011

EDICIÓN Y PRODUCCIÓN: Editorial Biblioteca Nueva

COMPOSICIÓN Y MAQUETACIÓN: Márvel, S. L.

IMPRESIÓN Y ENCUADERNACIÓN: Rógar, S. A.

Impreso en España – *Printed in Spain*

Los libros editados por la Fundación BBVA están elaborados sobre papel con un 100% de fibras recicladas, según las más exigentes normas ambientales europeas.

Í N D I C E

Prólogo, <i>Vicente Larraga Rodríguez de Vera</i>	13
Introducción, <i>Vicente Larraga Rodríguez de Vera</i>	17
1. Situación de la malaria y estado actual de las resistencias en el tratamiento de la malaria <i>Agustín Benito Llanes</i>	
1.1. Situación actual de la malaria en el mundo	25
1.2. El parásito	26
1.2.1. Ciclo del parásito en el hombre	27
1.2.2. Ciclo del parásito en el vector	28
1.2.3. Medicamentos disponibles para el tratamiento de la malaria	29
1.3. Resistencia a los antimaláricos	31
1.3.1. Métodos para la detección de las resistencias	34
1.3.2. Factores determinantes en la aparición de resistencias	36
1.3.3. Selección de resistencias	36
1.3.4. Base farmacológica de la terapia antimalárica	37
1.3.5. Epidemiología molecular en el estudio de las resistencias y su distribución	38
1.3.6. Naturaleza multigénica de la resistencia a la cloroquina (CQ)	39
1.3.7. Combinación de fármacos en la era de la multiresistencia	40
1.3.8. Estrategia para el desarrollo de vacunas y nuevas tendencias	42
Bibliografía	46

2. Emergencia de virus. Evolución y protección frente al coronavirus de la neumonía atípica SARS-CoV	
<i>Luis Enjuanes Sánchez, Marta López de Diego, José Luis Nieto-Torres, José Manuel Jiménez-Guardeño y José Ángel Regla-Nava</i>	
2.1. Los virus	47
2.2. Virus emergentes	47
2.3. Epidemia producida por el virus SARS-CoV: un ejemplo reciente	52
2.4. Emergencia de virus como consecuencia del comportamiento humano	54
2.5. Estrategias para combatir las infecciones virales	55
2.6. Desarrollo de una vacuna para prevenir el SARS-CoV	57
Agradecimientos	62
Bibliografía	62
3. Cisticercosis: una enfermedad tropical abandonada	
<i>Elizabeth Ferrer Jesús, Luis Miguel González Martínez, Teresa Gárate Ormaechea y Michael Parkhouse</i>	
3.1. Resumen	63
3.2. Introducción	64
3.3. Medidas de control	65
3.4. Conclusiones	68
Bibliografía	68
4. La lucha frente a la enfermedad de Chagas: una enfermedad silenciosa y silenciada cien años después de su descubrimiento	
<i>Mar Velarde Rodríguez, Beatriz Camps Carmona y Pedro Albajar-Viñas</i>	
4.1. El descubrimiento de la enfermedad y el contexto social	72
4.2. Perfiles epidemiológicos cambiantes	73
4.3. El parásito, el vector y las vías de transmisión	75
4.4. La prevención y el control	77
4.5. La enfermedad	78
4.6. El diagnóstico	80
4.7. El tratamiento	81
4.8. El ciclo pobreza-enfermedad	82
4.9. Una selección de propuestas	82
Bibliografía	85

5. La enfermedad de Chagas en Murcia. El mayor foco de infección fuera del área endémica	
<i>Laura Murcia Flores, Bartolomé Carrilero Fernández, María Asunción Iborra Bendicho y Manuel Segovia Hernández</i>	
5.1. Introducción	87
5.1.1. Epidemiología	87
5.1.2. Manifestaciones clínicas y diagnóstico	89
5.1.3. Tratamiento y prevención	91
5.2. Nuestra experiencia en la Unidad Regional de Medicina Tropical de Murcia (URMTM)	93
5.2.1. Características epidemiológicas de los pacientes atendidos	94
5.2.2. Características clínicas de los pacientes diagnosticados	97
5.2.3. Tratamiento y seguimiento de los pacientes diagnosticados	99
5.2.4. La utilidad del PCR en el seguimiento de la respuesta al benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas	100
Agradecimientos	103
Bibliografía	103
6. Respuesta celular CD8 ⁺ frente a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	
<i>Manuel Carlos López López, Concepción Marañón Lizana, Adriana Egui Machado, Concepción Judith Puerta Bula y María del Carmen Thomas Carazo</i>	
6.1. Introducción	107
6.2. Inmunopatología de la enfermedad de Chagas	109
6.3. Identificación de epítopes CD8 ⁺ contenidos en antígenos de <i>T. cruzi</i>	112
6.4. Inmunoterapia frente a la enfermedad de Chagas	117
6.5. Conclusiones	120
Agradecimientos	121
Bibliografía	121

7. Microepidemias de transmisión oral de la enfermedad de Chagas en Venezuela	
<i>Belkisyolé Alarcón de Noya, Zoraida Díaz-Bello, Cecilia Colmenares, Raiza Ruiz-Guevara, Reinaldo Zavala-Jaspe y Óscar Noya González</i>	
7.1. Introducción	123
7.2. Modalidades de la transmisión de <i>T. cruzi</i>	124
7.3. Antecedentes de presencia de elementos del ciclo de transmisión de <i>T. cruzi</i> en ecosistemas urbanos en Venezuela	125
7.4. Transmisión oral de la enfermedad de Chagas en Venezuela	125
7.5. Impacto ecológico y clínico de la transmisión de la enfermedad de Chagas en la ciudad de Caracas	127
Agradecimientos	129
Bibliografía	130
8. Protozoos emergentes: del diagnóstico al control	
<i>Basilio Valladares Hernández, Enrique Martínez Carretero, Pilar Foronda Rodríguez y Jacob Lorenzo Morales</i>	
8.1. Introducción	133
8.1.1. <i>Cryptosporidium sp</i>	133
8.1.2. <i>Giardia intestinalis</i>	135
8.1.3. Amebas de vida libre	136
8.2. Mecanismo de infección	139
8.2.1. Silenciamiento del gen que expresa las serín-proteasas en <i>Acanthamoeba</i>	141
8.2.2. Silenciamiento del gen que expresa la glucógeno fosforilasa en <i>Acanthamoeba</i>	142
Bibliografía	144
9. Elementos móviles de ADN: mochileros en el genoma	
<i>María del Carmen Thomas Carazo, Francisco Macías Huete, Patricia E. Carreira Moreno, Beatriz Rojas Ruiz, Marta García-Cañadas y Manuel Carlos López López</i>	
9.1. Introducción	147
9.2. Clasificación de elementos móviles	149
9.3. Elementos móviles en tripanosomátidos	151
Agradecimientos	157
Bibliografía	158

10. DEXH RNA helicasa en <i>Leishmania</i> y su potencial función en la traducción <i>Enrique Martínez Carretero, Daniel Deniz García, Raquel Afonso Leshman y Basilio Valladares Hernández</i>	
10.1. Introducción	161
10.2. Relación <i>Leishmania</i> hospedador	161
10.3. <i>Leishmania</i> en su entorno molecular	164
Bibliografía	169
11. Aproximación al desarrollo de una vacuna sintética contra <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Óscar Noya González, Sandra Losada Gallegos, Henry A. Bermúdez Ramírez, María Angelita Lorenzo Sarmiento, Marilyan Toledo Alfonso y Belkisyolé Alarcón de Noya</i>	
11.1. Introducción	171
11.2. El parásito	172
11.3. Interacción parásito-hospedero	174
11.4. Antígenos como candidatos vacunales	176
11.5. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo	178
Agradecimientos	181
Bibliografía	182
12. La genómica aplicada a la detección de genes implicados en la diferenciación/infectividad en <i>Leishmania infantum</i> <i>Ana Alonso Ayala, Pedro José Alcolea Alcolea y Vicente Larraga Rodríguez de Vera</i>	
12.1. Introducción	185
12.2. El uso de los <i>microarrays</i> en la expresión génica diferencial entre las diferentes fases del ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	192
12.3. La expresión génica diferencial entre promastigotes y amastigotes de <i>L. infantum</i> . Efecto del pH y la temperatura	197
Agradecimientos	201
Bibliografía	201
Índice de cuadros, esquemas y figuras	205
Índice de gráficos y mapas	208
Índice alfabético	211
Nota sobre los autores	215

Prólogo

ESTE libro se enfrenta a un problema que permanece ignorado por las sociedades occidentales desarrolladas pero que representa un reto importante a nivel mundial. Los científicos y clínicos que trabajan en este tipo de enfermedades saben que estas representan un problema, no solamente para las poblaciones afectadas en los países en desarrollo, cientos de millones, sino también para las sociedades desarrolladas que se creen a salvo de las mismas. Un mundo interdependiente como el actual no presenta barreras para estas enfermedades y sus agentes causales. Por ello, el concepto de responsabilidad para ayudar a las sociedades menos favorecidas se está viendo complementado por el de la necesidad, pues nuevas poblaciones que se creían a salvo en su mundo desarrollado se están viendo afectadas por las mismas. En este contexto, la Fundación BBVA en octubre de 2009 promovió una reunión de expertos con el fin de determinar el estado del conocimiento, tanto clínico como de investigación científica, de estas enfermedades y hacer una llamada de atención sobre estas enfermedades de la pobreza que ya no solo afectan a los países nominalmente pobres, sino que son una realidad en los sistemas de salud occidentales y muy en primer plano en el sistema nacional de salud español.

Existe al menos una docena de patologías asociadas al concepto de enfermedades de los pobres. Se estima que solo las enfermedades respiratorias provocan cuatro millones de muertes al año en el mundo, y *The Lancet* acaba de publicar un informe de la Organización Mundial de la Salud que cifra en 1,5 millones las muertes anuales por diarrea. También la malaria y la tuberculosis superan ya el millón de muertes cada año.

El 60% de los casos de malaria se presentan en el 20% de la población más pobre del mundo. Un tercio de los casos de malaria clínica se sitúan en Asia y un 3% en América, pero el 80% de las

muerres por malaria se concentran en el África subsahariana y la mayoría son niños menores de cinco años. La malaria se considera el paradigma de las enfermedades parasitarias en mujeres embarazadas, que tienen especial riesgo de contraerla.

Según datos aportados por la Red de Enfermedades Tropicales del Instituto de Salud Carlos III español, la malaria le cuesta al continente africano 12.000 millones de dólares al año, aunque los expertos calculan que controlar eficazmente la malaria en los 82 países que concentran el mayor número de casos costaría 3.200 millones de dólares al año. Un problema reciente para quienes luchan contra esta enfermedad es que han detectado nuevas formas del parásito que la provoca, el *Plasmodium falciparum*, resistentes a los tratamientos actuales.

Aunque estas enfermedades de implantación mundial siguen concentradas en zonas geográficas marcadas por la pobreza, también están apareciendo o reapareciendo en países occidentales, bien como consecuencia de los movimientos migratorios o porque surgen bolsas de pobreza en áreas desarrolladas. Es el caso de la enfermedad de Chagas. Se calcula que cada año 200.000 personas la contraen en el mundo y 14.000 mueren por su causa. Considerado un problema de salud pública en el continente latinoamericano, los movimientos migratorios han traído la enfermedad a Europa y concretamente a nuestro país, como en la Región de Murcia, donde se han detectado 418 casos, lo que supone, junto con el foco de Barcelona, la mayor concentración de pacientes con enfermedad de Chagas del mundo fuera de la zona endémica. Estas personas requieren un tratamiento por parte del Sistema Nacional de Salud.

Las infecciones tropicales y subtropicales, también presentes en Europa, se están estudiando con detalle analizando mecanismos básicos de sus agentes causales, algunos de ellos emergentes. Asimismo, se está llevando a cabo una aproximación al desarrollo de nuevas vacunas y a la utilización de las modernas técnicas de la genómica en el estudio de nuevos desarrollos de fármacos y vacunas, como es el caso de la leishmaniosis, con 15 millones de afectados y dos millones de nuevos casos cada año.

En algunos casos se trata de enfermedades doblemente abandonadas porque se ubican en áreas pobres y su prevalencia no es tan alta. Así ocurre, por ejemplo, con la cisticercosis, una enfermedad tropical que afecta a los más pobres de los países en desarrollo.

El título de este libro ha sufrido una ligera variación sobre el original de la reunión de Madrid de octubre de 2009. Este cambio es consecuencia de las conclusiones que se obtuvieron entre los médicos y científicos participantes. El curso se planteaba una pregunta sobre la lucha por parte de los países occidentales frente a estas enfermedades: ¿responsabilidad o necesidad? La respuesta que surgió del debate no dejaba lugar a dudas: responsabilidad y necesidad. Las enfermedades siguen siendo de los pobres pero no solo de los llamados países pobres. Las sociedades opulentas de occidente se están viendo cada vez más afectadas y no solo por las poblaciones emigrantes, sino también en sus crecientes bolsas de pobreza. El lector encontrará en las páginas de este libro bastantes datos sobre el avance mundial de las enfermedades de los pobres y cómo se está intentando utilizar las técnicas de la ciencia moderna para mejorar en la prevención y el tratamiento de las mismas. Hay que agradecer la visión y el interés de la Fundación BBVA y de sus reponsables por este tipo de problemas ante los que no cabe cerrar los ojos.

VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA
Director del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

Introducción

LA expresión *enfermedades de los pobres* recoge un conjunto de enfermedades infecciosas que afectan en su mayoría a poblaciones con un grado de desarrollo social más bajo. Se trata de un concepto sin duda occidental que tiende a mirar estas situaciones desde el punto de vista de los países desarrollados. No obstante, hay que considerar que estos países desarrollados hace un tiempo, hasta mediados del siglo xx, cumplían todas las condiciones para albergar estas enfermedades que fueron erradicadas gracias a la acción combinada de las vacunas, los nuevos medicamentos y las medidas higiénicas que supusieron una auténtica revolución en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Cabe recordar aquí que la malaria, hoy considerada paradigma del subdesarrollo, fue endémica en Europa hasta los años sesenta del siglo pasado y que las epidemias de una enfermedad como el cólera, considerada ahora exótica, todavía aparecían esporádicamente en brotes hasta hace una veintena de años.

Con todo, el mundo desarrollado ha conseguido acabar como problema importante con estas enfermedades que, a su vez, se resisten a desaparecer, no solo de los países en vías de desarrollo, sino también en bolsas de pobreza en los países industrializados. Por otra parte, la aparición del fenómeno de la emigración masiva por motivos laborales ha supuesto una ayuda adicional para el transporte a grandes distancias de agentes infecciosos que hasta hace muy poco tiempo tardaban años en extenderse. Baste recordar que la gripe que acabaría llamándose *española* se originó alrededor de 1907 en la cercanías de Shanghái y tardó unos diez años en llegar, a través del puerto de esta ciudad, a Estados Unidos, San Francisco, y de ahí a Fort Riley, Kansas, donde apareció el primer brote oficial en marzo de 1918, trasladándose a continuación, con el cuerpo expedicionario norteamericano, a una

Europa desnutrida y asolada por la guerra, donde causó una de las mayores pandemias conocidas hasta entonces con 40 millones de muertes. Cien años después, el brote reciente de gripe A se ha trasladado de América a Europa y al resto del mundo en unas pocas semanas. Así pues, las circunstancias son radicalmente diferentes y hay que adaptarse a ellas.

Este libro lleva a cabo una visión general de este tipo de enfermedades, haciendo hincapié tanto en aquellas que tienen una distribución general como en otras que constituyen un problema muy importante para amplias regiones del planeta, esencialmente el centro y el sur de América y África, con apariciones creadas por la nueva situación social en Europa. Los autores no solo estudian los aspectos epidemiológicos de los agentes causales de las enfermedades, sino también se refieren a los nuevos conceptos básicos de su fisiopatología que permiten el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas, esenciales en la lucha frente a las mismas.

A lo largo de los diferentes capítulos se muestran distintas visiones de enfermedades que suponen uno de los grandes retos de la medicina tropical y de la llamada salud internacional. Así el doctor Benito, director del Centro Nacional de Medicina Tropical y Salud Internacional, hace un repaso de la situación actual de uno de los problemas con los que se encuentran los médicos que luchan contra la malaria: las resistencias a los tratamientos. Se trata de una enfermedad con una incidencia de entre trescientos y quinientos millones de personas al año, con un millón de muertos. Esta enfermedad cuenta con un arsenal terapéutico bien establecido que incluye no solo la clásica quinina o la cloroquina de los años treinta del siglo xx, sino mezclas de fármacos usados en combinación como los antifolatos. No obstante, la presión selectiva contra el parásito ha hecho que este desarrolle mecanismos de resistencia que inutilizan la acción de los fármacos que además son diferentes en función de la especie del parásito de la que se trate.

Una de las epidemias que causan mayor mortalidad en la actualidad es la originada por las enfermedades respiratorias. Por una parte el recrudecimiento de las infecciones clásicas como la de la tuberculosis y, por otra, la aparición de nuevas entidades clínicas con una gran infectividad y gravedad en los síntomas obligan

a plantearse este tipo de infecciones como un problema clínico de primera magnitud. El doctor Luis Enjuanes, profesor de Investigación del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Centro Nacional de Biotecnología y con una amplísima experiencia en infecciones provocadas por virus, nos muestra cómo pueden ser las emergencias creadas por enfermedades originadas por virus. Existen diversas infecciones originadas por virus que presentan una gran movilidad y mortalidad, aunque, afortunadamente, todavía se presentan en áreas localizadas. La mayor parte de ellas tienen nombres exóticos: Lassa, Valle del Rift, Chikungunya, Ébola, etc. Los vectores de transmisión son variados: mosquitos, murciélagos, cerdos, zorros o mapaches, entre otros. Estas zoonosis presentan un peligro cierto para la población que en muchos casos, cuando se infecta, presenta una mortalidad cercana al 50%. Después de una visión histórica general, presenta como ejemplo el virus SARS-CoV, el causante de la infección del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS). Esta infección, con una mortalidad del 10% pudo ser detectada mediante el estudio de sueros procedentes de vendedores de animales, de verduras y personas sanas del área de Hong Kong que habían donado sangre previamente a la aparición de la infección. De esta forma se pudo deducir que el agente causal estaba relacionado con animales, en concreto con las civetas que son consideradas un manjar en algunas provincias de China. La prohibición de su consumo contribuyó a la detención de la extensión de la epidemia. El virus se transmite por vía aérea. Las estrategias para combatir las infecciones virales también se detallan en este capítulo.

Existen, además, enfermedades olvidadas entre las olvidadas. Este es el caso, sin duda, de la cisticercosis. El profesor Parkhouse, antiguo director del Centro Nacional de Biotecnología y miembro de los Laboratorios Gulbenkian, presenta un interesante trabajo sobre esta enfermedad, presente en América Latina, África y Asia que tiene una gran incidencia en poblaciones pobres y con unos sistemas de depuración de aguas deficientes. Producida por la *Taenia solium* y con una variante neurológica de especial gravedad, representa un problema en amplias poblaciones de países subdesarrollados. La mejora en los métodos diagnósticos y sobre todo el control sobre los animales (cerdos) son las herramientas

indispensables para la lucha frente a esta enfermedad que era corriente en Europa y Estados Unidos hace cien años pero que ha desaparecido prácticamente después de la mejora de la situación sanitaria (tratamiento de aguas fecales) y de la educación de la población. El desarrollo de vacunas de ADN se presenta como un reto alcanzable a medio plazo para prevenir la enfermedad.

Una parte importante de estas enfermedades están producidas por parásitos unicelulares que se han mostrado inmunes al gran desarrollo que tuvieron las vacunas frente a las enfermedades bacterianas y víricas durante la segunda mitad del siglo xx. Entre estas se hace referencia en este libro a varias infecciones producidas por tripanosomátidos. La primera de ellas, la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.

El doctor Pedro Albajar, responsable de esta enfermedad en la Organización Mundial de la Salud en Ginebra, hace una interesante reflexión sobre la misma refiriéndose a ella como una enfermedad silenciosa y silenciada aún después de que hace cien años de su descubrimiento por el doctor Carlos Chagas, responsable del control de la malaria entre los obreros que construían el ferrocarril central de Brasil. Describió su agente causal, el tripanosoma, su vector y los reservorios animales. Esta enfermedad afecta a unos diez millones de personas desde México a Argentina y está ligada a la pobreza (el vector anida en las paredes de adobe o ladrillo perforado de las casas pobres). Los movimientos de población han trasladado la enfermedad a los países desarrollados con los trabajadores emigrantes. El doctor Albajar hace propuestas *revolucionarias* que suponen aplicar el sentido común a la lucha frente a esta enfermedad que incluyen desde el control, la información y la atención médica a nivel del sistema primario de asistencia hasta el cribado sistemático de la sangre y los tejidos para transfusiones y trasplantes.

Como complemento de este trabajo, el profesor Manuel Segovia nos muestra el caso de la Región de Murcia, donde se encuentra localizado el mayor foco, junto con el de Barcelona, de la enfermedad de Chagas fuera de las zonas endémicas. Dadas las características de la enfermedad, con una fase aguda y otra crónica silente, el desarrollo de marcadores eficaces para detectar el estado de desarrollo de esta enfermedad aparece como una necesidad pe-

rentoria. Actualmente el paciente puede transmitir la enfermedad a través de transfusiones de sangre que no estén controladas y normalmente no presenta su fase aguda, que ya ha sufrido en su país de origen, sino que debuta con una afectación cardíaca o gastrointestinal grave que necesita cuidados muy importantes para mantener en una condición estable al paciente. La existencia de casos de enfermedad congénita también son objeto de estudio y control.

Dentro de los estudios que se están llevando a cabo sobre esta enfermedad, el doctor Manuel C. López, del Instituto de Parasitología López Neyra del CSIC, nos muestra la importancia de la respuesta inmune en estos pacientes y la acción de unas células muy especializadas del mismo, los linfocitos CD8+, encargados de enfrentarse al parásito, controlarlo y eliminarlo si es posible. Se trata de un ejemplo de la llamada investigación traslacional que intenta trasladar al paciente los beneficios de una investigación básica sobre el mecanismo de resistencia frente a la infección. El desarrollo de marcadores que permitan detectar la evolución de la enfermedad dentro de su estadio silente y el desarrollo de vacunas preventivas de ADN frente a la infección son aspectos que se muestran en este capítulo.

El capítulo de la doctora Alarcón, de la Universidad Central de Venezuela, muestra un aspecto muy novedoso en el estudio de la enfermedad de Chagas. Se trata de una enfermedad que se acepta que se transmite por la picadura de un insecto hematófago. Sin embargo, la doctora Alarcón describe un brote agudo de la enfermedad en Caracas en los niños y profesores de un colegio de clase media de la ciudad, en el que aparece una vía de transmisión poco conocida hasta el momento: la vía oral, a través del zumo de frutas que se tomaba en el colegio. La detección del brote, su filiación y el descubrimiento de esta vía excepcional de transmisión hacen que el capítulo muestre que las ideas que han prevalecido durante un siglo se pueden modificar por el cambio en las condiciones sociales.

En la última parte del libro se muestran los estudios más básicos que se plantean en los agentes infecciosos responsables de diversas enfermedades. En general protozoos parásitos bien clásicos como los tripanosomas ya mostrados y la *Leishmania* responsable

de una infección que causa unas cincuenta mil muertes y más de 15 millones de enfermos anuales. La esquistosomiasis se recoge también aquí.

La aparición de nuevos protozoos emergentes que actúan como agentes infecciosos en estas enfermedades también se tratan en la parte final del libro. La frontera entre los protozoos parásitos y los de vida libre es muy tenue. Dependiendo de las circunstancias, un mismo protozoo puede adoptar una u otra forma de vida produciendo infecciones importantes que son difíciles de diagnosticar. El género *Acanthamoeba* incluido dentro de estas especies de vida libre se está mostrando como el causante de infecciones que no eran consideradas como *probables*. El profesor Valladares, director del Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, hace un estudio de este tipo de infecciones causadas por amebas que son consideradas como patógenos emergentes por el Instituto de Control de Enfermedades Infecciosas de Atlanta, EE. UU. (CDC). Muestra los mecanismos utilizados por las mismas para la infección, así como los métodos moleculares de control.

Dentro de los estudios de los mecanismos básicos utilizados por los protozoos en la infección, el movimiento de fragmentos del genoma entre protozoos presenta un gran interés. La doctora Thomas, del Instituto López-Neyra de Parasitología y Biomedicina del CSIC, hace un estudio pormenorizado en el caso de *Trypanosoma cruzi* de uno estos fragmentos genómicos llamados retrotransposones. Estos elementos móviles, es decir, que pasan de un individuo a otro haciéndole adquirir o perder funciones con el fragmento de ADN ganado o perdido, pueden considerarse como simbioses aunque, en el caso no infrecuente de que lo que se adquiera o pierda sea la capacidad de infectar, se les puede llamar elementos parásitos.

Los estudios básicos se completan en este libro con un estudio llevado a cabo por el profesor E. Martínez, de la Universidad de La Laguna, sobre la DEXH Helicasa de *Leishmania*, en la que muestra el mecanismo molecular de la expresión génica en estos protozoos, muy peculiar, y su control bajo condiciones de estrés. Este tipo de estudios son de gran interés para la búsqueda de dianas para fármacos en unos organismos que escapan al control farmacológico creando resistencia al tratamiento.

En un libro dedicado a la lucha frente a las enfermedades de los pobres había que hacer una puesta al día de las nuevas herramientas que se están utilizando para el desarrollo de nuevas vacunas preventivas o fármacos efectivos para el tratamiento. Entre estas aparece el desarrollo de vacunas frente a un parásito pluricelular, *Schistosoma mansoni*, responsable de la esquistosomiasis y el uso de la genómica masiva para la detección de dianas terapéuticas y vacunas específicas en *Leishmania infantum*, un protozoo responsable de la leishmaniosis visceral que es mortal sin tratamiento.

En el primer caso, el doctor Noya, del Instituto de Medicina Tropical de Caracas, Venezuela, hace una exposición del desarrollo de una vacuna utilizando, por una parte, la búsqueda de antígenos protectores del estadio cercaria del parásito y, por otra, el desarrollo de antígenos protectores basados en secuencias de proteínas conservadas y que se mimetizan mediante la síntesis de péptidos comprobando su utilidad frente a la infección.

En el caso de las vacunas de ADN recombinante, protectoras frente a *Leishmania infantum*, los resultados del laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC han mostrado la utilidad de la genómica (*microarrays*) para la detección de genes que se activan específicamente durante las fases infectivas del protozoo. Estos genes de antígenos específicos o reacciones fisiológicas asociadas con la defensa frente a la respuesta defensiva del huésped constituyen una fuente de antígenos específicos que son la base del desarrollo de nuevas vacunas específicas eficaces frente a la infección. El uso de una tecnología que analiza casi treinta mil genes a la vez hace que se pueda avanzar muy rápidamente en el desarrollo de nuevas herramientas para combatir la enfermedad.

Así pues, este libro hace una puesta al día de los estudios que se están llevando a cabo tanto en Europa como en América del Sur sobre estas enfermedades que representan un problema grave, no solo para los países tradicionalmente afectados, algunos de ellos desarrollados como sucede en el caso de *Leishmania*, sino también para los países del mundo occidental que se ven afectados a través de sus nuevos ciudadanos que sirven de vehículo de transporte para los agentes causales de estas infecciones y que,

aunque no se transmitan en la mayoría de los casos (faltan los vectores de transmisión), sí obligan a tratarlos dentro de los sistemas nacionales de salud. El caso de España resulta paradigmático con los afectados de la enfermedad de Chagas. Con todo, no se puede ni se debe medir la incidencia de estas enfermedades solo en términos económicos; también y de una manera muy importante está la responsabilidad de las sociedades más avanzadas en luchar contra una situación que afecta a poblaciones menos afortunadas socialmente.

VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA
Director del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

1. Situación de la malaria y estado actual de las resistencias en el tratamiento de la malaria

Agustín Benito Llanes

Centro Nacional de Medicina Tropical

Instituto de Salud Carlos III

1.1. Situación actual de la malaria en el mundo

La malaria es una enfermedad perteneciente al grupo de las relacionadas con la pobreza, un concepto más amplio al de desatendidas u olvidadas, aunque esta soporta más ayuda porque está integrada dentro de los objetivos del milenio y, por tanto, cuenta con mayor financiación dentro de los Fondos Mundiales (sida, malaria y tuberculosis). La distribución de la malaria comprende las grandes áreas tropicales y subtropicales del planeta que es donde su vector, algunas hembras del género *Anopheles*, desarrollan su ciclo vital. Según el último informe de actualización de la malaria, desarrollado por la Organización Mundial de la Salud y la iniciativa *Hacer retroceder la malaria (Roll Back Malaria 2005)*, 107 países presentan áreas con riesgo de transmisión de malaria y alrededor de 3.000 millones de personas viven en zonas con riesgo de transmisión de enfermedad. Se estima que tienen lugar entre 350-500 millones de casos clínicos de malaria anualmente; la mayoría de estas infecciones están causadas por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. La malaria debida a *P. falciparum* produce más de un millón de muertes al año principalmente en niños menores de cinco años.

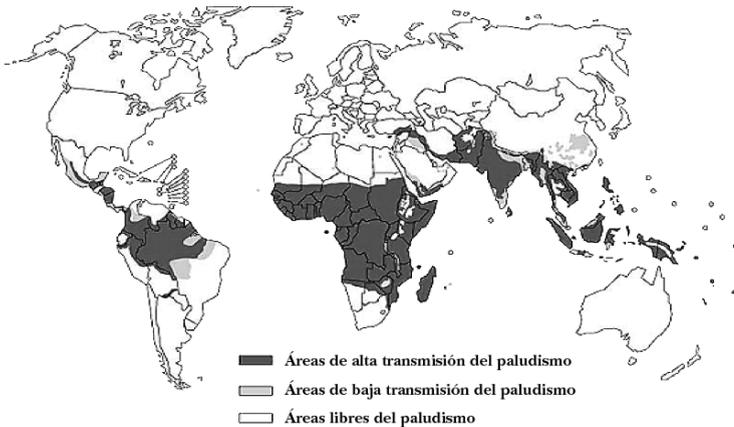
Los patrones de transmisión de la malaria varían mucho entre regiones e incluso dentro de un mismo país. Esto se debe a las variaciones entre los parásitos de la malaria y los insectos vectores, así como a condiciones ambientales y factores socioeconómicos, como la pobreza y el acceso a servicios de salud y prevención.

A nivel mundial el 60% de los casos de malaria y más del 80% de las muertes por malaria ocurren en el África subsahariana.

Plasmodium falciparum causa la mayoría de las infecciones en esta región y alrededor del 20% de las muertes de niños menores de cinco años. La malaria también es la principal causa de anemia en niños y mujeres embarazadas, del bajo peso al nacer, partos prematuros y mortalidad neonatal.

Las evidencias apoyan la idea de que los adultos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), junto con los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas, deben ser el principal objetivo para el tratamiento y la prevención de la malaria. La malaria contribuye sinérgicamente con el VIH/sida en la morbimortalidad en áreas donde las dos infecciones tienen alta prevalencia, como el África subsahariana.

MAPA 1.1: Zonas de transmisión del paludismo (riesgo elevado, limitado y zonas donde no existe transmisión), 2004



Fuente: WHO, 2010.

1.2. El parásito

Los microorganismos causantes de la malaria son protozoos parásitos pertenecientes a la familia Plasmodiidae, orden Coccidiida, suborden Haemosporidiidea. Se han descrito unas ciento veinte especies de *Plasmodium*, que parasitan a vertebrados, incluyendo mamíferos, aves y reptiles. De todos ellos, solo cuatro son las especies

causantes de la enfermedad en el humano, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, a la que hay que sumar en las últimas décadas casos de *P. knowlesi*. *Plasmodium knowlesi* es un parásito conocido en primates durante largo tiempo pero que ha causado algún caso descrito con clínica en humanos, de manera que se ha encontrado en más de 200 pacientes malayos, todos ellos mal diagnosticados como *P. malariae*, una de las cuatro especies descritas causantes de la malaria en humanos y a la que se parece morfológicamente en el diagnóstico microscópico. Es una infección que se produce en el sudeste asiático.

Los parásitos de este género se caracterizan por presentar un tipo de multiplicación asexual en las células y en los eritrocitos del hospedador vertebrado y, además, porque el invertebrado hospedador son varias especies de Diptera (Gilles y Warrell 1993).

El ciclo para todas las especies es el mismo, con una clara diferenciación de las infecciones por *P. falciparum* y *P. malariae* de las causadas por *P. vivax* y *P. ovale*.

Así pues, el ciclo biológico de todas las especies que afectan al hombre es, básicamente, el mismo: comprende una fase sexual en algunas especies de la hembra del mosquito *Anopheles* y una fase asexual en el hospedador vertebrado.

1.2.1. Ciclo del parásito en el hombre

- *Fase tisular*: los esporozoítos inoculados tras la picadura de una hembra de *Anopheles* llegan al hígado, y se alojan en los hepatocitos donde tiene lugar la esquizogonia preeritrocítica. Después de unos 6-16 días desde la infección, el esquizonte se rompe y salen a la circulación los merozoítos. Los esporozoítos de las especies *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale* pueden diferenciarse en hipnozoítos (estado durmiente) y, tras un tiempo determinado, tiene lugar la esquizogonia formando nuevos merozoítos que invaden la sangre, causando recidivas.
- *Fase eritrocítica*: los merozoítos liberados pasan al torrente circulatorio e invaden los eritrocitos, donde se transforman en trofozoítos. En su desarrollo, el parásito se alimenta de la hemoglobina del eritrocito y como producto de su digestión libera un pigmento llamado hemozoína. Cuando el trofozoíto es maduro, sufre la división asexual o esquizogonia eritrocítica formando

un esquizonte. Cuando el esquizonte alcanza la madurez en su interior, se distinguen los merozoítos diferenciados que, tras la ruptura del eritrocito, se liberarán en el torrente sanguíneo, así como todas las sustancias producidas por el parásito. Es en este momento cuando se produce la sintomatología palúdica. Estos merozoítos invadirán nuevos eritrocitos generando nuevos parásitos mediante el mismo proceso. Algunos de estos merozoítos darán lugar a las formas sexuales diferenciadas, micro y macrogametocitos.

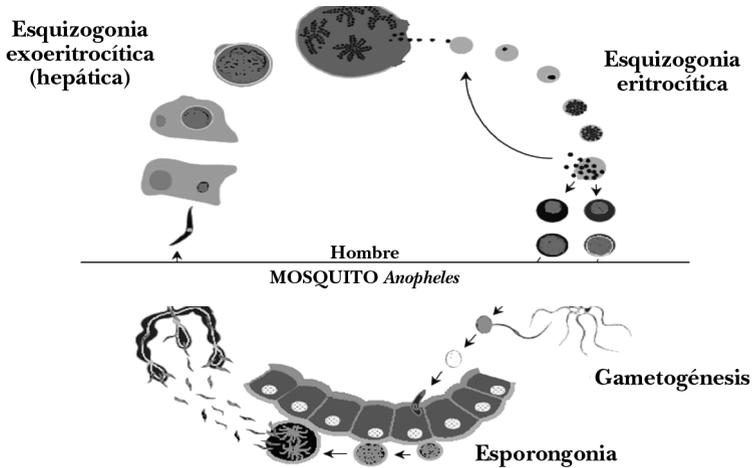
1.2.2. Ciclo del parásito en el vector

La hembra de *Anopheles* se infecta al alimentarse sobre una persona portadora de gametocitos en sangre. Los gametocitos, una vez que son ingeridos por el mosquito (el resto de estadios del parásito son eliminados y digeridos), comienzan un proceso de activación en el interior del estómago del mosquito. Al gametocito femenino activado se le conoce como macrogameto. El masculino sufre un proceso de exflagelación y se denomina microgameto. El microgameto, con movimiento propio, cuando encuentra un macrogameto, se produce la fecundación y origina un cigoto (única fase diploide del parásito). Este cigoto da lugar a un ookinete que presenta movimiento (estado invasivo). Penetra en el epitelio estomacal para, finalmente, quedar inmóvil sobre la lámina basal de este epitelio. El ookinete entonces se diferencia en un estado con forma esférica llamado ooquiste. Durante esta fase tienen lugar procesos de división, meiosis y mitosis produciendo numerosos esporozoítos haploides. Posteriormente el ooquiste se rompe liberando los esporozoítos a la hemolinfa. Presentan tropismo positivo por las glándulas salivales donde penetran, situándose finalmente en el canal salival, de tal manera que serían inyectados con la saliva en la siguiente alimentación que realice el mosquito. Parece ser que un *Anopheles* con esporozoítos en sus glándulas salivales permanece infectado toda su vida.

Los factores implicados en el éxito del paso del parásito al vector y su desarrollo en el mismo son numerosos y su interacción compleja. La temperatura, la densidad gametocitaria, el estado inmunitario de la persona portadora de gametocitos, el estado drepanocitario del portador de gametocitos, la edad y la *sex-ratio*

de los gametocitos son elementos influyentes en la infección de los mosquitos.

ESQUEMA 1.1: Ciclo biológico de la malaria



Durante los años sesenta, con el desarrollo de la cloroquina como antimalárico para tratar al humano y con el DDT como insecticida para combatir al vector, se habló de campañas de erradicación. La resistencia del parásito a la cloroquina y del vector al DDT modificó el planteamiento de las acciones de lucha, cambiando el término erradicación por el de control.

1.2.3. Medicamentos disponibles para el tratamiento de la malaria

Hay un número limitado de fármacos que pueden ser empleados para el tratamiento y la prevención de la malaria. Los más antiguos como la quinina y los compuestos relacionados con ella (cloroquina, amodiaquina, primaquina y mefloquina) siguen siendo actualmente los más utilizados. También son de uso muy frecuente las combinaciones de antifolatos, como sulfadoxina/pirimetamina o atovacuona/proguanil. Se utilizan tanto para tratamiento como para profilaxis, solos o en combinación. Probablemente la contribución más importante de los últimos 50 años en el tratamiento de la malaria ha sido el desarrollo de los derivados de la planta *Artemisa annua*, *qinghaosu* o artemisina. Se introdujeron

desde China a principios de los años setenta y hoy día es frente a los únicos que no han aparecido resistencias, aunque hay una serie de mutaciones que parecen tener relación con su resistencia; a una de ellas se la relaciona directamente con la resistencia *in vivo*. Son los más potentes y rápidos de todos los antimaláricos conocidos y hoy día son los medicamentos de elección en el tratamiento combinado de la malaria que se pretende extender por todas las zonas endémicas (WHO 2001).

- *Quinina*: derivado de la corteza del árbol de la Chinchona, fue el único medicamento usado para el tratamiento de la malaria hasta los años treinta. Actúa, como la mayoría de los antimaláricos, sobre el esquizonte eritrocítico. Sus resistencias, aunque existen en el sudeste de Asia y las islas del Pacífico oriental, son escasas.
- *Cloroquina*: sintetizada en Alemania en los años treinta, se desarrolló después de la Segunda Guerra Mundial. Actúa con gran eficacia; tiene pocos efectos secundarios y un coste muy bajo. Sin embargo por su amplia utilización es el antimalárico frente al cual el *Plasmodium falciparum* es más resistente. Se han detectado resistencias en todas las áreas endémicas, excepto Centroamérica y parte de Oriente Medio. También *P. vivax* presenta resistencia a la cloroquina.
- *Combinación de antifolatos*: existen varias combinaciones de inhibidores del enzima dihidrofolato reductasa (proguanil, clorproguanil, pirimetamina y termetropina) y sulfas (sulfamidas y sulfonas). Aunque estos fármacos tienen actividad antipalúdica cuando se usan solas, la resistencia parasitológica suele desarrollarse rápidamente. Cuando se usan en combinación, tienen un efecto sinérgico en el parásito y pueden ser efectivas incluso en presencia de parásitos resistentes a uno de los componentes. La combinación más frecuente es sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®, Roche), sulfametopirazina/pirimetamina (Metakelfin®) y trimetroprim/sulfametoxazol (Cotrimoxazol®). Se han probado nuevas combinaciones en África, como clorproguanil/dapsona, también conocida como LapDap® (Glaxo Smith-Kline) que tiene un efecto sinérgico mucho más po-

tente, y también atovaquona/proguanil (Malarone®, Glaxo Smithkline), usado sobre todo como profilaxis.

- Otros fármacos utilizados como antimaláricos para tratamiento y profilaxis son antibióticos como la *tetraciclina* y la *doxiciclina*.

El estudio de nuevos antimaláricos no es todo lo rápido y exitoso que sería de desear. Sin embargo existen medicamentos de probada eficacia. Un ejemplo de ello es la Tafenoquina® (Glaxo SmithKline), una 8 aminoquinolona segura y bien tolerada, con una excelente actividad causal, eficaz en prevenir la infección hepática de *P. falciparum* multirresistente y de *P. vivax*.

1.3. Resistencia a los antimaláricos

La resistencia a los antimaláricos ha sido definida como «la capacidad de un parásito para sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de un fármaco dado a una dosis igual o mayor que la usualmente recomendada pero con tolerancia del individuo». Esta definición fue más tarde modificada para especificar que el medicamento en cuestión debe «conseguir acceso al parásito o al eritrocito infectado durante el tiempo necesario para su acción normal» (Bruce-Chwatt 1986).

El amplio e indiscriminado uso de los antimaláricos produce una fuerte presión selectiva sobre el parásito para que desarrolle altos niveles de resistencia. Esta ha sido descrita para tres de las cuatro especies de parásitos de la malaria: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium malariae*. El primero ha desarrollado resistencia a casi todos los antimaláricos utilizados, aunque la distribución geográfica de la resistencia varía mucho (mapa 1.2). La infección por *Plasmodium vivax* es resistente a cloroquina y/o a primaquina en algunas áreas, como el sudeste de Asia y algunas islas del Pacífico. La resistencia del *P. malariae* es todavía anecdótica, teniéndose noticia de ella en Indonesia. Como mencionamos anteriormente, la resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina ha sido descrita en todas las zonas en las que existe transmisión de esta especie excepto en zonas palúdicas de Centroamérica y de Oriente

Medio. La resistencia a la combinación sulfadoxina/pirimetamina ocurre de manera frecuente en el sudeste asiático y en Sudamérica. Esta resistencia comienza a ser prevalente en zonas de África, donde en muchos países es el medicamento de segunda intención y en otros de primera, debido a las altas tasas de resistencia a la cloroquina. La resistencia a mefloquina es frecuente en algunas áreas del sudeste asiático desde mediados de los años noventa, superando en algunos casos el 50%. Ha sido también descrita en la región amazónica y, de manera esporádica, en África.

Se debe realizar una diferenciación entre fallo del tratamiento por resistencia o por otras causas, como el uso de dosis incorrectas, o la baja absorción del medicamento.

MAPA 1.2: Zonas en las que existe resistencia del *P. falciparum* a cloroquina, a sulfadoxina/pirimetamina y multirresistencia



La resistencia parece ser debida a la ocurrencia de mutaciones espontáneas que reducen la sensibilidad a un determinado fármaco o clase de fármacos. Para algunos antimaláricos la presencia de un único punto de mutación es suficiente para poder producir resistencia, mientras que, para otros, es necesario que existan puntos múltiples. Se ha comprobado que la infección por los parásitos está constituida por poblaciones heterogéneas que pueden tener distintas respuestas a los medicamentos. Es decir, en un mismo individuo pueden convivir poblaciones sensibles con otras resistentes, tratándose de una misma infección. En la actua-

lidad, técnicas como la RT-PCR permiten conocer que en algunos casos la resistencia se debe también a la presencia de más copias de los genes que codifican proteínas cuyas mutaciones tienen relación con la resistencia a algún antimalárico, como, por ejemplo, el gen *pfmdr1* gen de multiresistencia.

Después del tratamiento existe un residuo de parásitos que sobreviven al medicamento (Wernsdorfer y Payne 1991). Bajo circunstancias normales, estos parásitos pueden ser eliminados por el sistema inmune (no específicamente en el caso de pacientes no inmunes). Los factores que disminuyen la efectividad del sistema inmune en la eliminación de parásitos parecen incrementar la supervivencia de estos y facilitar el desarrollo de la resistencia. Este mecanismo ha sido sugerido como un factor que ha contribuido a la resistencia en el sudeste asiático, donde los parásitos están repetidamente circulando a través de individuos no inmunes. La respuesta no específica de individuos no inmunes es menos efectiva en eliminar el residuo de parásitos que la respuesta inmune específica en los individuos semiinmunes. El mismo mecanismo debe también explicar la pobre respuesta al tratamiento en niños y mujeres embarazadas.

El uso de la combinación sulfadoxina/pirimetamina para el tratamiento de la malaria puede incrementar la resistencia parasitológica hacia otras combinaciones de antifolatos. El desarrollo de resistencias a la sulfadoxina/pirimetamina a través de la acumulación de mutaciones en el gen *dhfr* debe comprometer la vida útil de la nueva combinación de antifolatos, clorproguanil y la dapsona (LapDap®), incluso antes de que se empezara a usar. La combinación sulfadoxina/pirimetamina es de primera intención en algunos países.

Plasmodium falciparum presenta lo que se denomina «plasticidad genética» que permite al parásito una rápida adaptación a un nuevo fármaco, incluso cuando este no está químicamente relacionada con los medicamentos previamente utilizados. El mecanismo de esta plasticidad hasta ahora es desconocido, pero esta capacidad puede ayudar a explicar cómo determinados aislados y/o cepas se adaptan rápidamente a los nuevos fármacos. La elección de medicamentos con una vida media larga (sulfadoxina/pirimetamina, mefloquina) en preferencia a las de vida media

más corta tiene el beneficio de ser administrados en monodosis. Sin embargo el tener períodos de eliminación más largos beneficia la aparición de las resistencias.

1.3.1. Métodos para la detección de las resistencias

En general se emplean cuatro métodos básicos para el estudio de las resistencias: pruebas *in vivo*, *in vitro*, estudios en modelos animales y caracterización mediante marcadores moleculares.

- A) *Pruebas in vivo*: consisten en el tratamiento de un grupo de individuos con malaria clínica y parasitemia, con una dosis conocida de un determinado fármaco y el consiguiente seguimiento clínico y parasitológico. Una de las características clave de estas pruebas es la interrelación entre el hospedador y el parásito. La disminución de la eficacia terapéutica de un medicamento puede ser enmascarada por la eliminación de parásitos mediante el sistema inmune en pacientes con un alto grado de inmunidad adquirida. El inconveniente es que en la mayor parte de los casos no se mide la absorción del medicamento, ni los metabolitos en sangre; por tanto, la resistencia real no puede ser conocida. Además en los estudios de 28 días o más en zonas de alta endemicidad también puede haber confusión con las nuevas infecciones.
- B) *Pruebas in vitro*: con estas se evitan los numerosos factores que influyen en las pruebas *in vivo*, como el sistema inmune del hospedador. Se toman muestras de sangre periférica parasitada y se añade en placas de microensayo exponiendo a los parásitos a distintas concentraciones de antimaláricos, comprobando finalmente si se produce la inhibición de la maduración de los esquizontes. Los resultados no necesariamente se corresponden a los tests *in vivo* ya que la respuesta inmune juega un papel muy importante. También influye la farmacocinética del medicamento (absorción, eliminación, etc.).
- C) *Estudios en modelos animales*: son pruebas *in vivo* pero desarrolladas en modelos no humanos; por tanto, estarán influenciadas por los numerosos factores que influyen en la prueba

in vivo normal, salvo el efecto del factor inmune del hospedador, que está minimizado por el uso de animales de laboratorio. Una desventaja es que solo se emplean parásitos que crezcan o se adapten roedores y/o primates no humanos. En la actualidad hay un modelo en ratones inmuno-deficientes (SCID/NOD) que permiten la infección por *Plasmodium falciparum*.

- D) *Técnicas moleculares*: los estudios con marcadores moleculares utilizan la PCR para indicar la presencia de mutaciones que determinen la resistencia biológica a los antimaláricos. Teóricamente, la frecuencia de la aparición de mutaciones específicas en determinados genes dentro de una muestra de pacientes de un área dada podría proporcionar una indicación de la frecuencia de la resistencia a las drogas en un área, de manera análoga a la información que se obtiene de las pruebas *in vitro*. Entre las ventajas de estos métodos se incluye la necesidad del uso de pequeñas cantidades de material genético y la posibilidad de realizar multitud de pruebas en un corto período de tiempo. Entre las desventajas están la necesidad de un equipamiento sofisticado y un entrenamiento para poder usarlas, así como el hecho de que las mutaciones que confieren resistencia son conocidas para un número limitado de medicamentos, primeramente para inhibidores de DHFR, como la pirimetamina, y de DHPS como la sulfadoxina (Su y Wellems 1996). Los marcadores moleculares que son objetivo de estudio y donde se cree reside la presencia de la resistencia a cloroquina son el *cg2*, *pf_{dmr} 1* y *pf_{crt}* y, finalmente, el *pfgr* (Duraisingh et ál. 1997). Las resistencias a la atovaquona parece ser que residen en mutaciones en el complejo del citocromo *bc1* sobre el que actúa (Ittarat et ál. 1994).

La confirmación de la asociación entre una serie de mutaciones dadas y la actual resistencia a los fármacos es difícil, especialmente cuando la resistencia incluye más de un *locus* y múltiples mutaciones. Las resistencias que han sido más estudiadas son las que están debidas a mutaciones en los genes Dihidrofolato Reductasa (DHFR) y Dihidropterato Sintasa (DHPS).

1.3.2. Factores determinantes en la aparición de resistencias

Los factores relacionados con la aparición de resistencias forman como un puzzle en el que todas las piezas están relacionadas. En primer lugar están el número total de parásitos expuestos a la droga y la concentración de la droga a la que se expone el parásito (tolerancia o resistencia). También juega una parte muy importante la farmacocinética de la droga en cuanto a las variaciones de la absorción (alimentos), su vida media y la potencia (PRR < 48 h). Finalmente se detallan como factores determinantes el grado de transmisibilidad, la inmunidad del hospedador y el grado de sensibilidad/resistencia por mutaciones naturales.

1.3.3. Selección de resistencias

Las mutaciones genómicas que ocurren de manera natural sirven de base para que, ante una presión farmacológica determinada, se seleccionen parásitos capaces de sobrevivir, originándose de esta forma cepas resistentes. De esta forma, podemos decir que fármacos de vida larga dejan concentraciones residuales subterapéuticas; también los tratamientos incompletos y, por último, las formulaciones de baja biodisponibilidad intervienen de manera importante en la selección de resistencias.

Si cesa la presión farmacológica, la resistencia puede revertir. Este hecho se ha podido demostrar en el sudeste asiático con el cambio de la cloroquina por la mefloquina como tratamiento de primera intención. La utilización de la mefloquina y la aparición de resistencias a este fármaco ha hecho que se utilice de nuevo la cloroquina en áreas multirresistentes a la mefloquina.

Por otro lado existe una mayor probabilidad de que se den mutaciones en los más parasitados; así, se estima que el porcentaje de que se dé una mutación en un solo individuo con parasitemias por encima del 10% es mayor que la que se puede dar en un millón de individuos asintomáticos con parasitemias submicroscópicas.

La diseminación de las resistencias depende del nivel de endemicidad/transmisibilidad. En áreas de alta endemicidad (hiper u holoendémicas) existe una gran mezcla de gametocitos, diluyendo las mutaciones; los adultos son inmunes o semiinmunes con anticuerpos antigametocitos.

En áreas de baja endemicidad o malaria inestable las epidemias afectan a toda la población (no inmunidad); existe una elevada carga parasitaria, poca diversidad parasitaria. En este último caso la resistencia se desarrolla en un tiempo más breve.

1.3.4 Base farmacológica de la terapia antimalárica

El conocimiento de los mecanismos de acción es importante para prevenir la resistencia cruzada. Así, las propiedades farmacocinéticas nos permiten determinar el intervalo de la dosis y la duración según los grupos o los pacientes de alto riesgo.

Algunos mecanismos de acción se conocen:

- Digestión de la hemoglobina en la vacuola digestiva (4-aminoquinoleínas). Los nuevos compuestos antagónicos han sido descritos en los procesos vacuolares (plasmepsin aspartico, proteasa y falcipain cistein proteasa como dianas).
- Antifolatos (sulfadoxina/pirimetamina y LapdapR). Inhibidores específicos de las enzimas de la ruta del ácido fólico. Es también posible buscar y diseñar antagonistas.
- Agentes alquilantes. La artemisina genera radicales libres que rápidamente alquilan membranas del parásito (particularmente en la vacuola). Este proceso es catalizado probablemente por la hemozoína y se complica por la aparición de resistencias.
- Función mitocondrial. La atovacuona inhibe la citocromo reductasa que es la base sinérgica del proguanil. Las resistencias se desarrollan rápidamente.
- Apicoplasto. Los antibióticos, principalmente las tetraciclinas, interfieren en la traducción en proteínas.

El lugar de actuación de los principales antimaláricos es conocido. La cloroquina, amodiaquina, quinina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina y artemisininas actúan en el esquizonte hemático en la digestión de la hemoglobina.

La sulfadoxina, sulfametoxazol, dapsona, pirimetamina, trimetoprin, proguanil y clorproguanil intervienen en la inhibición del ácido fólico. La atovacuona, el proguanil, las tetraciclinas, la doxiciclina, la azitromicina y la clindamicina actúan a nivel mitocondrial.

También son antimitocondriales la primaquina y la etaquina (tafenoquina) e interfieren en el proceso general de óxido-reducción y dañan colateralmente la mitocondria.

1.3.5. Epidemiología molecular en el estudio de las resistencias y su distribución

Consiste en el uso de marcadores moleculares de diversidad, de patogeneidad y/o virulencia y de resistencia en el estudio de las poblaciones de *Plasmodium falciparum*.

El genoma de *Plasmodium falciparum* es pequeño ($2,5 \times 10^7$ pb) y no permite el análisis citológico clásico por microscopía. El genoma se caracteriza por presentar una proporción elevada de adenina (A) y timina (T) que viene a ser el 80% del total. Mediante técnicas como electroforesis en campo pulsado, mediante clonación de grandes fragmentos de ADN dentro de cromosomas artificiales de levaduras y mediante observación de los cinetocoros por microscopía electrónica se ha comprobado que el genoma de *Plasmodium falciparum* posee 14 cromosomas, cuyos tamaños varían entre 0,65 y 3,4 Mb. Con la secuenciación completa del genoma se abre un campo para el desarrollo de herramientas para controlar la enfermedad (Gardner et ál. 2002).

La diferencia encontrada en el tamaño de los cromosomas implica la rotura de regiones subteloméricas, frecuencia de la recombinación cromosómica, duplicaciones y deleciones del genoma. La diversidad genética es uno de los procesos relacionados con la reproducción sexual, fase obligatoria en el ciclo vital del parásito. La fertilización cruzada de los gametos en el mosquito vector contribuye a la generación de fenotipos distintos, ya que las infecciones naturales contienen mezclas de diferentes genotipos parasitarios (Rosario 1981).

El conocimiento de la diversidad genética mediante estudios con marcadores moleculares, tanto de polimorfismo como de resistencia, es importante para conocer la diversidad y la implicación de las poblaciones en la transmisión y en la patología y para establecer medidas de control adecuadas. Existen numerosos estudios que muestran la amplia diversidad de *P. falciparum*, principalmente relacionados con la diversidad de los genes que codifican las proteínas de superficie del merozoíto

1 y 2 (msp-1 bloque 2 y msp-2). Estos han mostrado un grado de complejidad elevado indicando que pueden concurrir poblaciones genéticamente diferentes dentro de una misma infección e individuo.

Teóricamente, la frecuencia de mutaciones específicas dentro de una muestra de parásitos en un área determinada nos da una indicación de la frecuencia de resistencias a los antimaláricos de manera análoga a la derivada de los métodos *in vitro*.

Entre las ventajas están el poder trabajar con una cantidad de muestra pequeña, la independencia de los factores inmunes del hospedador y la posibilidad de hacer numerosas pruebas y en poco tiempo. Como inconvenientes están la utilización de un equipo sofisticado para hacer los estudios en el terreno y la limitación de fármacos o drogas estudiadas (inhibidores de dihidrofolato reductasa gen-DHFR y dihidrofolato sintetasa gen-DHPS, cloroquina-CQ [genes *Pfmdr1* y *Pfcr1*] y cloroquina-amodiaquina. CQ-AMD [gen *Pfgr*].

1.3.6 Naturaleza multigénica de la resistencia a la cloroquina (CQ)

Un ejemplo claro en el que se ha comprobado la naturaleza multigénica de la resistencia a algunos antimaláricos es el caso de la cloroquina.

El gen *Pfmdr1* se encuentra en el cromosoma 5; es una P-glicoproteína homóloga a la humana, localizada en la membrana de la vacuola digestiva con función todavía no del todo conocida. Es un gen plimórfico en las posiciones 754, 1049, 3597, 3622 y 4234.

Existen dos alelos implicados en la resistencia a las cuatro aminoquinoleínas (CQ). El primero es de tipo K1 Asn86Tyr y el segundo es de tipo 7G8 Ser1034Cys/Asn1042Asp/Asp1246Tyr.

Mediante RFLP se ha encontrado un segmento de 36 KD en el cromosoma 7 asociado a la resistencia a la CQ. Posteriormente se ha aislado un nuevo gen en esta región del cromosoma 7, el gen *Pfcr1*. Este gen codifica para una proteína transmembrana de 424 aa y 48,6 KD localizada en la vacuola digestiva. Se ha observado que modificaciones de aa en los dominios de esta proteína están relacionadas con la resistencia a la CQ. La mutación Lys76Thr está 100% ligada con la resistencia a la CQ.

Finalmente, gracias a algunos estudios de cruzamiento entre clones Dd2 y 3D7, se ha comprobado en la progenie el ligamiento a un *locus* localizado en el cromosoma 5 y otro gen en el cromosoma 13.

1.3.7. Combinación de fármacos en la era de la multirresistencia

Como en la mayoría de las enfermedades infecciosas ocurre, la combinación de fármacos se ha puesto de relevancia en el tratamiento de las grandes endemias. En el caso de la malaria el tratamiento combinatorio es siempre entre una artemisina o derivado y otro antimalárico sinérgico o de vida larga. Esta combinación se denomina ACT (Artemisine Combined Treatment).

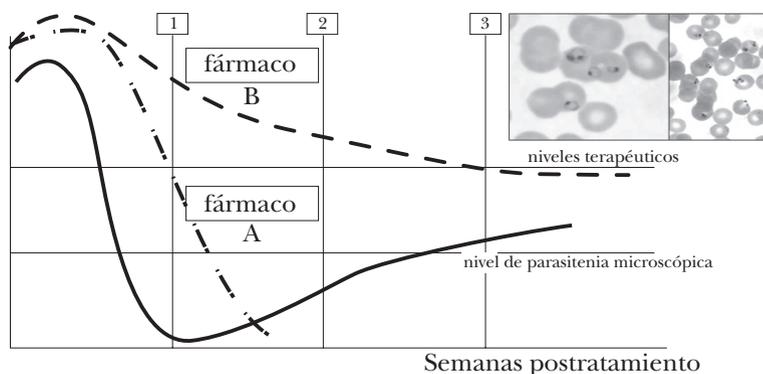
La OMS recomienda la terapia combinada, ampliamente demostrada en el sudeste asiático, de gran duda para su aplicación en África, principalmente por problemas de coste, gestión y distribución. La combinación que se ha elegido como estandarte es el CoartemR (Lumefantrina + artemisina), con lo que ha llegado a reducirse el precio a 2,40 dólares, de manera poco sostenible si no es gracias a la ayuda del Fondo Global de Lucha Contra la Malaria.

Existen otras combinaciones, pero en todas ellas interviene: *a)* un antimalárico potente y rápido (artemisininas) más otro de vida media larga (mefloquina, lumefantrina, pirimetamina/sulfadoxina o amodiaquina); *b)* dos antimaláricos con efecto sinérgico (atovacuona más proguanil).

Si establecemos la potencia de un antimalárico en la capacidad en disminuir la biomasa parasitaria, las artemisininas tienen una potencia muy alta (104-105); la cloroquina y la halofantrina tienen una potencia antiparasitaria alta (102-104); la lumefantrina, la mefloquina, la combinación sulfadoxina/pirimetamina y la quinina tienen una potencia media (10-103). Finalmente, los antibióticos tienen una potencia baja (101).

FIGURA 1.1: Estrategia de combinación de fármacos según la vida media de presentación en el organismo

Combinación de fármacos:
vida media corta + vida media larga



Las combinaciones para el tratamiento con antimaláricos están basadas en aquellas que son utilizadas por su efecto sinérgico, y entre estas están los inhibidores de la síntesis del ácido fólico:

- pirimetamina + sulfadoxina (Fansidar®)
- pirimetamina + sulfadoxina + cloroquina
- pirimetamina + sulfadoxina + amodiaquina
- pirimetamina + sulfadoxina + mefloquina (FansiMef®)
- proguanil + cloroquina (Savarine®)
- proguanil + sulfametoxazol
- proguanil + atovuona (Malarone®)
- clorproguanil + dapsona (LapDap®)

Y por otro lado están las combinaciones con artemisininas en tratamiento combinado (ACT):

- artesunato + cloroquina
- artesunato + amodiaquina
- artesunato + pirimetamina-sulfadoxina
- artesunato + pironaridina
- artesunato + clorproguanil-dapsona (LapDap-plus®)
- artesunato o dihidroartemisina + mefloquina (Artequin®)
- artesunato + atovuona-proguanil
- dihidroartemisina + piperaquina

- dihidroartemisinina + azitromicina
- artemeter + lumefantrina (Riamet®, Coartem®)

Las artemisininas son antimaláricos ya utilizados hace millones de años en China procedentes de la planta *Artemisia annua* L. Es un antimalárico de acción muy rápida, pero de vida corta, lo que hace que pueda originar recrudescencias al ser usado como monoterapia. Si es utilizado en monoterapia, al menos debería ser utilizado cinco días, preferiblemente siete, y prolongarlo hasta 10 en parasitemias elevadas. En combinación con mefloquina, lumefantrina o amodiaquina, la duración se acorta a tres días, aumentando pues la adherencia al tratamiento y disminuyendo las recrudescencias (hay que tener en cuenta que el tratamiento será más exitoso cuanto menos días se administre). La combinación con quinina (terapia en casos graves) no parece aportar ningún beneficio y con los antifolatos puede ser antagónica.

En definitiva, podemos decir que con la estrategia de utilizar combinaciones de antimaláricos, ya sea ACT o inhibidores de la síntesis del ácido fólico, estamos en un momento interesante para poder llegar a controlar esta gran epidemia, eso sí, siempre con ayuda externa y con mejoras en la distribución de estos combinados.

Mientras tanto, hay que seguir haciendo esfuerzos en la estrategia para luchar contra la enfermedad, que no es otra que la de *a) diagnóstico rápido y correcto, b) tratamiento rápido y adecuado (manejo de casos), c) otras medidas adicionales (medidas protectoras y de prevención, utilización de mosquiteras impregnadas en insecticida, control vectorial [rociamiento intramural en viviendas], tratamiento intermitente en embarazadas y en niños menores de un año.*

1.3.8. Estrategia para el desarrollo de vacunas y nuevas tendencias

Finalmente, se debe señalar que hay varias vacunas que están siendo ensayadas en la actualidad usando potentes adyuvantes. La magnitud del problema exige que exista una necesidad de obtener vacunas que ayuden y controlen la malaria en las zonas afectadas.

¿Por qué es necesario investigar en vacunas?:

- Resistencia de los parásitos a los antimaláricos
- Arsenal de antimaláricos limitado
- Resistencia de los mosquitos vectores a los insecticidas
- Conocimiento del genoma de *P. falciparum* y del genoma de *Anopheles gambiae* ss.

Entre las dificultades que nos vamos a encontrar a la hora de diseñar una vacuna están: tener un ciclo vital complejo, con dos hospedadores y diferentes estadios; la enorme variabilidad antigénica que tiene el parásito; su facilidad para evadir la respuesta inmune del hospedador, y una protección poco duradera.

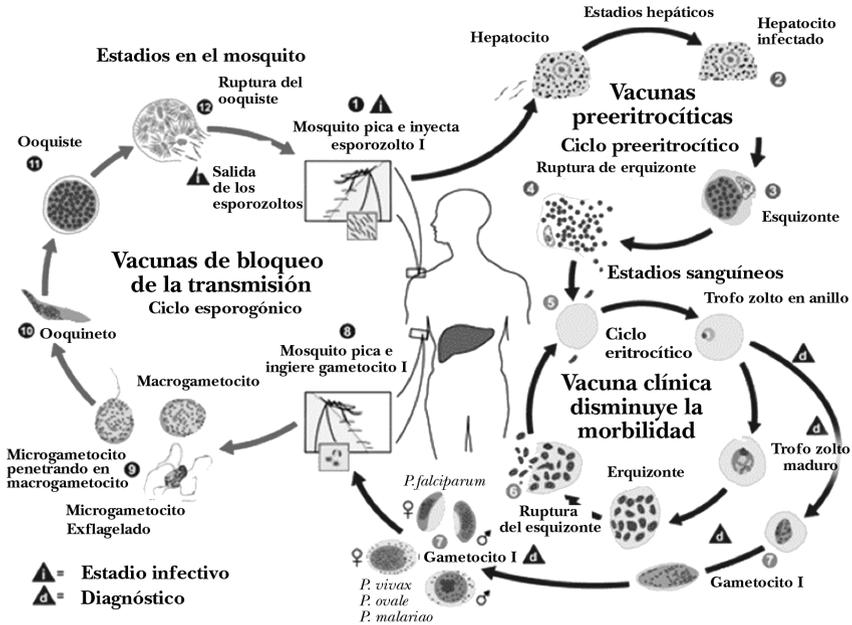
Varias décadas de investigación parecen indicar que los resultados han sido negativos, pero existen ciertas evidencias que indican que una vacuna frente a la malaria es posible:

- La inmunización con esporozoítos irradiados ha demostrado protección parcial o completa en modelos experimentales en roedores, en humanos y en otros primates.
- La infección repetida en un individuo con malaria genera una «respuesta naturalmente adquirida» que, aunque de vida corta y aislado específica, reduce la mortalidad y la incidencia de complicaciones de la malaria, así como que resulta en una supresión de la parasitemia hasta niveles indetectables por los métodos de diagnóstico tradicionales.
- La transferencia pasiva de inmunoglobulinas purificadas de «individuos semiinmunes» se ha comprobado que protege. Es el caso de transferencia de suero «inmune» de niños africanos a niños tailandeses.
- Algunos ensayos en modelos animales que han sido completados y algunos estudios clínicos que actualmente están en progreso han mostrado protección en ensayos de campo.

La malaria es la primera enfermedad donde se realiza un planteamiento diferente de diseño de vacunas en función de la diana donde van a ir dirigidas y la respuesta que esta vacuna va

a causar en el entorno del ciclo biológico. Debido a su complejo ciclo biológico, con estadios diferentes que expresan a su vez antígenos diferentes, y debido además al alto grado de variabilidad de poblaciones diferentes originadas en el mosquito por recombinación genética, además de una vacuna de modelo tradicional (aquella que intenta impedir la infestación por el parásito y, en definitiva, impedir que posteriormente se desarrolle la enfermedad-vacuna preeritrocítica), se incorporan dos nuevas estrategias en el desarrollo de vacunas. La primera está basada en la estrategia dirigida hacia los antígenos que expresan los estadios asexuales sanguíneos (trofozoíto y merozoíto). Este tipo de vacuna no impediría la infestación por parásitos (esporozoítos), su penetración y multiplicación en las células hepáticas y el paso al torrente circulatorio de los merozoítos formados en el esquizonte hepático (véase ciclo), pero sí impediría el desarrollo del ciclo eritrocítico o hemático, al ser donde se desarrolla la fase clínica (sintomatología). Este tipo de vacuna se denomina *vacuna contra la enfermedad* ya que impediría el desarrollo de clínica o bien retrasaría el número de episodios maláricos que pudiera tener una persona. El último tipo de modalidad sería aquella basada en antígenos parasitarios de las formas sexuales del parásito (gametocitos, cigoto, oocineto y oocisto), algunos de ellos desarrollados en el interior del mosquito. Estas vacunas no impedirían la infestación o el desarrollo de la clínica malárica, pero podrían ser útiles en áreas de transmisión para bloquear esta, lo que impediría el desarrollo del cigoto y, por tanto, del parásito en el mosquito. Se denominan *vacunas de bloqueo de la transmisión*.

ESQUEMA 1.2: Ciclo de vida del parásito y las fases (preeritrocítica, eritrocítica y en el mosquito) en las que se basa la estrategia de desarrollo de vacunas de malaria



Existen varias presentaciones y propuestas de vacunas. La vacuna generada mediante péptidos sintéticos Spf66 creó una gran expectativa como buen candidato a vacuna (Patarroyo et ál. 1992), si bien los ensayos en fase III demostraron finalmente su ineficacia en zonas de elevada transmisión, concretamente en África y Tailandia. Otros desarrollos vacunales tienen resultados esperanzadores como es el caso de la RTS,S/AS02A (Alonso et ál. 2004) aunque por sí solas no contribuirán a eliminar la enfermedad.

La realidad es que, incluso habiendo tenido ciertos resultados esperanzadores, se ha comprobado que estas deberán actuar como una herramienta más para controlar la enfermedad y no podrán sustituir de manera definitiva a la política de prevención, diagnóstico rápido y tratamiento eficaz junto al uso de medidas para reducir el contacto entre el hombre y el anofelino.

Podemos resumir en este último apartado que a) existe un gran conocimiento sobre los antígenos inmunogénicos que producen

inmunidad protectora; *b*) que es necesario generar una respuesta inmune más duradera en el tiempo, y para ello se están probando inmunomoduladores y adyuvantes más potentes; *c*) que los avances en genómica y proteómica permitirán identificar un número mayor de candidatos a vacunas; *d*) que es necesaria una mayor implicación multiinstitucional permitiendo la unión de organismos internacionales, instituciones públicas, multinacionales farmacéuticas e instituciones sin ánimo de lucro en pos del desarrollo de una vacuna. Estas iniciativas están haciendo que vuelva a renacer la esperanza y en los próximos 10-15 años pueda existir una vacuna que demuestre suficiente eficacia como para controlar esta grave infección junto a los métodos tradicionales de control.

Bibliografía

- ALONSO, P. L. et ál. «Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial». *Lancet*, 364 (2004): 1411-1420.
- BRUCE-CHWATT, L. J. «Malaria vaccine trials: a guided step into the unknown». *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 66 (1986): 5-13.
- DURASINGH, M. T., C. J. DRAKELEY, O. MULLER, R. BAILEY, G. SNOUNOU, G. A. TARGETT, B. M. GREENWOOD, y D. C. WARHURST. «Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *pfmdr 1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine». *Parasitology* 114 (Pt 3) (1997): 205-211.
- GARDNER, M. J. et ál. «Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*». *Nature*, 3, 419 (6906) (2002): 498-511.
- ITTARAT, I., W. ASAWAMAHASAKDA, y S. R. MESHNICK. «The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase». *Exp. Parasitol.* 79 (1994): 50-56.
- PATARROYO, G., L. FRANCO, R. AMADOR, L. A. MURILLO, C. L. ROCHA, M. ROJAS, y M. E. PATARROYO. «Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1-14 years». *Vaccine* 10 (1992): 175-178.
- ROSARIO, V. «Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites». *Science* 212 (1981): 1037-1038.
- SU, X., y T. E. WELLEMS. «Toward a high resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats». *Genomics*, 33 (1996): 430-444.
- WERNSDORFER, W. H., y D. PAYNE. «The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*». *Pharmacol. Ther.* 50 (1991): 95-121.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Combinación terapéutica de medicamentos antimaláricos*. (2001).

2. Emergencia de virus. Evolución y protección frente al coronavirus de la neumonía atípica SARS-CoV

*Luis Enjuanes Sánchez, Marta López de Diego, José Luis Nieto-Torres,
José Manuel Jiménez-Guardeño y José Ángel Regla-Nava*
Centro Nacional de Biotecnología (CNB), CSIC (España)
Campus Universidad Autónoma de Madrid

2.1. Los virus

La identificación de síntomas clínicos reproducibles permitió mostrar que algunas enfermedades eran transmisibles de plantas a plantas, entre animales, de animales a humanos y de personas a personas, produciendo una sucesión de enfermedades con características similares. A finales del siglo XIX se observó que la enfermedad del mosaico del tabaco se debía a un agente de naturaleza infecciosa que era filtrable y se podía diluir, y que se reproducía. Se trataba de las primeras observaciones que llevaron al descubrimiento de los virus. Poco después (1898) se describió el primer agente infeccioso filtrable que producía una enfermedad en animales, la glosopeda, y el primer virus humano, productor de la fiebre amarilla (1901) (Oldstone 1998). El término *virus*, que en latín significa veneno, inicialmente se aplicaba a cualquier agente infeccioso. Los virus son una parte integral del ecosistema (Enjuanes 2009; Enjuanes et ál. 2009). Existen donde se encuentra vida y son las formas vivas predominantes en el planeta. De hecho, su biomasa es tan abundante como la de los procariontes. Los virus están en grandes cantidades en las aguas marinas excediendo un millón de partículas por mililitro. En total hay alrededor de 10^{30} virus en el mar.

2.2. Virus emergentes

Las infecciones emergentes son aquellas que aparecen por primera vez en una población o que, existiendo previamente, aumentan de forma rápida su incidencia o distribución geográfica. Los

virus frecuentemente se transmiten de los animales al hombre, produciéndose lo que se conoce como zoonosis, que pueden ser graves cuando, además, dan lugar a estirpes virales que se transmiten entre los hombres. Ello se debe a la característica de los virus de mutar, adaptándose a un nuevo hospedador. De hecho, cada uno de los posibles 10.000 o más virus que se derivan de una sola partícula viral infectiva es distinto entre sí, seleccionándose para la propagación aquellos virus que tienen una ventaja selectiva en el nuevo nicho ecológico. Además de esta capacidad de los virus para evolucionar y adaptarse a un nuevo hospedador, otros factores favorecen la emergencia de infecciones. Entre ellos se encuentran los cambios ambientales y ecológicos, los movimientos migratorios humanos y su cambio de comportamiento, las deficiencias sanitarias en los países en desarrollo y el incumplimiento de programas de vacunación como el del sarampión. Lamentablemente, los países pobres son los que están menos preparados para controlar las epidemias emergentes.

Las enfermedades infecciosas continúan siendo la causa principal de muerte en el mundo. La aparición de epidemias ha sido constante a lo largo de la historia y probablemente continuará en el futuro. En el siglo XIV apareció la peste, que mató a uno de cada cuatro europeos. En el siglo XVI la viruela propició la caída del Imperio azteca frente a los españoles. A principios del siglo XIX apareció el cólera produciendo al menos siete epidemias. A finales del siglo XIX la tuberculosis irrumpió en los círculos sociales de París y Londres. A principios del siglo XX se extendió una epidemia de gripe por todo el globo causando la muerte de unos cuarenta millones de personas. En 1930 se describió la escrapie, una nueva enfermedad de las ovejas que era producida por un agente filtrable como un virus o más pequeño. En los años cincuenta apareció una terrible epidemia, la del virus VIH que produce el sida, y continúa afectando dramáticamente en la actualidad. En 1960 se describió en humanos una enfermedad similar a la escrapie, el kuru, que producía temblores, pérdida de equilibrio y del habla y finalmente la muerte. Esta enfermedad era análoga al síndrome de Creutzfeldt-Jakob debido a una anomalía genética. Lo interesante de esta enfermedad es que era producida por un tipo de agente infeccioso desconocido hasta el momento, los priones.

Durante la guerra de Corea (1951-1953) se produjo un brote de fiebre hemorrágica en unos dos mil militares de Naciones Unidas. Su naturaleza transmisible se documentó después de comprobar que la enfermedad se podía diseminar por el suero y orina de los ratones infectados. La evidencia epidemiológica sugirió que los ratones salvajes eran portadores de un virus productor de la enfermedad. En el año 1976 se identificó este virus en ratones. Se trataba de un hantavirus que recibió su nombre del río Hantaan de Corea, donde se identificó por primera vez. Hasta el momento se ha detectado en Japón, Rusia, Suecia, Estados Unidos, Sudamérica, Finlandia y Francia; por tanto, en algunos países próximos a España. El virus suele matar a la mitad de las personas que infecta.

El virus de la encefalitis del Nilo Occidental reemergió en Nueva York en 1999, donde no se había detectado anteriormente, diseminándose por Estados Unidos y Canadá, el Caribe y México. El virus se transmite por mosquitos y afecta a muchos animales domésticos, entre ellos los caballos y las aves; se aisló por primera vez en la provincia occidental del Nilo en Uganda en 1937 de la sangre de una mujer con fiebre, pero la mayor epidemia se registró en 1974 en Sudáfrica. El virus está ampliamente distribuido por África, Oriente Medio (incluyendo Israel), parte de Europa (Francia, Italia y Rumanía), la anterior Unión Soviética, Asia central y del sur y Australia, donde se le conoce con el nombre de virus Kunjin.

En los últimos años, han reaparecido enfermedades infecciosas olvidadas, como la tuberculosis, la malaria o el síndrome Dengue. Asimismo, nuevas formas de enfermedades hemorrágicas producidas por virus, todas ellas fatales, se han desarrollado en Sudamérica. Una colección de infecciones mortales producidas por virus que llevan nombres exóticos (Lassa, Valle del Rift, Oropouche, Rocio, Guanarito, virus de la encefalitis equina venezolana, viruela de los monos, chikungunya, Mokola, virus del bosque Semliki, Crimea-Congo, Marburg, Ébola, encefalitis japonesa, etc.) se extiende hacia occidente. El virus chikungunya, que se transmite por mosquitos, ha tenido en el año 2006 una diseminación explosiva en los países del océano Índico. En la isla francesa Reunión, aproximadamente uno de cada 10 habitantes ha sido infectado. El virus ya ha pasado a Isla Mauricio e islas Seychelles.

Los murciélagos están infectados por una gran cantidad de virus que luego se transmiten a la población humana. Estas transmisiones no son del todo sorprendentes dado que hay unas seis mil seiscientas especies de mamíferos, de las cuales 1.100 son de murciélagos, siendo el número total de murciélagos superior al del resto de los mamíferos. El virus Nipah infecta a algunas especies de murciélagos y apareció por primera vez en el año 1999 en Malasia, donde infectó a 265 personas matando a 105. El virus se transmitió desde el murciélago de la fruta, llamado zorro volador, que vive en el sudeste de Asia, al cerdo y de este al hombre. Otro ejemplo es el virus de la rabia, un miembro de la familia *Rhabdoviridae*, transmitido a través del mordisco de perros, zorros, murciélagos y mapaches. El virus produce una mortalidad del 85% si la mordedura es en la cabeza. No obstante, su progreso al cerebro se puede atajar aún después de la mordedura mediante la vacunación. Con este virus Pasteur desarrolló la segunda vacuna para el hombre en 1885 (la primera vacuna había sido desarrollada por Jenner en 1796). Sin embargo, la rabia se ha transmitido en España recientemente. En 1987 y en 1994 se transmitió en Valencia y en Granada a un niño mientras dormía y a otro niño sin que tampoco mediase ninguna provocación, respectivamente. En 1994, también en Granada, se infectó una persona al recoger un murciélago enfermo en el suelo. En 1999 el virus se transmitió al hombre por mordedura en el interior de un edificio, y también se infectó una niña por mordedura en el cuello mientras dormía en Murcia.

Los *lyssavirus*, otros miembros de la familia *Rhabdoviridae*, producen síntomas similares a los causados por el virus de la rabia. Estos virus se han identificado en murciélagos con problemas neurológicos, y se han transmitido a humanos en 1996 y 1998 por contacto con murciélagos, causando la muerte de las personas infectadas.

Existe un grupo de virus perteneciente a la familia *Filoviridae*, que producen fiebres víricas hemorrágicas y constantemente dan lugar a brotes epidémicos de corto alcance, aunque causan una alta mortalidad (25-80%) de las personas infectadas. Estos brotes epidémicos se han detectado esporádicamente en África (Congo, Sudán, Zaire, Gabón y Costa de Marfil) cada dos o tres años.

El virus de la hepatitis C está considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una *bomba viral* en potencia. Se estima que en la actualidad afecta a 170 millones de personas, lo que representa un 3% de la población mundial. La infección por el virus de la hepatitis C se distribuye en el mundo como se indica en el cuadro 2.1. Sin embargo, en áreas rurales de Egipto el número de infectados puede ascender al 20%.

CUADRO 2.1: Prevalencia de la hepatitis C

Regiones de la OMS	Población total (millones)	Prevalencia de hepatitis c (%)	Población infectada	Países sin datos
África	602	5,3	31,9	12
América	785	1,7	13,1	7
Mediterráneo Este	466	4,6	21,3	7
Europa	858	1,0	8,9	19
Sudeste de Asia	1.500	2,2	32,3	3
Pacífico Oeste	1.600	3,9	62,2	11
Total	5.811	3,1	169,7	57
España	42	1,9	0,8	NA

Fuente: *Weekly Regional Records*, OMS.

La previsión es que en el año 2020 se pueda llegar a 400 millones de infectados. Este virus es la principal causa del trasplante hepático. La hepatitis C es la más grave entre las hepatitis A, B, C, D y E. La enfermedad se puede tratar con éxito en el 51% de los casos si se diagnostica a tiempo, pero lamentablemente la infección por este virus da lugar a pocos síntomas en la fase inicial de la enfermedad. En las infecciones por el virus de la hepatitis C, el 85% de los casos son asintomáticos y el 15% sintomáticos. De los primeros el 20% se cura espontáneamente, mientras que en el 80% la infección evoluciona hacia formas crónicas, de las cuales un 20% termina en cirrosis. De entre los pacientes sintomáticos, el 20% desarrolla cirrosis. Del conjunto de los pacientes con cirrosis, un 15% termina con carcinoma hepático. Todos estos datos dan una idea de la gravedad de la infecciones por el virus de la hepa-

titis C. Lamentablemente, no existe una vacuna para controlar su diseminación, que hoy es dominante en el sudeste asiático, África central y Sudamérica, es decir, en áreas pobres por lo general.

Las zoonosis representan un peligro extraordinario para la población. Una de las más significativas ha sido el paso del virus de la gripe H5N1 de las aves al hombre, que ha causado una elevada alarma social. Este virus, reconocido como uno de los virus de la gripe más mortales tanto para las aves como para el hombre, se ha extendido como una epidemia en la especie aviar. Afortunadamente, el virus infecta al hombre solo excepcionalmente, aunque, cuando lo hace, cursa con una mortalidad en torno al 50%. Lamentablemente, si este virus adquiere la propiedad de transmitirse entre la población humana, su control será francamente complicado, dado que es un virus que se disemina por vía aérea con relativa facilidad.

Todos estos datos indican que la aparición de nuevos virus, o la reemergencia de viejos conocidos, no va a parar y que es necesario el desarrollo permanente de nuevas vacunas para prevenir las enfermedades que causan. Esta necesidad se ve reforzada por la actual producción de armas biológicas por parte de al menos 12 países, entre los que se encuentran Rusia y Estados Unidos, y por la posible activación del bioterrorismo.

2.3. Epidemia producida por el virus SARS-CoV: un ejemplo reciente

En el año 2002 se inició una epidemia producida por coronavirus, que afectan a animales domésticos y al hombre. Uno de estos virus, el productor del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), apareció por primera vez en el sudeste asiático, en la provincia de Guandong, y se extendió a 30 países. El virus causa fiebre alta, dificultad respiratoria, linfopenia, neumonía y, en algunos casos, la muerte. El virus infectó a más de 8.000 personas de las que murió un 10%.

En la identificación del origen del SARS, fueron clave una serie de evaluaciones de la reactividad de sueros de vendedores de animales, de verduras y de personas sanas en el área de Hong

Kong, que habían donado el suero dos años antes de la epidemia. Se observó que el 40, el 5 y el 2%, respectivamente, eran positivos para el virus. Ello indicó que el agente causal del SARS debería proceder de animales, y que un virus similar, muy probablemente no virulento, había infectado a la población local dos años antes de la epidemia causada por el virus virulento. Al investigar la presencia del virus en más de 100 especies de animales, se observó que estaba presente en civetas, mapaches y hurones, con una mayor incidencia en las civetas. La carne de estos animales se servía como un manjar exquisito en los restaurantes de la provincia de Guangdong. De hecho, antes del año 2003 existían en China unas seiscientos cincuenta granjas de civetas. La prohibición de esta costumbre y la eliminación de las granjas se consideró una de las mayores contribuciones para detener la extensión de la epidemia del SARS. Tanto el virus aislado de las civetas como el de los humanos tenían una secuencia muy parecida. Sin embargo, mientras que en las civetas el virus producía infecciones sin síntomas clínicos aparentes, en el hombre dio lugar a la muerte de un 10% de los pacientes infectados.

Afortunadamente, el 5 de julio de 2003, la OMS declaró el final de la epidemia. Desde entonces, solo se han reconocido oficialmente cuatro accidentes de laboratorio con el virus, además de otros cuatro casos de infecciones naturales, que se identificaron a finales del año 2003 y principios de 2004. En la diseminación de la epidemia jugó un papel muy relevante un nefrólogo de un hospital de Cantón, capital de la provincia de Guandong, que viajó a Hong Kong. Este paciente índice fue responsable de la transmisión de la infección a países como Vietnam, Singapur, Canadá, Estados Unidos, y de dos diseminaciones del virus, cada una de las cuales dio lugar a más de 100 pacientes infectados. El SARS-CoV se propaga por contacto y por el aire a cortas distancias. Para entender su método de diseminación hay que tener en cuenta que el virus está presente en el tracto respiratorio pero también en el tracto entérico y en la orina. En un segundo brote epidémico que se dio en los apartamentos Amoy Gardens de Hong Kong, se pudo demostrar que el virus se transmitió por aerosoles generados en los cuartos de baño, lanzados al exterior por los sistemas de ventilación instalados en los mismos.

La secuencia del SARS-CoV evolucionó muy rápidamente tanto en las civetas como en el hombre, indicando que ninguno de los dos hospedadores debía ser el reservorio natural del virus. La presencia de virus antecesores recientes comunes del SARS-CoV en murciélagos que circulan en varios continentes sugiere que los murciélagos son el reservorio natural del virus y hace posible que el virus vuelva a cruzar la barrera de las especies y reaparezca en el hombre. Desde la aparición del SARS, se ha investigado la presencia del virus en varias especies animales, habiéndose descubierto muchos coronavirus nuevos tanto en animales como en el hombre.

2.4. Emergencia de virus como consecuencia del comportamiento humano

A lo largo de la historia los virus y otros agentes infecciosos han emergido como consecuencia del contacto del hombre con los animales, pero, además de esta reaparición que se puede considerar natural, hay comportamientos humanos que favorecen la emergencia de agentes infecciosos. Dos ejemplos de este comportamiento son la producción y liberación deliberada de agentes infecciosos en la guerra o en actos de bioterrorismo, o la convivencia con animales exóticos como animales de compañía.

Recientemente se han hallado documentos que apuntan a lo que podría ser una de las primeras acciones de guerra bacteriológica en Europa. La investigación de un periodista italiano (Di Feo, 2009) indica que el fascismo italiano desarrolló un programa ambicioso para la producción de armas cargadas con bacterias para ser utilizadas contra los republicanos. Es conocido que tropas italianas fascistas participaron en la guerra civil española. De hecho, en la zona republicana, el tétanos llegó a representar una verdadera pesadilla.

Se han investigado varios agentes infecciosos para determinar su eficacia en la guerra biológica. Entre ellos están el ántrax (*Bacillus anthracis*), la peste (*Yersinia pestis*), la tularemia (*Francisella tularensis*), los virus productores de fiebre hemorrágicas (Ébola y Marburg), el virus de la viruela (poxvirus) y el virus de la neumonía

atípica (SARS-CoV). Países occidentales como Estados Unidos, pero también la antigua Unión Soviética han desarrollado en secreto armas biológicas, lo que ha dado lugar a accidentes que han causado la muerte de varias personas.

Otro aspecto del comportamiento humano que ha facilitado la transmisión de virus de los animales al hombre ha sido la popularidad de las ratas como animales exóticos de compañía. Esta práctica ha dado lugar al contagio de 16 personas en el noroeste de Alemania por un poxvirus de las vacas. Este virus ha causado graves lesiones en la piel de los individuos afectados y es el mismo que ha infectado a mangostas de zoológicos.

A este tipo de comportamientos se asocia otro tipo de actividades aconsejadas por líderes religiosos que, por ejemplo, han sugerido abstenerse de vacunarse contra el virus de la polio, por considerar que esta vacunación era utilizada para esterilizar a la población. Este tipo de prácticas se han dado fundamentalmente en países pobres del África central. Asimismo, religiosos o líderes de otras religiones se han manifestado en contra de la vacunación contra la polio en países desarrollados, como es el caso de España, indicando que ello solo pretende el enriquecimiento de unas pocas multinacionales. Tal es el caso manifestado en el año 2009 por una monja benedictina que vivía en el Monasterio de Monserrat. Mayor impacto podrían tener las declaraciones de líderes religiosos importantes que consideran que no se debe utilizar el preservativo para luchar contra la diseminación del sida, lo que ha debilitado considerablemente el programa de la OMS para la prevención del sida.

2.5. Estrategias para combatir las infecciones virales

Para proteger al hombre y a los animales frente a la infección por virus existen tres tipos de estrategias genéricas. Una de ellas es la alerta temprana, que se consigue con la implantación de una red de laboratorios de diagnóstico bien comunicados a nivel mundial. Otra es la prevención medioambiental, que consiste en la identificación y eliminación del origen de la epidemia. Este tipo de medida se practicó, por ejemplo, al cortar la

alimentación del ganado vacuno con restos del ganado ovino, lo que dio lugar a la aparición de las encefalopatías espongiformes bovinas (BSE), que produce el *mal de las vacas locas*. Una tercera medida de prevención de epidemias es la promoción de estudios de microbiología básica y el diseño de vacunas con antelación a la aparición de epidemias. Estas medidas incluyen acciones específicas como la eliminación de vectores virales, medidas de cuarentena para impedir la difusión de los agentes infectivos, el desarrollo de fármacos antivirales, la terapia con anticuerpos y, más recientemente, terapias con inhibidores moleculares basados en RNA de pequeño tamaño que suprimen de forma específica la expresión de genes (siRNA). En la actualidad se están aplicando métodos conocidos como *biología de sistemas* que permiten predecir la evolución y comportamiento de los virus. La mejor estrategia para combatir los virus es impedir su difusión identificando y eliminando las reservas naturales de los mismos. En el caso de la epidemia del SARS-CoV en el año 2003 fue esencial la restricción de movimientos de personas y animales en el sudeste asiático.

La vacunación supone la mejor estrategia para prevenir la infección por virus. A finales del siglo XVIII se desarrolló la vacuna de la viruela y, a finales del siglo XIX, la de la rabia. En la actualidad hay unas veinte vacunas para uso en salud humana y alrededor de un centenar aplicables en salud animal, desarrolladas fundamentalmente durante el siglo XX. Sin embargo, solamente hay unas diez vacunas virales para salud humana y unas cincuenta para salud animal que se utilicen de una forma generalizada.

Las vacunas consisten en antígenos, normalmente proteínas o agentes infectivos atenuados o inactivados, que inducen una respuesta inmune protectora frente a los correspondientes patógenos. La aplicación de las vacunas a la prevención de infecciones tiene una excelente relación del beneficio respecto al coste. Las vacunas continúan siendo un objetivo de gran interés para la sociedad porque el número de muertes debidas a enfermedades que se podían evitar mediante la inmunización es muy alto.

2.6. Desarrollo de una vacuna para prevenir el SARS-CoV

Existen dos tipos de vacunas basadas en la producción de virus completos: las vacunas inactivadas y las basadas en virus infectivos atenuados. Las primeras se basan en la producción y purificación de virus que se inactivan químicamente antes de su administración. Las segundas se basan en la obtención de virus atenuados por pases en cultivos de células de una especie distinta a la que se desea aplicar la vacuna, lo que reduce su crecimiento óptimo en el individuo al que se administra, reduciendo su virulencia (métodos jenerianos, en los que no se conoce la base molecular de la atenuación del virus). Alternativamente, la atenuación se puede conseguir identificando los genes responsables de la virulencia del virus y mutando o eliminando estos genes de la partícula viral. Esta segunda alternativa es la que ha seguido nuestro laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid) en la obtención de una vacuna atenuada para prevenir infecciones por el SARS-CoV.

El SARS-CoV incluye en su genoma el gen de la replicasa, que, con un tamaño de unas veinte kb, codifica una poliproteína de unos setecientos mil dalton de peso molecular (Enjuanes et ál. 2006) (gráfico 2.1).

GRÁFICO 2.1: Modificación del genoma SARS-CoV para el diseño de una vacuna para la prevención del SARS. A

A) ESTRUCTURA DEL GENOMA DEL SARS-COV



B) GENES DELECCIONADOS

Estructurales: E
 Accesorios: 6, 7a, 7b, 8a, 9b
 Combinación: E, 6, 7a, 8a, 8b, 9b

A) Se muestra un esquema de la estructura genética del virus. Los acrónimos indican el nombre de los genes.

B) Se indican los genes deleccionados en cada uno de los tres mutantes de delección de los virus construidos.

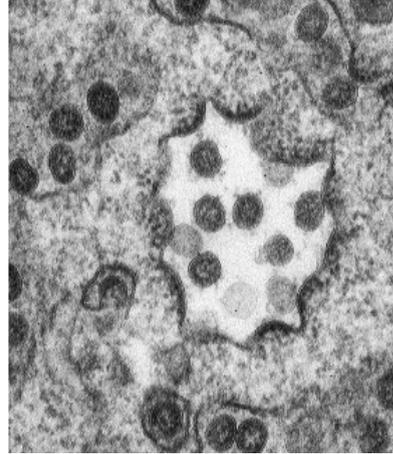
Esta proteína se procesa dando 16 proteínas no estructurales. Además, incluye otros 12 genes, que codifican las proteínas S, 3a, 3b, E, M, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, N y 9b. De entre estas, las proteínas 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b se sabía que no eran esenciales para la replicación del virus pero que podían contribuir a contrarrestar las defensas del huésped. En nuestro laboratorio decidimos construir mutantes de delección del SARS-CoV para identificar genes virales implicados en patogenicidad (De Diego et ál. 2007). En un primer mutante se eliminó el gen E de la envuelta, porque anteriormente habíamos observado en otro coronavirus que su delección daba lugar a virus competentes en replicación pero defectivos en propagación (gráfico 2.1). En un segundo mutante, se eliminaron seis genes no esenciales (6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b), esperando que el virus se atenuase. En un tercer recombinante, eliminamos los siete genes anteriores en un mismo virus.

Para poder construir estos mutantes de delección, primero se generó una copia cDNA del RNA genómico viral, dado que la genética reversa solo se puede realizar sobre moléculas de DNA (Almazán et ál. 2006). El clon infectivo se obtuvo ensamblando la copia del genoma viral en un cromosoma artificial de bacterias que da lugar a plásmidos estables, porque produce una sola copia del plásmido por bacteria, y se genera una toxicidad tolerable para las bacterias en las que se amplifican estos plásmidos. Los tres mutantes de delección indicados, más un virus control de longitud completa, se rescataron transfectando los clones cDNA correspondientes sobre células de mamífero, y se determinó su cinética de crecimiento en células de mono (Vero) o humanas (CaCo-2). Estos trabajos se realizaron en laboratorios de contención biológica nivel BSL-3 (figura 2.1). La sorpresa fue que todos los mutantes de delección crecieron, lo que indicó que ninguno de los genes delecionados era esencial. El resultado más relevante fue que los virus en los que se había eliminado el gen E se replicaron con títulos 20 a 200 veces inferiores a los dados por los virus que contenían el gen E, según se produjesen en células de mono o humanas, respectivamente.

FIGURA 2.1: Instalaciones de seguridad biológica nivel BSL3 del CNB (CSIC, Madrid)



FIGURA 2.2: Factoría del SARS-CoV en el compartimento intermedio celular



En la figura 2.1 se muestra a dos investigadores con los correspondientes equipos de protección manipulando el SARS-CoV en una cabina de bioseguridad nivel II-A.

En la figura 2.2 se muestra una microfotografía de la morfogénesis del SARS-CoV en el compartimento intermedio celular donde se ensambla el virus.

No obstante, todos los virus generados, incluyendo un virus con todos los genes (wt), se liberaron eficazmente de las células infectadas. Estos virus se ensamblaron en el compartimento intermedio celular (ERGIC) (figura 2.2).

Para determinar si se había construido un virus atenuado, se infectaron hámsteres con cada uno de los cuatro virus (el SARS-CoV con todos los genes y los tres mutantes de delección rescatados). Se observó que los virus con el gen E inducían inflamación en los pulmones de los animales infectados, mientras que, cuando se eliminó el gen E, no se observó esta inflamación. Para comprobar que los virus sin el gen E estaban realmente atenuados, se evaluó la actividad motriz de hámsteres inoculados con estos virus. Para ello se utilizaron jaulas en las que se introdujo una rueda giratoria por la que pueden correr los hámsteres. Se observó que, cuando

se administraba a estos animales el virus sin el gen E, su actividad física no disminuyó, mientras que la administración de los virus con el gen E producía inmediatamente una reducción drástica de su actividad motriz. Ello nos permitió concluir que el gen E afectaba a la virulencia del virus. Esta observación se comprobó en otro modelo animal experimental basado en ratones transgénicos en los que se había incorporado en gen ACE-2, que sirve de receptor para el SARS-CoV humano (De Diego et ál. 2008). Este gen aumentó considerablemente la susceptibilidad de estos ratones transgénicos al SARS-CoV, haciendo que el virus infectase el cerebro de estos ratones cuando poseía el gen E pero no cuando este gen se había delecionado. Asimismo, se comprobó que la deleción del gen E redujo la pérdida de peso y la letalidad que producía el virus en los ratones transgénicos. Todo ello confirmó que el gen E condicionaba el tropismo del virus, que su ausencia reducía su virulencia y que, por tanto, era un gen regulador de la patogenicidad viral. Los dos mutantes de deleción generados, uno deficiente en el gen E y el otro delecionando además en los genes 6 a 9b, estaban atenuados.

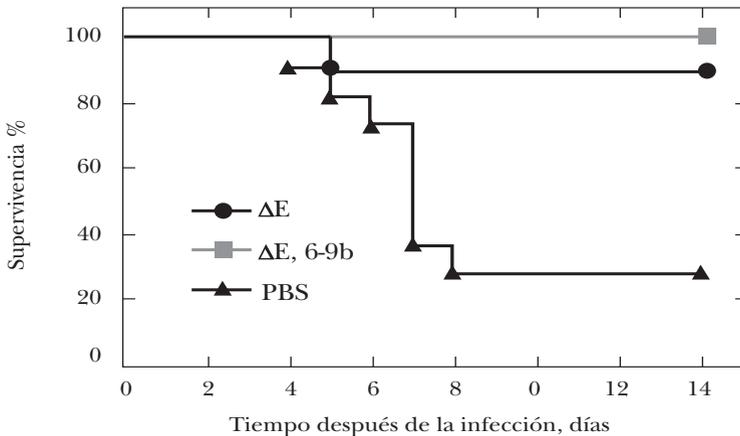
Un análisis del posible mecanismo por el cual la eliminación del gen E redujo la virulencia del virus se basó en estudios de genómica funcional, en los que se analizó el cambio en la expresión de genes en células infectadas con SARS-CoV que poseían el gen E, en relación con los cambios detectados cuando la infección se hizo con virus en los que este gen se había eliminado. Estos estudios se realizaron con matrices de oligonucleótidos (*microarrays*) y nos mostraron que la deleción del gen E aumentó la respuesta celular al estrés y también una respuesta celular que se activa como consecuencia del plegamiento incorrecto de las proteínas en el retículo endoplásmico (*unfolded protein response, UPR*) (Marta L. de Diego y Luis Enjuanes 2010; resultados no publicados). Esta respuesta se produce como consecuencia de una síntesis extraordinariamente alta de proteínas virales, que no se glicosilan ni pliegan correctamente por saturar los sistemas celulares implicados en estas tareas.

En el laboratorio hemos comprobado mediante estudios de genómica funcional que, en la infección por el SARS-CoV sin el gen E, se aumenta la respuesta de estrés y la del plegamiento defectuoso de las proteínas virales y celulares, lo que llevó a una

disminución de la respuesta inmune al virus y a un aumento de la vía proinflamatoria inducida por la infección. Estas actividades celulares se consideran causas decisivas de la patología grave que causa la infección por el SARS-CoV.

Los mutantes atenuados del SARS-CoV construidos que podrían ser utilizados como candidatos a vacunas para prevenir la infección por virus virulentos. La demostración de que, en efecto, estos mutantes de delección protegen frente al desafío por virus virulentos en tres modelos experimentales distintos llevó a la conclusión de que los mutantes del SARS-CoV generados sin el gen E son unos excelentes candidatos a vacunas para proteger frente al SARS (Lamirande et ál. 2008; Netland et ál. 2010) (gráfico 2.2). De hecho, estos mutantes constituyen la primera vacuna recombinante efectiva en modelos animales experimentales para prevenir posibles epidemias por este virus.

GRÁFICO 2.2: Protección inducida por la inmunización con mutantes de delección del SARS-CoV



Se inmunizaron ratones BALB/C de seis semanas con 12.000 ufp —unidades formadas de placas— de los virus que carecían del gen E (ΔE) y de los virus que carecen además de los genes 6 a 9b ($\Delta E, 6-9b$), o con solución salina (PBS). A los 21 días después de la vacunación se infectaron con 1×10^5 ufp de un virus adaptado a crecer en ratón (MA15). El número de animales que sobrevivieron se registró diariamente.

Naturalmente, queda la tarea de demostrar que en humanos la vacuna es efectiva y segura. Como una primera etapa para esta comprobación se evaluará su eficacia y seguridad en monos macacos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) proyecto BIO2007-60978, la Comunidad de Madrid proyecto S-SAL-0185/06 y the European Communities (EMPERIE) proyecto HEALTH-223498.

Bibliografía

- ALMAZÁN, F. et ál. «Construction of a SARS-CoV infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis». *J. Virol.* 80 (2006): 10900-10906.
- DIEGO, M. L. DE, L. PEWE, E. ÁLVAREZ, M. T. REJAS, S. PERLMAN, y L. ENJUANES. «Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice». *Virology* 376 (2008): 379-389.
- DIEGO, M. L. DE, E. ÁLVAREZ, F. ALMAZÁN, M. T. REJAS, E. LAMIRANDE, A. ROBERTS, W. J. SHIEH, S. R. ZAKI, K. SUBBARAO, y L. ENJUANES. «A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo». *J. Virol.* 81 (2007): 1701-1713.
- DI FEO, G. (2009). *Veleni di Stato*. BUR Biblioteca Univ. Rizzoli.
- ENJUANES, L. «¿Cómo afecta el virus a los seres humanos?». *El ser humano, Biblioteca BenRosch, Cordoba* (2009): 127-141.
- ENJUANES, L., F. ALMAZÁN, I. SOLÁ, y S. ZÚÑIGA. «Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction». *Annu. Rev: Microbiol.* 60 (2006): 211-230.
- ENJUANES, L., J. A. GARCÍA, R. NÁJERA, E. DOMINGO, R. FERNÁNDEZ-MUÑOZ, M. CAMBRA, y J. ORTÍN. «La virología en España después de la transición». En *España del siglo XXI. Ciencia y Tecnología* (E. Alarcón, E. Muñoz, y C. Sánchez del Río, Eds.), vol. 4 (2009): 631-672: Madrid: Biblioteca Nueva, Fundación Sistema e Instituto de España.
- LAMIRANDE, E. W., et ál «A live attenuated SARS coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters». *J. Virol.* 82 (2008): 7721-7724.
- NETLAND, J., M. L. DE DIEGO, J. ZHAO, C. FETT, E. ÁLVAREZ, J. L. NIETO-TORRES, L. ENJUANES, y S. PERLMAN. «Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease». *Virology* 399 (2010): 120-128.
- OLDSTONE, M. B. A. *Viruses, Plagues, and History*. Oxford: University Press (1998).

3. Cisticercosis: una enfermedad tropical abandonada

*Elizabeth Ferrer Jesús^{1,2,3}, Luis Miguel González Martínez¹,
Teresa Gárate Ormaechea¹ y Michael Parkhouse⁴*

¹ Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología (España)

² Instituto de Investigaciones Biomédicas, BIOMED (España)

³ Departamento de Parasitología, Universidad de Carabobo,
Sede Aragua (Venezuela)

⁴ Instituto Gulbenkian de Ciencia (Portugal)

3.1. Resumen

La cisticercosis del hombre está producida por *Taenia solium*, con la neurocisticercosis (NCC) como forma más grave, y el paciente teniásico y el cerdo como hospedadores clave en su transmisión. La enfermedad es endémica en áreas rurales de Latinoamérica, Asia y África, aunque la migración y los viajes contribuyen a su dispersión por todo el mundo. Debido a lo graves problemas sanitarios y económicos que provoca, y a su repercusión clínica y veterinaria, se han aplicado medidas de control como mejoras sanitarias, tratamiento de portadores, inspección veterinaria de cerdos y educación. Una opción que complementarías dichas medidas sería el desarrollo y la aplicación de una vacuna. Precisamente, en ténidos se ha avanzado mucho en el estudio de moléculas protectoras, con resultados excelentes en ensayos de vacunación en hospedadores intermediarios. Estos buenos resultados se fundamentan en que la respuesta inmune que desarrolla dicho hospedador es básicamente humoral en las primeras fases del desarrollo del cestodo. Se han utilizado extractos crudos, antígenos purificados, antígenos recombinantes, péptidos sintéticos y vacunas de ADN en distintos ensayos de inmunización. Los buenos datos obtenidos nos permiten pensar con optimismo en la posibilidad de la interrupción de la transmisión de *T. solium* en el cerdo, y de esta manera contribuir al control de la enfermedad humana.

3.2. Introducción

La cisticercosis está íntimamente relacionada con la teniasis. La teniasis humana es una infección intestinal producida por el adulto de *Taenia saginata* o *Taenia solium*, mientras que la cisticercosis ocurre a través de la ingestión de los huevos que eliminan los adultos, y es consecuencia del desarrollo de la larva del parásito en vaca y cerdo respectivamente. Además, los huevos de *T. solium* también pueden causar cisticercosis en el hombre, quien accidentalmente se convierte en hospedador intermediario del ténido. En todos los casos, el origen de la cisticercosis son los portadores humanos del ténido adulto.

Desde el punto de vista clínico, la teniasis es generalmente asintomática. Con respecto a la cisticercosis, la neurocisticercosis (NCC) es la forma más grave y a veces fatal. La gravedad de las patologías depende de la localización y número de cisticercos. La NCC se caracteriza por presentarse con convulsiones, mareos, cefaleas, desórdenes mentales, hidrocefalia, etc., aunque también se registran casos de NCC asintomática. Se estima que la patología es función de la localización de los cisticercos en el sistema nervioso, número y estado de degeneración de los mismos, situación inmunológica del paciente, y puede ocasionar la muerte (Del Brutto et ál. 1996).

Cisticercosis y teniasis son endémicas en áreas rurales de muchos países de Latinoamérica, Asia y África donde las condiciones socioeconómicas y sanitarias no son adecuadas. NCC es un problema de salud pública ya que es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso central y se considera como la primera causa de epilepsia de inicio tardío en las áreas endémicas. Además de los problemas de salud que ocasiona la cisticercosis, provoca importantes pérdidas económicas en la industria porcina y bovina de estas regiones (Del Brutto et ál. 1996).

La cisticercosis era frecuente en Europa y Estados Unidos a principios del siglo pasado; sin embargo, las mejoras generales de los sistemas de salud pública y veterinaria produjeron una reducción considerable de su prevalencia por lo que actualmente la mayoría de las personas con cisticercosis en estos países son inmigrantes de países endémicos (Schantz et ál. 1992).

El diagnóstico de teniasis se basa en el hallazgo y diferenciación de proglótides grávidas, aunque existen herramientas inmunológicas y moleculares que se van utilizando cada día más en la rutina del laboratorio (González et ál. 2000). En el diagnóstico de la cisticercosis los antecedentes epidemiológicos y la clínica pueden orientar el diagnóstico, el cual se lleva a cabo generalmente por métodos de imágenes y una amplia variedad de ensayos inmunológicos. El desarrollo y mejora de las técnicas inmunológicas han contribuido a un mayor conocimiento de la importancia de la enfermedad; además permite la evaluación de las vacunas como método de control.

3.3. Medidas de control

La cisticercosis se puede prevenir a través de mejoras en las condiciones higiénico-sanitarias y educación, tratamiento de los portadores de *T. solium*, control de la crianza del ganado porcino e inspección adecuada de la carne de cerdo, así como también mediante tratamiento de los animales infectados (Flisser et ál. 2004).

Recientemente, los avances llevados a cabo en el área de las vacunas permiten tener cierto optimismo en el futuro del control de la cisticercosis ante los buenos resultados obtenidos. A continuación, se describirán algunos de los candidatos vacunales más importantes.

Vacunas como estrategia de control. La vacunación de los cerdos ha sido propuesta como otra alternativa para el control de la transmisión de la enfermedad. Se han utilizado hasta ahora vacunas con extractos crudos, antígenos definidos del parásito, vacunas recombinantes, péptidos sintéticos y vacunas de ADN.

Vacunas con extractos crudos. En los ochenta, se realizaron experimentos pioneros en la vacunación contra ténidos utilizando antígenos crudos y antígenos de excreción/secreción (E/S) del parásito, encontrando niveles similares de protección con ambos antígenos (Rickard et ál. 1981). En 1993, Molinari et ál. desarrollaron un programa de inmunización de cerdos utilizando un ex-

tracto antigénico de cisticercos en un área endémica de México, con una reducción total de la cisticercosis porcina. Además, el grupo de la doctora Edda Sciutto llevó a cabo la inmunización de cerdos con antígenos de *T. crassiceps*, y después la infección prueba con huevos de *T. solium*, consiguiendo una reducción significativa de la carga parasitaria (Sciutto et ál. 1995).

Vacunas con antígenos recombinantes. La primera vacuna recombinante antiparasitaria efectiva fue desarrollada en el modelo oveja/*T. ovis* (Johnson et ál. 1989), a través de la clonación de un gen de oncosferas del parásito. El gen expresaba un antígeno, 45W, que mostró poseer propiedades protectoras. Por otra parte con el fin de desarrollar una vacuna similar a 45W contra la cisticercosis bovina, se clonaron ADNc homólogos y relacionados de oncosferas de *T. saginata* (Johnson et ál. 1989; Benítez et ál. 1996; Harrison et ál. 1996). Los investigadores emplearon dichos antígenos en ensayos de vacunación en vacas, obteniendo elevada protección (Lightowlers et ál. 1996; Harrison et ál. 2005). Estudios con la molécula HP6 de *T. saginata*, con homología con las moléculas 45W y TSA-18, demostraron que se trataba de una molécula de adhesión presente en la superficie y secreciones de oncosferas activadas del parásito, y que además mediaba adhesión (Bonay et ál. 2002). Un trabajo muy esperanzador fue el realizado por Flisser et ál. (2004) al evaluar la eficacia de dos antígenos recombinantes de oncosferas de *T. solium* (Tsol18 y Tsol45-1A), moléculas homólogas a las descritas en *T. ovis* y *T. saginata*; los autores obtuvieron una protección completa con los dos antígenos en tres protocolos de vacunación independientes. En esta línea, Harrison et ál. (2005) con la molécula HP6 de *T. saginata* demostró protección total ante una infección experimental en bovinos.

Vacunas con péptidos sintéticos. Se han realizado también varios estudios de protección utilizando péptidos sintéticos. Empleando como base la secuencia del antígeno 45W de *T. ovis*, se sintetizaron dos péptidos, uno de la porción amino-terminal y otro de la porción carboxi-terminal, que se utilizaron en experimentos de inmunización en ovejas. El péptido amino-terminal mostró ser inmunogénico en dichos animales. En México, a partir de la secuencia del antígeno KETc7 de *T. crassiceps* se diseñaron tres péptidos, GK1, GK2 y GK3, y se probaron en ensayos de protección en rato-

nes, encontrándose que GK1 estimulaba una respuesta importante, tanto humoral como celular. Posteriormente el mismo grupo de investigadores diseñaron péptidos a partir de la secuencia de los clones KETc1 y KETc12 que mostraron una respuesta protectora tanto humoral como celular en la cisticercosis murina. Recientemente, en un experimento de vacunación en cerdos de áreas endémicas de México con una combinación de tres péptidos (GK1, KETc1 y KETc12), se encontró que el tratamiento disminuía el número de cisticercos en un 98,7% y reducía la prevalencia de la enfermedad en cerdos (Huerta et ál. 2001). En otro trabajo, se ha demostrado que dicha combinación de péptidos (GK1, KETc1 y KETc12), llamada S3Pvac, no solo protege efectivamente contra la cisticercosis porcina, sino que también posee capacidad terapéutica reduciendo la carga parasitaria y la viabilidad de los cisticercos (de Aluja et ál. 2005).

Vacunas de ADN. Las vacunas de ADN han mostrado ser una alternativa viable para inducir inmunidad protectora contra gran número de organismos. En cisticercosis, en 1998, Rosas et ál. realizaron experimentos de vacunación en el modelo ratón/*T. crassiceps* con el ADNc de KETc7 en pcDNA3 y confirmaron que la inmunización confería protección. Más tarde, Cruz-Revilla et ál. (2000) realizaron la inmunización con ADN del antígeno recombinante protectoro KETc7 en pcDNA3 y apreciaron protección en el modelo ratón-*T. crassiceps*. Los ratones inmunizados exhibieron una respuesta específica de células T contra los antígenos de *T. crassiceps*. En otros estudios se vacunaron ratones BALB/c y ovejas con ADNc de 45W y se determinó por ELISA la respuesta de anticuerpos que fue equivalente a la obtenida con el antígeno recombinante. Posteriormente se llevaron a cabo experimentos de vacunación con los ADNc de los genes 45W, 18K y 16K de *T. ovis*, y se analizó la respuesta inmune humoral por ELISA. Las tres moléculas desarrollaron una respuesta de anticuerpos en ratón, mientras que en ovejas solamente 45W desencadenó una respuesta de anticuerpos débil (Drew et ál. 2000b). En 2002, Rosas et ál. evaluaron las propiedades protectoras de un antígeno de tegumento de oncosferas de *T. saginata*, Tso18, el cual fue utilizado en vacunación en el modelo murino de cisticercosis, provocando una reducción de la carga parasitaria de un 81,4%, comparada con los controles. En un trabajo

reciente se realizó la vacunación genética con un plásmido conteniendo la secuencia amino-terminal de la paramiosina y produjo un 43-48% de reducción de la carga parasitaria en ratones infectados con *T. crassiceps* (Solis et ál. 2005).

3.4. Conclusiones

El binomio teniasis/cisticercosis continúa siendo un problema de salud pública. Muchos trabajos apoyan la posibilidad de que una vacuna efectiva contra la cisticercosis porcina podría ser una realidad en un futuro próximo. Quizá la vacunación de los cerdos, junto a otras medidas, permitiría finalmente conseguir la interrupción del ciclo de vida del parásito y el control de la enfermedad humana.

Bibliografía

- ALUJA, A. DE, N., VILLALOBOS, G. NAVA, A. TOLEDO, J. MARTÍNEZ, A. PLANCARTE, L. F. RODARTE, G. FRAGOSO, y E. SCIUTTO. «Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs». *Vaccine* 23 (31) (2005): 4062-4069.
- BENÍTEZ, L., T. GÁRATE, L. HARRISON, P. KIRKHAM, S. BROOKES, y R. M. E. PARKHOUSE. «Cloning and sequencing of the gene encoding the principal 18-kDa secreted antigen of activated oncospheres of *Taenia saginata*». *Molecular and Biochemical Parasitology* 78 (1996): 265-268.
- BONAY, P., L. M. GONZÁLEZ, L. BENÍTEZ, M. FOSTER, L. J. HARRISON, R. M. E. PARKHOUSE, y T. GÁRATE. «Genomic and functional characterisation of a secreted antigen of *Taenia saginata* oncospheres». *Molecular and Biochemical Parasitology* 121 (2002): 269-273.
- BRUTTO, O. DEL, N. WADIA, M. DUMAS, M. CRUZ, V. TSANG, y P. SCHANTZ. «Proposal of diagnostic criteria for human neurocysticercosis». *Journal of Neurology Science* 42 (1996): 1-6.
- CRUZ-REVILLA, C., G. ROSAS, G. FRAGOSO, F. LÓPEZ-CASILLAS, A. TOLEDO, C. LARRALDE, y E. SCIUTTO. «*Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization». *Journal of Parasitology* 86 (2000): 67-74.
- DREW, D. R., M. W. LIGHTOWLERS, y R. A. STRUGNELL. «A comparison of DNA vaccines expressing the 45W, 18k and 16k host-protective antigens of *Taenia ovis* in mice and sheep». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 76 (2000): 171-181.
- FLISSER, A. et ál. «Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens». *Infection and Immunity* 72 (2004): 5292-5297.
- GONZÁLEZ, L. M., E. MONTERO, L. J. S. HARRISON, R. M. E. PARKHOUSE, y T. GÁRATE. «Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR». *European Journal of Clinical Microbiology* 38 (2000): 737-744.

- HARRISON, G. B., D. D. HEATH, R. P. DEMPSTER, C. GAUCI, S. E. NEWTON, W. G. CAMERON, C. M. ROBINSON, S. B. LAWRENCE, M. W. LIGHTOWLERS, y M. D. RICKARD. «Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres». *International Journal of Parasitology* 26 (1996): 195-204.
- HARRISON, L., T. GÁRATE, D. BRYCE, L. GONZÁLEZ, M. FOSTER-CUEVAS, L. WAMAE, J. A. ONYANGO-ABUJE, y R. M. E. PARKHOUSE. «Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization». *Tropical Animal Health Production* 37 (2005): 103-120.
- HUERTA, M. et ál. «Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico». *Vaccine* 20 (2001): 262-266.
- JOHNSON, K. S., G. B. HARRISON, M. W. LIGHTOWLERS, K. L. O'HOY, W. G. COUGLE, S. B. DEMPSTER LAWRENCE, J. G. VINTON, D. D. HEATH, y M. D. RICKARD. «Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen». *Nature* 338 (1989): 585-587.
- LIGHTOWLERS, M., R. ROLFE, y C. GAUCI. «*Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens». *Experimental Parasitology* 84 (1996): 330-338.
- MOLINARI, J. L., R. SOTO, P. TATO, D. RODRÍGUEZ, A. RETANA, J. SEPÚLVEDA, y A. PALET. «Immunitization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study». *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49 (1993): 502-512.
- RICKARD, M., J. ARUNDEL, y A. ADOLPH. «A preliminary field trial to evaluate the use of immunisation for the control of naturally acquired *Taenia saginata* infection in cattle». *Research in Veterinary Sciences* 30 (1981): 104-148.
- ROSAS, G., C. CRUZ-REVILLA, G. FRAGOSO, F. LÓPEZ-CASILLAS, A. PÉREZ A., M. BONILLA. R. ROSALES y E. SCIUTTO. «*Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization». *Journal of Parasitology* 84 (1998): 516-523.
- ROSAS, G. et ál. «Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen». *Microbes Infection* 4 (2002): 1417-1426.
- SCHANTZ, P., A. MOORE, J. MUÑOZ, B. HARTMAN, J. SCHAEFER, A. ARON, D. PERSUAD, E. SARTI, M. WILSON, y A. FLISSER. «Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City». *New England Journal of Medicine* 327 (1992): 692-695.
- SCIUTTO, E., A. DE ALUJA, G. FRAGOSO, L. RODARTE, M. HERNÁNDEZ, M. VILLALOBOS, A. PADILLA, N. KEILBACH, M. BACA, y T. GOVEZENSKY. «Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection». *Veterinary Parasitology* 60 (1995): 53-67.
- SOLÍS, C., P. OSTOA-SALOMA, V. LUGO-MARTÍNEZ, S. JOHNSTON, y J. LACLETTE. «Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin». *Infection and Immunity* 73 (2005): 1895-1897.
- TOLEDO, A. et ál. «Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response». *Infection and Immunity* 69 (2001): 1766-1773.

4. La lucha frente a la enfermedad de Chagas: una enfermedad silenciosa y silenciada cien años después de su descubrimiento

Mar Velarde Rodríguez, Beatriz Camps Carmona y Pedro Albajar-Viñas

Departamento de Enfermedades Tropicales Desatendidas
de la Organización Mundial de la Salud

No estalla como las bombas,
ni suena como los tiros.
Como el hambre, mata callando.
Como el hambre, mata a los callados:
a los que viven condenados al silencio
y mueren condenados al olvido.
Tragedia que no suena,
enfermos que no pagan,
enfermedad que no vende.
El mal de Chagas no es negocio
que atraiga a la industria farmacéutica,
ni es tema que interese
a los políticos ni a los periodistas.
Elige a sus víctimas en el poverrío.
Las muerde y lentamente,
poquito a poco,
va acabando con ellas.
Sus víctimas no tienen derechos,
ni dinero para comprar los derechos que no tienen.
Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren.

Poema de EDUARDO GALEANO

En el siguiente capítulo se exponen algunos de los motivos que han hecho que la enfermedad de Chagas haya sido y continúe siendo una enfermedad silenciosa y aún silenciada cien años después de su descubrimiento. Mediante un recorrido descriptivo

que va desde el descubrimiento de la enfermedad, pasando por epidemiología, parásito, vector, transmisión, prevención, control, enfermedad, diagnóstico, tratamiento y ciclo pobreza-enfermedad, se analizan con un lenguaje sencillo y estilo divulgativo las razones que han vinculado la enfermedad de Chagas con la pobreza. Al final del capítulo y citando las motivadoras palabras de Carlos Chagas, se enumera una serie de propuestas planteadas desde el terreno, que podrían, a corto y medio plazo, cambiar el rumbo de millones de personas silenciosas y silenciadas...

4.1. El descubrimiento de la enfermedad y el contexto social

Carlos Ribeiro Justiniano Chagas nació en el estado de Minas Gerais, Brasil, en 1878 y se graduó en la Facultad de Medicina de Río de Janeiro a los 25 años de edad. Cuatro años después, en 1907, el joven médico fue designado por su jefe y destacada figura de salud pública, Oswaldo Cruz, para investigar y contribuir al control de la malaria que enfermaba a los obreros que construían la vía central del ferrocarril de Brasil, entre Corinto y Pirapora. Allí, mientras buscaba los parásitos del paludismo, describió por primera vez al parásito responsable de la enfermedad que llevaría su nombre, aislándolo de los intestinos de un insecto hematófago. Carlos Chagas, al mismo tiempo que logró dar respuesta a la demanda de una población, consiguió un hecho insólito en la historia de la medicina: además del agente patógeno y del vector responsable de la transmisión, identificó a los reservorios animales —empezando por un gato doméstico— y la enfermedad en humanos —a partir del caso de una niña de dos años, llamada Berenice.

Fue el mismo Chagas quien constató que aquellos insectos hematófagos, llamados triatominos, habitaban en las hendiduras de las paredes de barro y techos de las casas de los obreros, picándolos e impidiéndoles dormir por las noches. Asimismo, a medida que comprobaba que esta enfermedad asolaba poblaciones rurales y se extendía por una vasta región del territorio brasileño, el médico investigador declaró que este importante problema de salud pública debía ser firmemente combatido por el Estado.

[...] hay un designio nefasto en el estudio de la Trypanosomiasis. Cada trabajo, cada estudio, apunta un dedo hacia una población malnutrida que vive en malas condiciones; apunta hacia un problema económico y social, que a los gobernantes les produce tremenda desazón pues es testimonio de incapacidad para resolver un problema tremendo. No es como el paludismo un problema de bichitos en la naturaleza, un mosquito ligado al ambiente o como lo es la esquistosomiasis relacionada con un factor ecológico lúmnico casi inalterable o incorregible. Es un problema de vinchucas, que invaden y viven en habitaciones de mala factura, sucias, con habitantes ignorados, mal nutridos, pobres y envilecidos, sin esperanza ni horizonte social y que se resisten a colaborar. Hable de esta enfermedad y tendrá a los gobiernos en contra. Pienso que a veces más vale ocuparse de infusorios o de los batracios que no despiertan alarma a nadie [...].

CARLOS CHAGAS

La enfermedad de Chagas, en su inicio, fue una enzootia americana restringida a animales selváticos. Se cree que con el establecimiento de los primeros asentamientos agrícolas del hombre recién llegado al Nuevo Mundo, unos diez mil años atrás, este se infectó y empezó a enfermar, como así lo corroboran los restos momificados de hasta nueve mil años de antigüedad. Desde su descubrimiento, pues, y a lo largo de su historia, la enfermedad de Chagas ha afectado a colectivos de trabajadores en condiciones precarias. Especialmente a partir del siglo xx, los diferentes medios de transporte: el barco, el autobús, el tren y el avión, principal y sucesivamente, han transportado a individuos en busca de mejores condiciones de vida, y así diseminado progresivamente una enfermedad, hoy ya en más de cuatro continentes.

4.2. Perfiles epidemiológicos cambiantes

En la época en la que Carlos Chagas describió la enfermedad, esta afectaba principalmente a las personas de áreas rurales de América Latina. Aún actualmente, la enfermedad de Chagas es

endémica en 21 países del continente americano, desde México hasta Argentina, con unos diez millones de personas infectadas.

En los últimos años y motivado, en gran medida, por las crisis económicas y altos niveles de pobreza, se han producido dos tipos de movimientos migratorios que han cambiado el perfil epidemiológico de la enfermedad. Por un lado, un movimiento del campo a la ciudades (urbanización) y, por otro, de áreas endémicas a áreas o países en los que anteriormente no se reportaba la enfermedad, como, por ejemplo, Estados Unidos de América, Canadá, Japón, Australia y hasta 16 países europeos. Sea como fuere, en cualquiera de estos diferentes escenarios —rural, urbano, área endémica o no endémica— la enfermedad de Chagas hoy día, al igual que en el momento de su descubrimiento, sigue afectando a los grupos más pobres de la sociedad.

Una población vulnerable

En América Latina, uno de los rostros que ilustran la vulnerabilidad asociada a la enfermedad de Chagas es el de los niños cuyas familias están afectadas por la enfermedad o la pérdida de uno o ambos progenitores. Estas son causas del abandono de la escuela y el trabajo desde una edad temprana (Oliveira 2009).

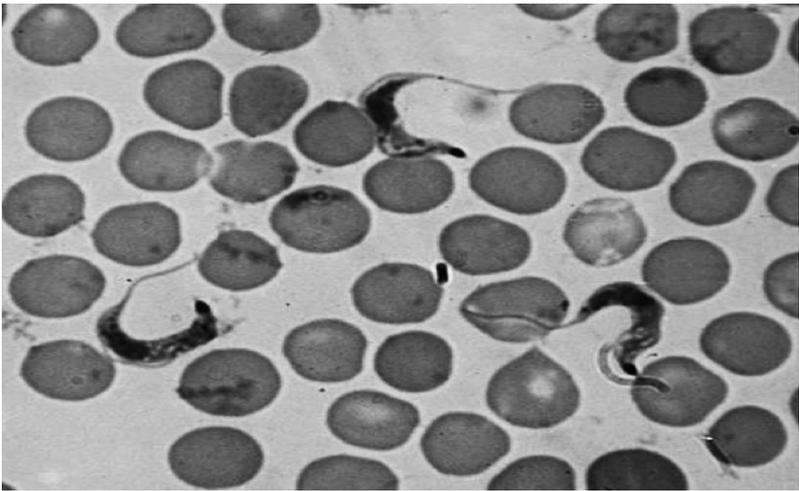
En el contexto migratorio desde América Latina a países europeos, conviene señalar la *feminización* como uno de los rasgos de la población emigrante (Pellegrino 2004). Muchas de las mujeres que llegan a Europa procedentes de zonas con alta prevalencia de la enfermedad están en edad reproductiva, tienen la posibilidad de transmitir la infección a sus hijos y no siempre tienen fácil acceso al sistema sanitario del país de destino. Esta situación convierte a las mujeres inmigrantes, embarazadas e infectadas, así como a sus futuros hijos, en uno de los grupos especialmente vulnerables en el contexto migratorio. Ser consciente de la posibilidad de transmitir la enfermedad a sus hijos es causa constante de gran estrés para estas mujeres.

4.3. El parásito, el vector y las vías de transmisión

Como identificó Carlos Chagas, el parásito que causa la enfermedad es un protozoo flagelado denominado *Trypanosoma cruzi* y el insecto vector que la transmite, el triatomino. Al triatomino se le conoce popularmente como *chinche*, *vinchuca*, *chipo*, *barbeiro* o *kissing-bug*, entre otros.

El triatomino es un insecto hematófago que se esconde durante el día y se alimenta de sangre por la noche. Es precisamente al alimentarse y defecar sobre la piel cuando el ser humano puede infectarse si se rasca o pone en contacto el parásito presente en las heces con la picadura, otras heridas o mucosas (típicamente la conjuntiva o mucosa oral).

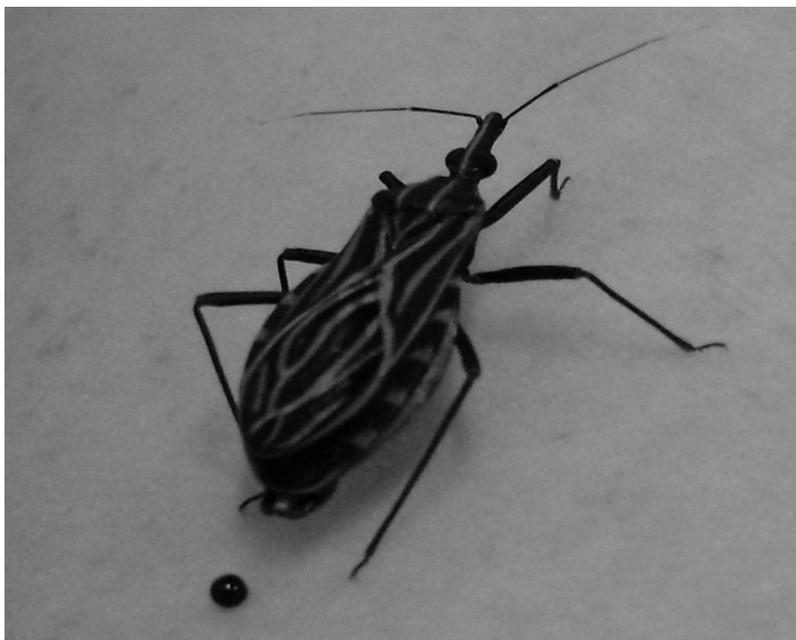
FIGURA 4.1: *Trypanosoma cruzi*



Fuente: Coura J. R. Lab. Doenças Parasitarias-IOC-Fiocruz.

Adicionalmente a la vía vectorial, otras formas de transmisión de la infección por el *T. cruzi* son las transfusiones sanguíneas o donaciones de órganos, tejidos y/o células de donantes infectados, la transmisión congénita de una madre infectada a su hijo, la transmisión por ingestión de alimentos contaminados y, más raramente, los accidentes de laboratorio. Las transfusiones y donaciones de órganos, así como la vía congénita, son las formas de transmisión que en las últimas décadas están cobrando importancia en las áreas o países no endémicos.

FIGURA 4.2: Vector



Fuente: Moreira CJC and Junqueira ACB_Lab. Doenças Parasitarias-IOC-Fiocruz.

La vivienda y el medio ambiente

En América Latina, los triatominos se adaptaron a vivir en el interior de los domicilios, habitando en ranuras y grietas de paredes y techos, o en corrales de animales localizados alrededor de las viviendas. Los triatominos típicamente colonizan las moradas más humildes que se construyen con paredes de barro, tejados de materiales vegetales y en las que frecuentemente existen condiciones de hacinamiento.

En la región amazónica, por otro lado, la deforestación de sus bosques muestra cómo la actividad humana puede alterar el equilibrio del ecosistema. Se propicia, así, un mayor contacto entre el vector y el ser humano y se incrementan las posibilidades de transmisión en territorios que antes se creían libres de la enfermedad. En este contexto amazónico, se ha descrito la enfermedad de Chagas afectando a los recolectores de fibras de la palmera *Leopoldina piassaba*. En condiciones que, de alguna forma, recuerdan a las de los obreros del ferrocarril evaluados por Carlos Chagas. Dichos

recolectores —solos o con sus familias— se ven obligados a residir durante meses en medio de la floresta, donde son atacados por el triatomino silvestre (Aguilar et ál. 2007).

Vinculada a la presencia del vector en la región amazónica, se ha descrito en los últimos años la transmisión regular del *T. cruzi* a través de alimentos contaminados, ocasionando característicamente brotes orales de enfermedad de Chagas aguda. Una mayor frecuencia de los mismos ha sido asociada a la producción de zumos de frutos de palmeras, especialmente por parte de poblaciones con precarias condiciones socioeconómicas e higiénicas.

4.4. La prevención y el control

En América Latina, dada la importancia de la transmisión vectorial, su control es un elemento esencial en la prevención (en este caso, primaria) de la enfermedad, evitando infecciones y reinfecciones, estas últimas, asociadas con una mayor morbilidad y mortalidad. La lucha contra el vector puede llevarse a cabo, entre otros, rociando las casas y sus alrededores con insecticidas de acción residual, mejorando las condiciones de la vivienda para reducir la presencia del vector, o incluso en determinados ambientes como el amazónico, a través de medidas personales, como las mosquiteras.

En cuanto a las otras formas de transmisión de la enfermedad, presentes tanto en América Latina como fuera de ella, las principales medidas recomendadas para prevenirlas son el cribado para *T. cruzi* en donantes de sangre y de órganos, tejidos y/o células, el diagnóstico prenatal de mujeres embarazadas y la detección precoz y el tratamiento de los hijos infectados (prevención secundaria).

La educación y la higiene

Frecuentemente los pobladores de regiones endémicas tienen un conocimiento limitado de la enfermedad de Chagas y su transmisión. Se necesita una respuesta educativa para informar a las personas no solamente sobre la enfermedad, sino también sobre las medidas que pueden tomar ellos mismos para prevenirla y controlarla.

La escuela se identifica como un ámbito especialmente propicio para educar a los escolares de áreas endémicas a reconocer factores de riesgo en sus viviendas e involucrarlos en la vigilancia activa de la enfermedad (Crocco, Rodríguez y Catalá 2005). En el caso de los brotes de transmisión oral y su manejo preventivo, la educación ha de ir encaminada a la promoción de medidas higiénicas en el proceso de preparación, almacenamiento, comercialización y consumo de alimentos.

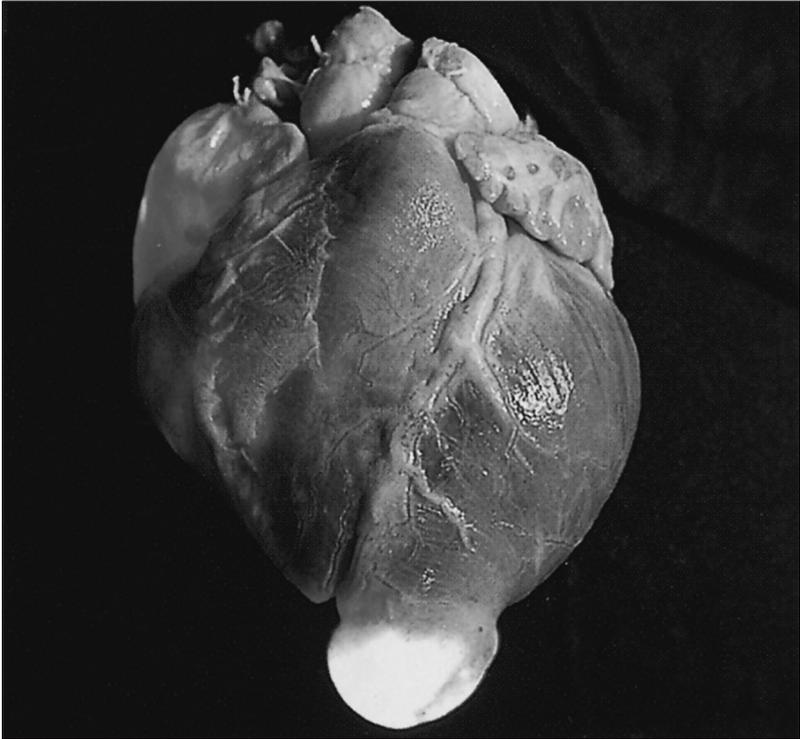
4.5. La enfermedad

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: una aguda y otra crónica. La *fase aguda*, desde el momento de la infección hasta aproximadamente dos meses después, en la mayoría de los casos es asintomática (silenciosa). Las manifestaciones pueden incluir, entre otras, fiebre, dolor de cabeza, adenopatías, aumento del tamaño del hígado y del bazo. Cuando la transmisión es vectorial, en ocasiones puede aparecer un edema bupalperal unilateral llamado *signo de Romana* o una inflamación cutánea llamada *chagoma* en el lugar de la picadura. Ambos son de gran utilidad para su diagnóstico clínico.

La *fase crónica* de la enfermedad puede presentarse en cuatro formas clínicas principales: indeterminada, cardíaca, digestiva o mixta (cardio-digestiva). En la llamada forma indeterminada (asintomática, silenciosa), la cual se encuentra aproximadamente en el 60% de los pacientes, ni en el examen físico, ni en la radiografía o electrocardiografía, se evidencian lesiones de los llamados órganos diana: el corazón y el sistema digestivo (aunque a través de pruebas de examen modernas y tecnológicamente avanzadas se puedan detectar, ya, alteraciones incipientes). En la forma cardíaca, que se encuentra hasta en un 30% de los pacientes, las alteraciones comprenden, entre otros, bloqueos de conducción eléctrica, arritmias, insuficiencia cardíaca, aneurisma de punta y tromboembolismo. La cardiopatía crónica chagásica puede dar lugar a una muerte súbita —la causa más frecuente de óbito, o a una muerte más tardía por insuficiencia cardíaca—. La miocarditis crónica provocada por la presencia del parásito en el músculo cardíaco y la consecuente reacción autoinmune son las principales causas del daño tisular. La forma crónica digestiva, típicamen-

te acompañada de alteraciones del sistema autonómico nervioso, deriva de la presencia del parásito en el músculo liso digestivo y la consecuente reacción autoinmune. La dificultad de tránsito del alimento a nivel del esófago o colon, las dos porciones del aparato digestivo más afectadas, puede resultar en una dilatación que da lugar a un característico megaesófago y/o megacolon.

FIGURA 4.3: Aneurisma apical



Fuente: Peters y Pasvol (2007).

La discriminación laboral

Los enfermos con resultado positivo en las pruebas diagnósticas sanguíneas para la enfermedad de Chagas sufren frecuentemente un fenómeno de discriminación laboral a la hora de su contratación e incluso, en ocasiones, son despedidos de su trabajo. Aunque la mayoría de ellos presenta la enfermedad en su forma indeterminada y no tengan incapacidad laboral de ningún tipo, el miedo o

prejuicio que asocia infección chagásica a muerte estaría entre las causas principales de su exclusión del mercado laboral. Por otro lado, en el grupo de pacientes con sintomatología, especialmente cardiaca, la enfermedad, de hecho, limita su vida laboral, parcial o totalmente. Y a aquellos que se quedan sin trabajo les resulta difícil obtener una pensión de invalidez compensatoria para ellos y sus familias (Guariento, Fernandes y Arruda 1999).

4.6. El diagnóstico

En la fase aguda, es posible diagnosticar la enfermedad de Chagas a través de métodos parasitológicos como, por ejemplo, la gota fresca, o incluso el frotis sanguíneo, que visualizan el parásito en sangre.

Ya en la fase crónica, con baja parasitemia por estar el parásito oculto en los tejidos diana, se recomiendan las pruebas serológicas para detectar los anticuerpos desarrollados por el enfermo frente al *T. cruzi*. Métodos convencionales de diagnóstico serían la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o la hemaglutinación indirecta (HAI). Durante la fase crónica, el estudio clínico anual del paciente es de gran valor para verificar la permanencia del paciente en la forma indeterminada o actuar lo más precozmente posible tras la aparición de cualquier alteración cardiaca y digestiva. Exámenes clásicos serían la evaluación física, el electrocardiograma, la radiografía de tórax, el ecocardiograma y el Holter, en el caso de patología cardiaca, y el estudio radiográfico con contraste de bario, para la afectación digestiva. Pruebas tecnológicamente más avanzadas pueden detectar alteraciones con mayor precocidad.

Dentro del sistema de salud, existen diferentes oportunidades para diagnosticar a los pacientes que acuden a él: *a)* en la atención primaria, cuando por causa de sus antecedentes epidemiológicos o clínicos, se solicitan pruebas diagnósticas; *b)* en los bancos de sangre, cuando se realiza el cribado de los donantes; *c)* en los servicios de obstetricia, cuando se solicitan pruebas prenatales en las mujeres con antecedentes epidemiológicos de riesgo; *d)* en las visitas a especialistas, cuando se estudia el diagnóstico diferencial de sus manifestaciones cardiacas, digestivas o mixtas.

El acceso al sistema sanitario

El tipo de sistema sanitario y la dificultad o falta de acceso al mismo condicionan el patrón de comportamiento de los enfermos en cuanto a la búsqueda de cuidados sanitarios, tanto a nivel de atención primaria como a otros niveles asistenciales. La oportunidad de ser diagnosticado (acceso al diagnóstico) es, sin duda alguna, uno de los pasos más importantes para rescatar a los pacientes de su condición *silenciosa*. En consecuencia, el diagnóstico, tratamiento y, en gran medida, la futura progresión de la enfermedad están condicionados al tipo de cobertura sanitaria del paciente e, inclusive, a la situación social, laboral y económica del mismo (Castillo-Riquelme et ál. 2008).

4.7. El tratamiento

El tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas puede llevarse a cabo actualmente con dos medicamentos: el benznidazol y el nifurtimox. Estos medicamentos son efectivos en la fase aguda de la enfermedad, en recién nacidos y en niños. También se indican en el caso de reactivación de la infección en personas inmunodeprimidas (con sida u otras enfermedades inmunosupresoras) y en la etapa crónica temprana de la enfermedad. Sin embargo, su eficacia es menor en etapas más avanzadas de la enfermedad y la incidencia de reacciones adversas es normalmente mayor cuanto mayor sea la edad del paciente.

Otras medidas terapéuticas encaminadas a incidir en la evolución clínica de la enfermedad o a mejorar la calidad de vida del paciente incluyen recomendaciones de estilo de vida y alimentación y tratamiento precoz de alteraciones o síntomas cardiacos o digestivos. El seguimiento correcto de estas medidas a menudo representa un desafío especialmente difícil para las personas con infección/enfermedad de Chagas.

La investigación y el desarrollo

En contraposición a otras dolencias, como el cáncer o las patologías cardiovasculares, a las que se destina una gran inversión en investigación y desarrollo (I + D), un análisis del mercado farma-

céutico revela que la enfermedad de Chagas es una enfermedad *extremadamente* olvidada. Esto significa que, dado que la mayoría de pacientes tienen bajo poder adquisitivo y, en consecuencia, escasa capacidad para adquirir el tratamiento, estos quedan excluidos del mercado farmacéutico. El benznidazol y el nifurtimox, desarrollados en la década de los 60, fueron comercializados en los 70. Entre 1975 y 2004, 1.556 nuevos compuestos químicos fueron comercializados en todo el mundo y ninguno de ellos para enfermedad de Chagas (Zackiewick 2007).

4.8. El ciclo pobreza-enfermedad

La morbilidad y mortalidad chagásicas afectan típicamente a los años productivos de las personas enfermas. Esto se traduce, en primer lugar, en un empobrecimiento de los individuos que la padecen y, en segundo lugar, en pérdidas económicas para las sociedades con alta incidencia de la enfermedad (Franco-Paredes et ál. 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que los costes de tratar la enfermedad de Chagas en su fase crónica pueden ser de hasta 50 veces más que los de prevenir la enfermedad. Este alto impacto económico se debe a que la infección contraída en edad temprana, y no tratada, se traduce en una enfermedad que típicamente va a requerir una atención sanitaria de por vida (Castillo-Riquelme et ál. 2008).

4.9. Una selección de propuestas

El conocimiento que se tiene hoy día acerca de la enfermedad de Chagas y los factores socioeconómicos relacionados con ella evidencian que es necesario y es posible abordar la enfermedad con un enfoque interdisciplinar e integral, y no solamente desde la perspectiva biomédica. Se necesita y es posible *tratar* la pobreza tan íntimamente ligada a la enfermedad de Chagas; reducir la vulnerabilidad, el riesgo de adquirir la infección y la discriminación de los infectados y enfermos; favorecer la educación; promocionar mejores condiciones de vivienda, y mejorar el acceso al diagnóstico y al tratamiento (cuadro 4.1).

E não vai demorar que passemos adiante...
 No escopo e na perspectiva de uma Grande Ciência,
 de uma Grande e Bela Ciência,
 A se fazer Arte em defesa da Vida

Cita de Carlos Chagas, 1926

CUADRO 4.1 Selección de propuestas planteadas desde el terreno con impacto positivo demostrado sobre los pacientes con infección o enfermedad de Chagas

1. Implementación de un sistema de vigilancia y control de la enfermedad de Chagas a nivel nacional y supranacional (regional y global).
2. Promoción y colaboración con los programas nacionales de control vectorial para prevenir la infección, la reinfección y la enfermedad; con una vinculación del conocimiento ecoepidemiológico a las estrategias de control vectorial local, y teniendo en cuenta las implicaciones medioambientales.
3. Cribado para *T. cruzi* en donantes de sangre y de órganos, tejidos y/o células, diagnóstico prenatal de mujeres embarazadas y detección precoz y tratamiento de los hijos infectados.
4. Implementación de elementos de Información, Educación y Comunicación (IEC) con un enfoque basado en el contexto socioeconómico y cultural existente.
 - 4.a) Información sobre hábitos culturales y comportamientos de búsqueda de salud inadecuados y promoción del conocimiento de la enfermedad y la existencia de su diagnóstico y tratamiento.
 - 4.b) Educación a nivel de escuelas para la participación activa de los escolares en la prevención y vigilancia de la enfermedad.
 - 4.c) Formación acerca de la enfermedad de Chagas del personal de salud y formación de las familias para su implicación y compromiso en el tratamiento y seguimiento de sus miembros.
 - 4.d) Potenciación de la formación sobre la enfermedad de Chagas en el ámbito universitario (Yun et ál. 2009).

CUADRO 4.1 (cont.): Selección de propuestas planteadas desde el terreno con impacto positivo demostrado sobre los pacientes con infección/enfermedad de Chagas

5. Inclusión de la atención médica de la infección/enfermedad de Chagas en los sistemas de salud, y atención médica primordialmente situada a nivel de la asistencia primaria de salud, con interacción y derivación entre los diferentes niveles de salud (primario, secundario y terciario).
6. Cribado y diagnóstico activo a nivel comunitario, identificando los pacientes candidatos a ser tratados y adecuando los protocolos de diagnóstico al contexto local.
7. Evaluación operativa de las pruebas de diagnóstico rápido existentes y promoción y desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico rápidas para su uso inclusive en áreas sin acceso a electricidad y equipos técnicos.
8. Implantación sistemática del diagnóstico de la infección chagásica aguda a través de las láminas de malaria, allí donde se realicen, para facilitar el diagnóstico de casos agudos, la detección de brotes de transmisión oral y los focos de transmisión activa (vigilancia epidemiológica).
9. Implementación del tratamiento y cumplimiento terapéutico, con criterios de inclusión y exclusión para su uso racional, de acuerdo a la edad, posible comorbilidad, fase de la infección, forma clínica, acceso al seguimiento médico continuado a lo largo del tratamiento, participación de la familia para administración del medicamento y detección precoz de la aparición de efectos secundarios para su correcto manejo (Yun et ál. 2009).
10. Desarrollo de fórmulas pediátricas de los medicamentos existentes y promoción de la investigación de nuevos medicamentos con mayor efectividad y menor número y gravedad de efectos secundarios para las fases aguda y crónica de la enfermedad.

Bibliografía

- AGUILAR, H. M., F. ABAD-FRANCH, J. C. PINTO DIAS, A. C. VERÍSSIMO JUNQUEIRA, y J. RODRIGUES COURA. *Chagas disease in the Amazon Region*. Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, vol. 102 (Suppl. I) (2007): 47-55.
- CASTILLO-RIQUELME, M., F. GUHL, B. TURRIAGO, N. PINTO, F. ROSAS, M. FLÓREZ MARTÍNEZ, J. FOX-RUSHBY, C. DAVIES, y D. CAMPBELL-LENDRUM. «The Costs of Preventing and Treating Chagas Disease in Colombia». *Plos Neglected tropical diseases*, vol. 2, Issue 11 (noviembre de 2008): e336.
- CROCCO, L., C. RODRÍGUEZ, y S. CATALÁ. «Enfermedad de Chagas en Argentina. Herramientas para que los escolares vigilen y determinen la presencia de factores de riesgo en sus viviendas». *Cadernos Saúde Pública, Rio de Janeiro* 21 (2) (marzo-abril de 2005): 646-651.
- FRANCO-PAREDES, C., A. VON, A. HIDRON, A. J. RODRÍGUEZ-MORALES, I. TÉLLEZ, M. BARRAGÁN, D. JONES, C. G. NAQUIRA, y J. MÉNDEZ. «Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America». *BMC International Health and Human Rights* (2007): 7:7.
- GUARIENTO, M. E., M. V. FERNANDES CAMILO, y A. M. ARRUDA CAMARGO. «Situação trabalhista do portador de doença de Chagas crônica, em um grande centro urbano». *Cadernos Saúde Pública, Rio de Janeiro* 15 (2) (abril-junio de 1999): 381-386.
- OLIVEIRA, W. DE, «All-around care for patients with Chagas disease: a challenge for the XXI century». *Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, vol 104 (Suppl. I) (2009): 181-186.
- PELLEGRINO, A., «Migration from Latin America to Europe: Trends and Policy». *International Organization for Migration* (2004).
- PETERS, W. y G. PASVOL *Atlas of Tropical Medicine and Parasitology*. Elsevier Mosby, 6.ª ed. (2007).
- YUN, O., M. Á. LIMA, T. ELLMAN, W. CHAMBI, S. CASTILLO, L. FLEVAUD, P. RODDY, F. PARREÑO, P. ALBAJAR VIÑAS, y P. P. PALMA. «Feasibility, Drug Safety, and Effectiveness of Etiological Treatment Programs for Chagas Disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year Experience of Médecins Sans Frontières». *PLOS Neglected tropical diseases*, vol. 3, Issue 7, (julio de 2009): e488
- ZACKIEWICK, C. «Tratamento: realidade, dúvidas e perspectivas». En *OPS y Fundación Mundo Sano La enfermedad de Chagas a la puerta de 100 años de conocimiento de una Endemia americana ancestral*. Buenos Aires (julio de 2007).

5. La enfermedad de Chagas en Murcia: El mayor foco de infección fuera de zona endémica

*Laura Murcia Flores¹, Bartolomé Carrilero Fernández¹,
María Asunción Iborra Bendicho¹ y Manuel Segovia Hernández^{1,2}*

¹ Unidad Regional de Medicina Tropical, Servicio de Microbiología,
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia

² Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia

5.1. Introducción

5.1.1. Epidemiología

La enfermedad de Chagas debe su nombre al médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, quien la descubrió en 1909 (Chagas 1909). Es el único caso en la historia de la medicina en la que se descubre al mismo tiempo y por la misma persona una enfermedad infecciosa, el microorganismo que la produce y el agente biológico que la transmite, además de todos los aspectos de la enfermedad. Esta la causa el parásito *Trypanosoma cruzi*, protozoo hemoflagelado perteneciente al orden de los *Kinetoplastida*. *T. cruzi* es transmitido a los animales y a los seres humanos a través de insectos vectores que se encuentran solamente en América (especialmente en las zonas rurales, donde la pobreza es generalizada). A la enfermedad de Chagas, también se le conoce como tripanosomiasis americana.

T. cruzi posee un ciclo de vida complejo que incluye la infección del hospedador vertebrado y la transmisión por insectos vectores. Este parásito pasa por tres estadios morfológicos principales: la forma amastigote no flagelada y las formas flageladas epimastigote y tripomastigote (Brenner 1973). La forma epimastigote prolifera en el insecto vector y eventualmente se diferencia para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, capaces de infectar al hospedador vertebrado. Una vez en el torrente sanguíneo del ver-

tebrado, los tripomastigotes son capaces de penetrar en una gran variedad de tipos celulares. Dentro de las células, los parásitos se transforman en formas amastigotes, las cuales sufren varios ciclos de división. Seguidamente, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que son liberados por ruptura de la célula anfitriona, iniciando el siguiente ciclo de infección.

La forma más común de contraer la infección es a través del contacto con las heces de un insecto triatomino (conocido con los nombres de chinche besucona, benchuca, vinchuca, chipo o barbeiro), el cual se alimenta de la sangre de seres humanos y animales. El parásito también puede transmitirse de una madre infectada al feto (congénita), a través de productos contaminados derivados de la sangre (transfusiones) y menos frecuentemente por órganos transplantados o accidentes de laboratorio. La transmisión oral por ingestión de alimentos contaminados con triatominos o sus deyecciones parece ser un modo de contaminación importante sobre todo en las regiones amazónicas.

En los países donde la enfermedad de Chagas no es endémica, la transmisión vertical constituye la vía de transmisión más frecuente después de la vía transfusional. En zonas endémicas, la prevalencia en embarazadas puede alcanzar un 81%, y la probabilidad de transmisión materno-fetal varía desde < 1 hasta el 10%, dependiendo del área geográfica. Se estima que entre 5.000 y 18.000 recién nacidos nacen infectados por *T. cruzi* al año en América Latina.

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina, afectando a 21 países de Latinoamérica. La prevalencia de dicha enfermedad varía según el área geográfica considerada, siendo el país más afectado Bolivia, con una prevalencia global en población general del 28,8%, pudiendo alcanzar hasta el 45 en algunas zonas. Se desconoce el número exacto de infectados, si bien la OMS estima que afecta, aproximadamente, a entre 8 y 12 millones de personas y entre un 20 y un 30% de ellas desarrollarán enfermedad grave (OMS 2005). La enfermedad de Chagas es responsable de 21.000 muertes al año y produce una pérdida anual de 676.000 años de vida ajustados por capacidad en los países donde es endémica.

5.1.2. Manifestaciones clínicas y diagnóstico

La enfermedad de Chagas pasa por dos estadios sucesivos: una fase aguda y otra crónica (Prata 2001). Los primeros signos de la enfermedad de Chagas aguda suelen aparecer a la semana de la infestación. Después de la penetración del parásito a través de una laceración de la piel aparece una zona indurada y eritematosa, denominada chagoma, acompañada de linfadenopatía local. El signo de Romana, que es la manifestación clásica de la enfermedad de Chagas aguda, se manifiesta por edema indoloro bpalpebral y unilateral. Esto ocurre cuando la vía de entrada fue conjuntival. Los primeros signos se acompañan de malestar general, fiebre, anorexia y edema facial y extremidades inferiores. También puede cursar con erupción morbiliforme, linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. La miocarditis grave, aunque es poco frecuente, causa la mayor parte de las muertes en fase aguda. Los signos neurológicos son raros, pero se han comunicado casos de meningoencefalitis.

Las manifestaciones agudas de la infección por *T. cruzi* desaparecen de forma espontánea en casi todos los enfermos, dando paso a la fase indeterminada o asintomática crónica. Se calcula que el 30-40% de las personas infectadas evolucionan a formas sintomáticas. Las manifestaciones clínicas pueden ser de diferente gravedad, afectando a diferentes órganos, principalmente corazón y sistema digestivo. De forma menos frecuente afecta al sistema nervioso, formas neurológicas, que son más comunes en inmunodeprimidos.

La enfermedad de Chagas crónica sintomática suele afectar al corazón y los síntomas se deben a trastornos del ritmo cardiaco, miocardiopatía y tromboembolias (Salomone 2003). La alteración observada con mayor frecuencia en la electrocardiografía es el bloqueo de rama derecha, pudiendo aparecer extrasístoles ventriculares, alteración primaria de la repolarización ventricular, zonas eléctricamente inactivas, bloqueos auriculoventriculares y taquiarritmias (Gascón et ál. 2007). La miocardiopatía es causa de insuficiencia cardiaca, siendo frecuente la aparición de embolias en el cerebro u otras zonas secundarias a trombos murales en punta de ventrículo izquierdo. La primera manifestación de esta enfermedad puede ser la muerte súbita por fallo cardiaco.

Las complicaciones de las formas digestivas más comunes son disfagia, odinofagia, dolor torácico y regurgitación, todas ellas debidas a un megaesófago (Rezende 2007). Puede haber aspiración, especialmente durante el sueño y son frecuentes los episodios repetidos de neumonitis por esta causa. En caso de megacolon, las manifestaciones son dolor abdominal y estreñimiento crónico. El megacolon avanzado puede provocar obstrucción, vólvulo y, en caso de complicación, septicemia y muerte.

Durante la fase aguda de la enfermedad existen numerosos parásitos en sangre periférica y es posible detectarlos mediante pruebas parasitológicas directas (OMS 2002). En este sentido, la observación microscópica de la sangre fresca puede revelar fácilmente la presencia del parásito, gracias a su movilidad.

Las extensiones de sangre (gota gruesa y frotis) teñidas adecuadamente permiten observar las características morfológicas del parásito. Sin embargo, cuando el grado de parasitación es bajo, es necesario utilizar métodos de concentración, tales como el método de Strout y el microhematocrito.

El xenodiagnóstico y el hemocultivo (disponibles solo en laboratorios especializados) son métodos clásicos, cuya sensibilidad depende del grado de parasitemia del paciente.

Con el desarrollo de las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado para el diagnóstico parasitológico de diversas enfermedades. Esta técnica se basa en la amplificación de secuencias específicas de ADN que son abundantes y específicas del parásito en cuestión. En el caso de *T. cruzi*, hay dos secuencias específicas que han resultado útiles en el diagnóstico: la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto y una secuencia repetitiva de 195 pares de bases del ADN del parásito. Esta técnica es más sensible que el xenodiagnóstico y el hemocultivo. Sin embargo, la sensibilidad también depende del grado de parasitemia del paciente.

Durante la fase crónica, el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos circulantes, ya que la parasitemia en esta fase es fluctuante. Actualmente, los tests serológicos más empleados son hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA); en esta fase no es indispensable demostrar la presencia del parásito.

5.1.3. Tratamiento y prevención

Los fármacos actualmente usados en el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son nifurtimox y benznidazol, cuya actividad anti *T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace más de tres décadas (Jannin y Villa 2007). Ambas drogas son activas en la fase aguda, ayudando a controlar la enfermedad y disminuyendo la probabilidad de paso a la cronicidad.

El tratamiento con nifurtimox durante la fase aguda acorta notablemente la duración de los síntomas y de la parasitemia y disminuye el índice de mortalidad (Harrison). No obstante, hay pocos estudios al respecto, indicando que solo alrededor del 70% de las infecciones agudas se curan parasitológicamente con un ciclo completo de tratamiento. Pese a sus limitaciones, el tratamiento con nifurtimox se debe iniciar cuanto antes en la fase aguda, lo que mejora las posibilidades de éxito. Los efectos secundarios habituales del nifurtimox son dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos y pérdida de peso. Las posibles reacciones neurológicas son inquietud, desorientación, pérdida de memoria, insomnio, espasmos, parestesias, polineuritis y convulsiones, que desaparecen al reducir la dosis o suspender el tratamiento. La dosis diaria aconsejada en el adulto es de 8 a 10 mg/kg, para los adolescentes 12,5 a 15 mg/kg y para los niños de uno a 10 años, 15 a 20 mg/kg. El fármaco se administra por vía oral, en cuatro tomas diarias durante 90 a 120 días.

La eficacia del benznidazol es similar a la del nifurtimox; se ha notificado un índice de curación del 90% en lactantes con infección congénita tratados antes de cumplir los 12 meses de edad. Algunos efectos adversos son neuropatía periférica, reacciones cutáneas más o menos severas y granulocitopenia. La dosis oral recomendada es de 5 a 7 mg/kg/día, por 60 días. En los países de América Latina se considera al benznidazol como el fármaco más indicado, siendo el único autorizado en España. Se trata de un medicamento no disponible en farmacia y debe tramitarse su obtención a través de medicación extranjera.

Durante años se ha debatido si los pacientes que están en la fase indeterminada o sintomática crónica de la enfermedad de Chagas deben recibir tratamiento. En la fase indeterminada, el tratamiento con benznidazol parece efectivo, disminuyendo el riesgo

de progresión de la enfermedad hacia grados de cardiopatía más avanzados.

Estudios clínicos realizados en zona endémica (Viotti et ál. 2006) demuestran los beneficios del tratamiento con benznidazol en la fase crónica. El consenso actual de los autores latinoamericanos es que toda las personas infectadas con *T. cruzi* de hasta 18 años de edad deben recibir benznidazol o nifurtimox.

El resto de fármacos, cuya utilidad es discutida para tratar la enfermedad de Chagas aguda, tales como alopurinol, fluconazol e itraconazol, han sido estudiados en animales de laboratorio, y en menor medida en humanos (Urbina 2005). Ninguno de los tres medicamentos posee actividad contra los tripanosomas que justifique su empleo en los humanos.

Las complicaciones cardiacas y digestivas deben ser evaluadas y, en su caso, tratadas por especialistas. El trasplante de corazón es, en los casos graves, la única opción para personas con cardiopatía chagásica terminal.

Debido a la escasa eficacia del tratamiento farmacológico y a la inexistencia de una vacuna, el control de la transmisión por *T. cruzi* en países endémicos depende necesariamente de la disminución de la población domiciliaria del vector, a través de los programas de fumigación con insecticidas, mejoras a las condiciones de la vivienda y sensibilización de las personas vulnerables. Estas medidas y el cribado serológico de donantes de sangre han disminuido de manera notable la transmisión del parásito en muchos países endémicos. Es aconsejable que los turistas y cooperantes en zonas rurales en países endémicos no durmieran en casas con condiciones de riesgo. Mosquiteras y repelentes de insectos son útiles.

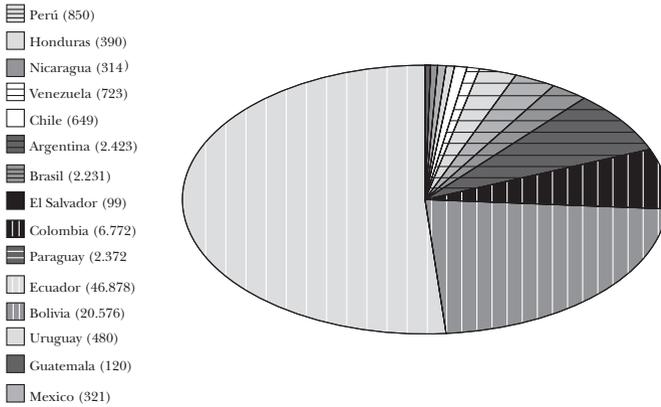
Ante las consecuencias potencialmente graves de la enfermedad de Chagas, es prudente que todos los inmigrantes que vienen de regiones endémicas y viven en España fueran sometidos a un cribado para descartar la infección (Gascón 2005). La identificación de las personas infectadas permitiría la vigilancia electrocardiográfica periódica, que es importante porque a algunos pacientes con perturbaciones de mal pronóstico del ritmo cardiaco los marcapasos los pueden ayudar. Otra motivación del cribado es la posibilidad de transmisión congénita.

5.2. Nuestra experiencia en la Unidad Regional de Medicina Tropical de Murcia (URMTM)

A causa de las complicaciones y muertes que ocasiona, la enfermedad de Chagas es la parasitosis más importante que aqueja a los países de América Latina. La enfermedad de Chagas no solo es un problema de salud en América Latina, sino también en países que reciben a inmigrantes infectados (Gascón et ál. 2009; Lescure et ál. 2008). De todos los países europeos, España recibe el mayor número de inmigrantes de origen latinoamericano. La enfermedad de Chagas aguda es rara en España. Se han notificado varios casos de transmisión congénita (Carrilero et ál. 2009; Muñoz et ál. 2007) y de transmisión por transfusión (Pérez et ál. 2008). Es mayor el número de casos de transmisión por transfusión que la cifra notificada. En 2005 se inició la detección de infección por *T. cruzi* en sangre de donación (BOE 2005).

La prevalencia de infecciones crónicas en España ha aumentado considerablemente en los últimos años. Los datos del censo del año 2009 indicaron que en España viven más de 1,6 millones de inmigrantes procedentes de países donde la enfermedad de Chagas es endémica (Instituto Nacional de Estadística, 2009); 227.145 procedían de Bolivia donde la prevalencia de la infección por *T. cruzi* puede llegar al 45%. De igual forma, en los últimos años se ha producido un aumento exponencial de la población latinoamericana en la Región de Murcia. Así, en 2008 había censados 85.198 latinoamericanos, lo que supone el 6% de la población murciana. La mayoría proceden de Ecuador (54%) y Bolivia (23%) (Centro Regional de Estadística). Se calcula que el número total de personas infectadas por *T. cruzi* en Murcia es de 6.000 a 9.000.

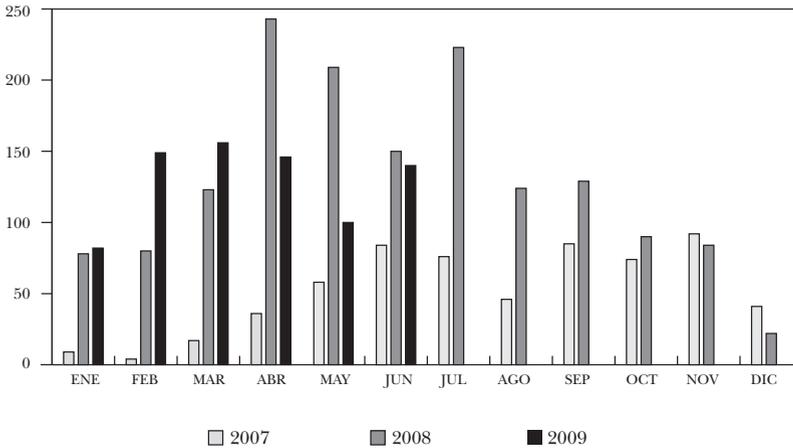
GRÁFICO 5.1: Inmigrantes de América Latina en Murcia en 2008



5.2.1. Características epidemiológicas de los pacientes atendidos

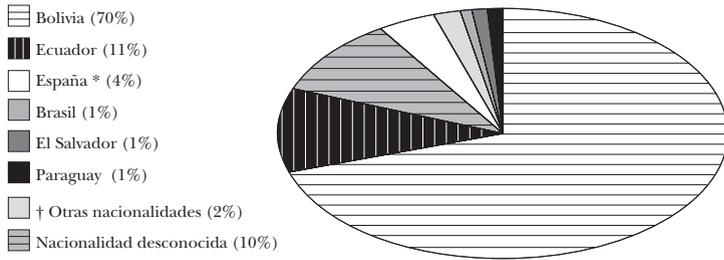
Durante el período de tiempo transcurrido entre enero de 2007 y junio de 2009 a un total de 1485 pacientes atendidos en la URMTM con sospecha de estar infectados por *T. cruzi* se les realizaron las pruebas diagnósticas para la enfermedad de Chagas.

GRÁFICO 5.2: Pacientes estudiados para *T. cruzi* por serología URMTM, 2007-2009



De estos 1.044 (70%) son bolivianos, 164 (11%) de Ecuador, 219 (15%) proceden de otros países de Latinoamérica, o son latinoamericanos de nacionalidad desconocida. 58 pacientes testados (4%) fueron niños nacidos en España de madres infectadas por *T. cruzi*.

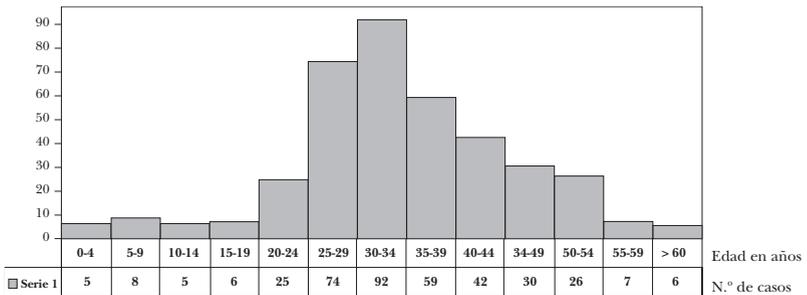
GRÁFICO 5.3: Perfil demográfico de los pacientes, 2007-2009



* Nacidos en España de madres latinoamericanas infectadas; † Cuba, Perú, Honduras, Nicaragua, Venezuela, Chile, Argentina, Colombia.

De 1.485 pacientes testados para *T. cruzi*, 418 (28,2%) resultaron positivos mediante dos pruebas serológicas (IFI y ELISA). El 67% fueron mujeres, con una edad media de 34 años. El gráfico 5.4 muestra el número de casos de Chagas estudiados en Murcia entre 2007 y 2009 distribuidos por edad.

GRÁFICO 5.4: Número de casos de Chagas distribuidos por edad



El porcentaje de personas infectadas por *T. cruzi* varía según el país de origen. Así, el 36,7% (383/1044) de la población boliviana estaba infectada en contraste con el 3,7% (6/164) de los pacientes procedentes de Ecuador. El resto de las seroprevalencias por países de procedencia se ven en el cuadro 5.1.

Entre los 58 niños nacidos en España de las madres infectadas latinoamericanas, 2 casos de enfermedad de Chagas congénita fueron detectados: en un recién nacido sintomático (Carrilero et ál. 2009) y en un niño asintomático de un año, ambos de madres bolivianas. Esto representa una tasa de un 3,5% de la transmisión vertical en nuestra experiencia.

CUADRO 5.1: Seroprevalencia de los pacientes con enfermedad de Chagas estudiados en la URMTM por país de origen, 2007-2009

País de origen	Prevalencia (porcentajes)	N.º total
España*	3,5	2-58
Bolivia	36,7	383-1044
Ecuador	3,7	6-164
Argentina	0	0-9
Brasil	22,2	2-9
Chile	0	0-3
Colombia	0	0-15
Cuba	0	0-1
El Salvador	22,2	2-9
Honduras	0	0-2
Nicaragua	0	0-2
Paraguay	17,7	3-17
Perú	0	0-1
Venezuela	0	0-2
Nacionalidad desconocida	13,4	20-149
Total	28,2	418-1485

* Nacidos en España de madres latinoamericanas infectadas.

5.2.2. Características clínicas de los pacientes diagnosticados

Excepto los dos casos de congénitos, todos los pacientes diagnosticados se encontraban en la fase crónica de la enfermedad.

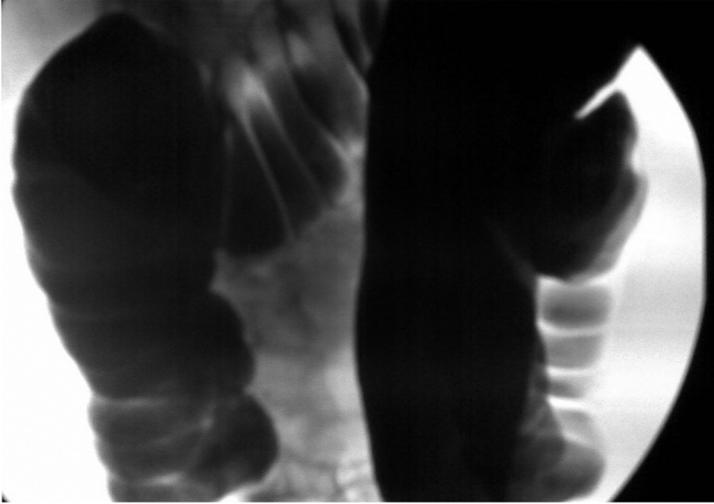
Los pacientes con resultado positivo en dos técnicas serológicas se consideraron infectados y se les realizó una anamnesis para estudiar la presencia de síntomas sugerentes de patología relacionada con la enfermedad de Chagas. Durante la fase crónica de la enfermedad, la mayoría de los afectados no saben que tienen la infección. Muchos pueden no presentar síntomas asociados a la enfermedad de Chagas. Así los siguientes síntomas de insuficiencia cardíaca que nos pueden indicar una cardiopatía fueron considerados disnea, disnea paroxística nocturna, ortopnea, edema de extremidades inferiores, etc. Además, para el estudio de la afectación cardíaca también se practicaron una serie de exploraciones complementarias, tales como radiografía de tórax, electrocardiograma, ecocardiograma, etc.

FIGURA 5.1: Radiografía de tórax indicando la presencia de cardiomegalia en paciente con cardiopatía dilatada



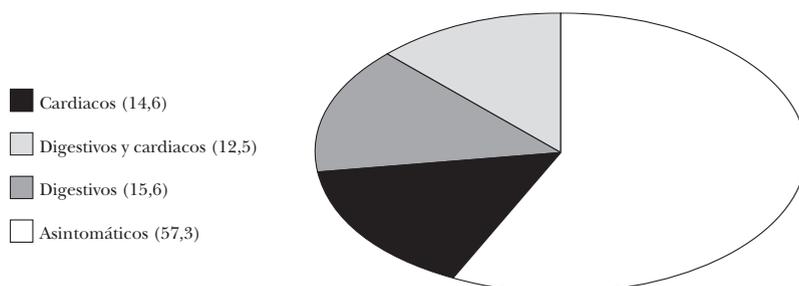
En búsqueda de afecciones digestivas se interrogó haciendo hincapié en los siguientes síntomas: disfagia, odinofagia y reflujo gastroesofágico, como indicadores de una afectación esofágica; distensión abdominal y estreñimiento, como indicadores de una afectación de colon. A todos los pacientes se les realizó un tránsito esófago-gastro-duodenal en búsqueda de una afección esofágica y un enema opaco para el despistaje de megacolon.

FIGURA 5.2: Enema opaco indicando la presencia de megacolon



Teniendo en cuenta la edad media de nuestros pacientes (34 años), no es sorprendente que estos muestren síntomas de la enfermedad de Chagas. Así, 238 (57,3%) eran asintomáticos y 178 (42,7%) tenían síntomas, en 61 (14,6%) eran exclusivamente cardíacos, 52 (12,5%) presentaron síntomas cardíacos y digestivos y 65 (15,6%) tenían solo trastornos digestivos (gráfico 5.5).

GRÁFICO 5.5: Sintomatología en los pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica diagnosticados en la URMTM, 2007-2009



5.2.3. Tratamiento y seguimiento de los pacientes diagnosticados

De los 418 pacientes diagnosticados, 370 han recibido tratamiento con benznidazol 5-7 mg/kg/día en tres tomas diarias durante 60 días. 13 (3,5%) no completaron el tratamiento debido a efectos adversos que obligaron a su suspensión. La causa de interrupción del tratamiento fue siempre la aparición de reacciones cutáneas.

De los pacientes que han recibido el tratamiento, 115 (31,1%) pacientes presentaron reacciones adversas, mostrando algunos de ellos más de una y requiriendo la mayoría tratamiento sintomático. Un total de 100 (27,03%) pacientes presentaron hipersensibilidad cutánea, 1 (0,3%) astenia, 8 (2,16%) molestias gastrointestinales (náuseas, dolor epigástrico, vómitos y diarrea) y en 6 (1,62%) pacientes fueron de tipo neurológico. De los pacientes que presentaron algún tipo de reacción cutánea, 30 mostraron además una segunda reacción adversa: 16 (4,3%) de tipo neurológica, 9 (2,4%) de tipo digestiva, 2 (0,5%) presentaron fiebre, 1 (0,3%) de tipo hemática, 1 artritis migratoria (0,3%) y 1 (0,3%) presentó cefalea. Asimismo, en 11 de estos apareció un tercer tipo de reacción, en 4 (1,1%) pacientes fueron digestivas, 1 (0,3%) presentó fiebre, 4 (1,1%) cefalea y 2 (0,5%) pacientes presentaron vértigo.

Solo cuatro pacientes presentaron reacciones adversas graves; la mayoría ocurrieron durante el primer mes de tratamiento, y las más serias en el segundo mes.

5.2.4. La utilidad del PCR en el seguimiento de la respuesta al benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas

La evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes crónicos es un aspecto complejo. Después del tratamiento, los criterios de la cura para los pacientes con la enfermedad de Chagas crónica son la persistencia de resultados negativos en las pruebas de serología y parasitología (OMS 2002), aunque la seroconversión normalmente ocurre varios años después del tratamiento (Andrade et ál. 1991). Además, la respuesta parasitológica se examina mediante pruebas con baja sensibilidad como son la concentración por el método de Strout, hemocultivo o xenodiagnosis (OMS 2002). En un esfuerzo por obtener ensayos más sensibles, se han desarrollado protocolos de PCR que permiten detectar el ADN de *T. cruzi* en las muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Así, se han diseñado cebadores que amplifican el ADN nuclear y del kinetoplasto de *T. cruzi*, con capacidad para detectar el equivalente de una sola célula del parásito en 10 mL de sangre (Ávila et ál. 1991; Britto et ál. 1993).

En la URMTM se ha realizado un estudio prospectivo en el que se valoró la PCR como herramienta para el diagnóstico y seguimiento parasitológico, en una cohorte bien caracterizada de 181 pacientes con enfermedad de Chagas crónica que fue tratada con benznidazol (Murcia et ál. 2010). Fue este el primero de su tipo en evaluar la utilidad de PCR como herramienta de seguimiento parasitológico en enfermos de Chagas crónicos después del tratamiento, en un país europeo donde la posibilidad de reinfección queda descartada.

A los pacientes se les toman muestras de sangre el día de inicio del tratamiento y los días 90, 150 y 420 del postratamiento, respectivamente. Para la detección del parásito mediante PCR, se emplearon los oligonucleótidos O121/O122 que amplifican un fragmento de 330 pb del ADN del kinetoplasto. La PCR se realizó en 181 muestras de pacientes crónicos infectados por *T. cruzi*, con un rendimiento del 68% (123) (gráfico 5.6). La sensibilidad de PCR comparada con la de serología varía entre el 59 y el 100%, dependiendo de varios factores, como el área geográfica y la edad de los pacientes estudiados (Wincker 1994a; Wincker et ál. 1994b;

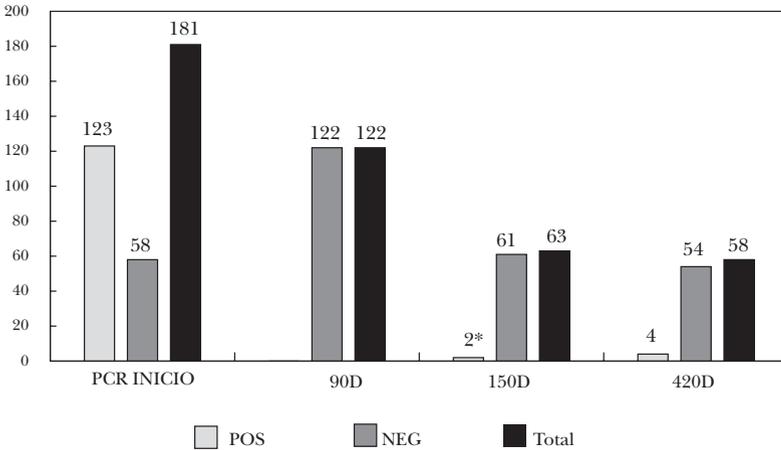
Britto et ál. 1993). Nuestros pacientes son principalmente de Bolivia (97,2% de casos de la población del estudio) en los que, debido al subtipo de parásito que los infecta, la PCR presenta una alta sensibilidad (Wincker et ál. 1994a; Wincker et ál. 1994b; Ávila et ál. 1993); por otro lado, teniendo en cuenta el rango-edad de nuestros pacientes, no es de extrañar que encontráramos diferentes grados de sensibilidad en la PCR en los distintos tramos de edad ($p = 0,0007$). Mientras que la sensibilidad de PCR frente a la serología fue del 100% en los jóvenes (0-19 años), esta pasó al 72% en los adultos (20-39 años) y al 48,9% en las personas mayores (≥ 40 años). Las técnicas serológicas convencionales no son eficaces para realizar un diagnóstico temprano en los casos de Chagas congénito, ya que la IgG anti *T. cruzi* en el recién nacido puede ser de origen materno y la detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi* no ofrece resultados del todo satisfactorios (Moya et ál. 1989; Freilij et ál. 1995; Blanco et ál. 2000). En nuestro estudio, de acuerdo con trabajos anteriores (Schijman et ál. 2003), la alta sensibilidad en la PCR encontrada el grupo de los jóvenes (100%) hace de esta una herramienta del laboratorio prometedora para diagnosticar y evaluar el tratamiento en las infecciones congénitas.

Además, el número de pacientes con un resultado de PCR positivo fue mayor entre los individuos recién llegados ($p = 0,0076$), debido, probablemente, al menor tiempo transcurrido entre la infección y la realización de la prueba. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados de PCR entre los pacientes en estadio crónico indeterminado y sintomático ($p = 0,4710$).

No queda claro si la detección de *T. cruzi* mediante PCR se debe a la amplificación del ADN de parásitos intactos o al procedente de la lisis de parásitos que se encuentran en las células infectadas (Tarleton et ál. 1999). No obstante, a diferencia de los resultados publicados en estudios previos (Solari et ál. 2001), nosotros detectamos una pronta conversión en los resultados de PCR como respuesta al tratamiento. Así, la PCR pasó a ser negativa en las muestras de todos los pacientes que fueron analizadas a los 90 días después del tratamiento (gráfico 5.6). Considerando que la actividad supresora del benznidazol contra la parasitemia es casi

inmediata después del inicio de tratamiento, de nuestros resultados se desprenden las claras ventajas del uso de la PCR como una técnica sensible y específica para la detección temprana de la susceptibilidad del parásito al benznidazol, permitiendo la modificación de la terapia temprana en los casos de resistencia o reactivación de infección.

GRÁFICO 5.6: Seguimiento mediante PCR de los pacientes con enfermedad de Chagas tratados con benznidazol



* Un paciente que no siguió las pautas del tratamiento y otro con un resultado de PCR negativo antes del tratamiento y al final del seguimiento pero positivo en el control de 150 días. En ambos casos el resultado de PCR a los 90 días del postratamiento fue negativo. POS: resultado de PCR positivo, NEG: resultado de PCR negativo, D: días postratamiento.

El tratamiento específico se ha recomendado durante la fase aguda de la infección y, recientemente, para todos los pacientes con la enfermedad de Chagas (Viotti et ál. 2006). No obstante, la valoración de la cura en la infección crónica es compleja, debido principalmente a la falta de pruebas fiables para asegurar la eliminación del parásito. La alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la infección de *T. cruzi* mediante PCR encontradas en nuestro estudio sugieren que esta es una herramienta útil para el seguimiento de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica tratados con benznidazol.

La eficacia del benznidazol en eliminar el parásito durante la fase crónica de la enfermedad no está clara (Pérez-Molina et ál. 2009). Sin embargo, existen pocos estudios orientados a evaluar la respuesta al tratamiento mediante PCR en los casos crónicos, y las pocas investigaciones realizadas se han llevado a cabo en América Latina, algunas de ellas en áreas muy endémicas donde la transmisión activa ocurre continuamente (Britto et ál. 2009).

Según nuestros resultados el 100% de los pacientes tratados tenía un resultado de PCR negativo a los 90 después del tratamiento, lo que refleja la eficacia del benznidazol para la eliminación los parásitos circulantes. Esta alta de efectividad terapéutica, evaluada mediante PCR, es mayor que la obtenida en publicaciones anteriores. No obstante, debe recordarse que este es el primer estudio realizado en un país no endémico, donde la ausencia del vector descarta la posibilidad de reinfección durante el seguimiento. Solo el 6,9% de los pacientes tratados tuvieron un resultado de PCR positivo después de la quimioterapia. Sin embargo, este es un estudio a corto plazo y, teniendo en cuenta picos de parasitemia durante el largo transcurso de enfermedad de Chagas, sería de esperar que, entre los pacientes crónicos tratados que presentan un resultado de PCR negativo a los 420 días después del tratamiento, algunos pasen a tener un resultado de PCR positivo durante un seguimiento a largo plazo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) ref.: RD06/0021/1007 y el Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS ref.: PS09/01956.

Bibliografía

- ANDRADE, S. G., L. A. FREITAS, S. PEYROL, A. R. PIMENTEL et ál. «Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice». *Bull World Health Organ* 69 (1991): 191-197.

- ÁVILA, H. A., D. S. SIGMAN, L. M. COHEN et ál. «Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease». *Mol Biochem Parasitol* 48 (1991): 211-221.
- ÁVILA, H. A. et ál. «Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis». *J. Clin Microbiol* 31 (1993): 2421-2426.
- BLANCO, S. B. et ál. «Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina». *Trop Med Int Health* 5 (2000): 293-301.
- BOE: *Boletín Oficial del Estado, Ministerio de Sanidad y Consumo*. Real decreto 1088/2005 por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. Madrid, (2005): 31288-31304.
- BRENER, Z. «Biology of *Trypanosoma cruzi*». *Annu rev Microbiol*. 27 (1973): 347-382.
- BRITTO, C. et ál. «A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease». *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88 (1993): 171-172.
- BRITTO, C. et ál. «Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation». *Parasitology* 110 (1995): 241-247.
- BRITTO, C. C. «Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations». *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (2009): 122-135.
- CARRILERO, B., J. J. QUESADA, S. ALFAYATE, y M. SEGOVIA. «Congenital Chagas disease in a newborn of a Bolivian mother» [in Spanish]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. (2009). DOI:10.1016/j.eimc.2009.01.004. En prensa 2009.
- CENTRO REGIONAL DE ESTADÍSTICA: <http://www.carm.es/econet> (consulta en 2008).
- CHAGAS, C. «Nova Tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem». *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1 (1909): 1-80.
- FREILIJ, H., y J. ALTCHER. «Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects». *Clin Infect Dis* 21 (1995): 551-555.
- GASCÓN, J. «Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas importada». *Med Clin*. 125 (2005): 230-235.
- GASCÓN, J., C. BERN, y M. J. PINAZO. «Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries». *Acta Trop*. DOI:10.1016/j.actatropica.2009.07.019. En prensa 2009.
- GASCÓN, J. et ál. «Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica». *Rev Esp Cardiol*. 60 (2007): 285-293.
- HARRISON. *Principios de Medicina Interna. Enfermedades infecciosas. Infecciones por protozoarios. Tripanosomosis*. 17.ª edición Parte 7. Sección 18. Capítulo 206.
- INE: Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.es/prensa/np551.pdf> (consulta en 2009).
- JANNIN, J., y L. VILLA. «An overview of Chagas disease treatment». *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102 (2007).

- MOYA, P., E. MORETTI, R. PAOLASSO et ál. «Neonatal Chagas disease: laboratory diagnosis during the first year of life» [in Spanish]. *Medicina (B Aires)* 49 (1989): 595-599.
- MUÑOZ, J., M. PORTÚS, M. CORACHAN, V. FUMADO, y J. GASCÓN. «Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area». *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101 (2007): 1161-1162.
- MURCIA, L., B. CARRILERO, M. J. MUÑOZ, M. A. IBORRA, y M. SEGOVIA. «Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country». *J. Antimicrob Chemother.* 65 (2010): 1759-1764.
- OMS: Organización Mundial de la Salud, Technical Reports Series 905 (2002): 1-109.
- OMS: Organización Mundial de la Salud, Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/09. Buenos Aires (2005).
- PÉREZ DE PEDRO, I. et ál. «Enfermedad de Chagas transfusional». *Enfermedades Emergentes* 10 (2008): 42.
- PÉREZ-MOLINA, J. A., A. PÉREZ-AYALA, S. MORENO et ál. «Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis». *J Antimicrob Chemother* 64 (2009): 1139-1147.
- PRATA, A. «Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease». *The Lancet Infect Dis.* 1 (2001): 92-100.
- REZENDE, J. «Diagnóstico de las manifestaciones digestivas de la enfermedad de Chagas». *Enfermedades Emergentes* 9 (2007): 22-27.
- SALOMONE, O. «Miocardiopatía chagásica y trombosis: el principio y el final de una relación peligrosa». *Rev. Esp. Cardiol.* 56 (2003): 333-334.
- SCHIJMAN, A. G. et ál. «Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction». *J Antimicrob Chemother* 52 (2003): 441-449.
- SOLARI, A. et ál. «Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR». *J Antimicrob Chemother* 48 (2001): 515-519.
- TARLETON, R. L., y L. ZHANG. «Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?». *Parasitol Today* 15 (1999): 94-99.
- ÚRBINA, J. «Nuevos avances en el desarrollo del tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas». *Reunión del Grupo Científico de Trabajo sobre Enfermedad de Chagas del Programa de Investigación y Docencia en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud/Oficina Panamericana de la Salud, Buenos Aires, Argentina, (2005): 165-177.*
- VIOTTI, R. et ál. «A Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial». *Ann Intern Med* 144 (2006): 724-734.
- WINCKER, P. et ál. «Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area». *Am J Trop Med Hyg* 51 (1994): 771-777.
- WINCKER, P. et ál. «High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area». *FEMS Microbiol Lett* 124 (1994): 419-423.

6. Respuesta celular CD8⁺ frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*

Manuel Carlos López López¹, Concepción Marañón Lizana¹,
Adriana Egui Machado¹, Concepción Judith Puerta Bula²
y María del Carmen Thomas Carazo¹

¹ Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España)

² Laboratorio de Parasitología Molecular, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana (Colombia)

6.1. Introducción

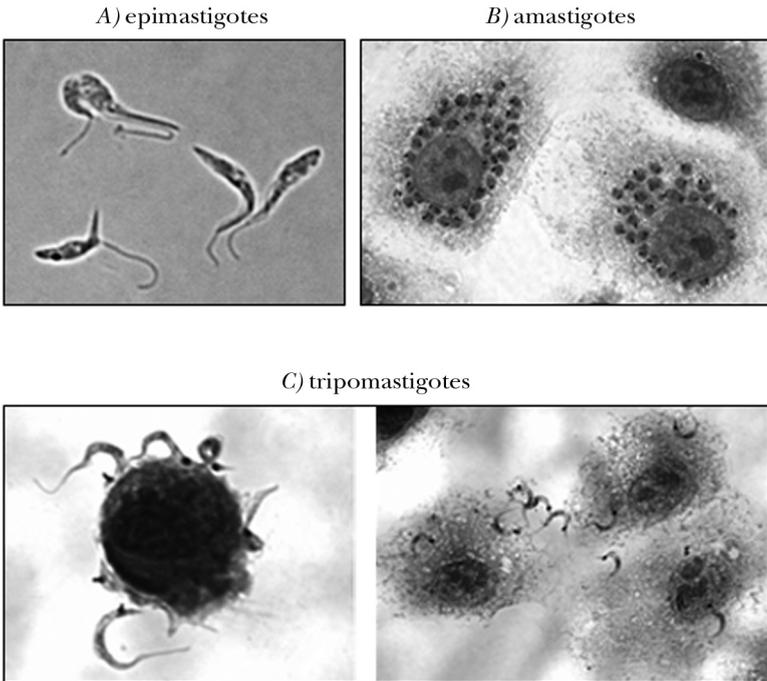
Trypanosoma cruzi es el protozoo parásito causante de la enfermedad de Chagas. Esta patología, endémica del continente americano, afecta con elevados índices de morbilidad y mortalidad a más de 8 millones de personas. *T. cruzi* muestra una alta heterogeneidad entre cepas y aislados y, principalmente, se transmite al hospedador mamífero por una amplia variedad de insectos hematófagos cuyo hábitat es Centro y Sudamérica. Sin embargo, recientemente se ha descrito la existencia de ciclos activos de transmisión peridoméstica de *T. cruzi* en el sur de Estados Unidos (Texas) (Kjos et ál. 2009). Por otra parte, el intenso flujo migratorio de personas que viven en zonas endémicas hacia el medio urbano y a países no endémicos han hecho de la enfermedad de Chagas una patología global. A pesar de ello, la enfermedad de Chagas sigue estando ampliamente desatendida. En las zonas no endémicas la transmisión vertical, la transfusión sanguínea y el trasplante de órganos son las vías de contagio prevalentes.

T. cruzi pertenece a la familia *Trypanosomatidae* y tiene un complejo ciclo de vida con tres formas morfológicas y molecularmente diferentes: el epimastigote, forma replicativa presente en el tracto del insecto vector; el tripomastigote, forma flagelada no replicativa e infectiva para vertebrados incluido el humano, y la forma amastigote, replicativa e intracelular (figura 6.1).

La enfermedad de Chagas se inicia con una fase aguda que, en la mayoría de los casos, cursa con sintomatología inespecífica, lo

cual dificulta enormemente su detección. El tratamiento quimioterapéutico durante esta fase es muy efectivo, aunque los fármacos actualmente usados son muy tóxicos. En ausencia de tratamiento, la mayoría de las personas no controlan la infección, permitiendo la supervivencia del parásito y su replicación en los tejidos, acompañada de parasitemia intermitente. Así, las personas que quedan infectadas desarrollan una fase crónica asintomática (fase indeterminada), que compromete cerca del 40% de los casos serológicamente positivos y que comprende períodos entre 10 a 25 años. Esta fase indeterminada deriva, en un alto porcentaje, en una fase crónica sintomática, caracterizada principalmente por la existencia de alteraciones cardíacas y/o digestivas, a la cual se asocia altas tasas de morbilidad y mortalidad. A pesar de las controversias surgidas en las últimas décadas, actualmente se acepta que la base etiológica de la enfermedad de Chagas crónica es el daño causado por la persistencia tisular del parásito *T. cruzi*.

FIGURA 6.1: Formas diferenciadas del parásito *T. cruzi* correspondientes a los diferentes estadios de su ciclo de vida



6.2. Inmunopatología de la enfermedad de Chagas

La respuesta inmune inducida por la infección por *T. cruzi* se caracteriza en su etapa inicial por una respuesta innata basada en la activación de células *natural killer* (NK) y *natural killer T* (NKT), así como la activación de células dendríticas, neutrófilos y macrófagos. A esta respuesta la sigue la activación de linfocitos T CD4⁺, los cuales tienen un papel crucial en el control de replicación del parásito promoviendo la activación y proliferación de linfocitos T CD8⁺ y linfocitos B (Tarleton 2007). Esta compleja respuesta se desarrolla en distintos compartimentos del sistema inmune, y se caracteriza principalmente por la expansión o proliferación celular, producción de citocinas e inducción de mecanismos de muerte celular (De Meis et ál. 2009). Como consecuencia de la respuesta desencadenada, el parásito pasa a ser combatido continuamente y su multiplicación en los tejidos del hospedador vertebrado es reducida. Sin embargo, el parásito es capaz de persistir indefinidamente en el hospedador, dado que puede contrarrestar las presiones selectivas generadas por los efectores celulares y humorales producto de la respuesta inmune desencadenada. Así, tanto la diversidad genética de *T. cruzi*, representada en diferencias en virulencia y tropismo tisular, como la mayor o menor capacidad de respuesta inmune del hospedador, resultan determinantes en el curso de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. En este sentido se ha descrito la asociación entre carga parasitaria, severidad de la enfermedad y una insuficiente respuesta inmune del hospedador.

Dado que los amastigotes de *T. cruzi* se replican intracelularmente, la inmunidad celular y, en particular, la mediada por los linfocitos T CD8⁺ son un componente indispensable en la respuesta inmune frente al parásito. En modelos de infección experimental en ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ desempeñan un papel esencial en la resistencia a *T. cruzi*. Así, se ha puesto en evidencia: *a)* el predominio de estas células en infiltrados inflamatorios de tejidos parasitados; *b)* la capacidad de linfocitos T CD8⁺ de ratones infectados para actuar como linfocitos T citotóxicos (CTL) contra células infectadas con el

parásito; *c*) el incremento en la carga parasitaria en los tejidos en la ausencia de respuesta inflamatoria, y *d*) la incapacidad de ratones sometidos a depleción de linfocitos T CD8⁺ para sobrevivir a la fase aguda de la infección (Martin, y Tarleton 2004). Los linfocitos T CD8⁺, además de su función citotóxica, poseen la capacidad de producir diferentes tipos de citocinas, polarizándose hacia perfiles Tc1/Tc2, en respuesta a la estimulación antigénica. Numerosos estudios sugieren que el papel protector de estas células T CD8⁺ en la enfermedad de Chagas reside tanto en su actividad citotóxica como en la secreción de citocinas tipo Th1/Tc1, especialmente de IL-12, IFN γ y TNF α (Martin, y Tarleton 2004; Tarleton 2007). Recientes resultados muestran que IL-17 controla la diferenciación de células Th1 en ratones infectados. Así, la neutralización de IL-17 da lugar a un incremento en la producción de IL-12, IFN γ y TNF α (Da Matta et ál. 2010). Asimismo, se ha descrito que las formas tripomastigotas inducen la producción de IL-17 por células NK y células T (CD4⁺ y CD8⁺) de ratones naive, observándose un incremento de células expresando IL-17 durante la fase aguda de la infección.

El análisis de la respuesta celular frente a extractos de proteínas totales de *T. cruzi* en enfermos de Chagas muestra la existencia de un alto número de respondedores en el grupo de pacientes de Chagas en fase crónica con clínica leve *versus* aquellos con clínica grave. Interesantemente, estos resultados sugieren que el nivel de células T productoras de IFN γ está inversamente asociado con el estado clínico del paciente. Así, una mayor severidad clínica ha sido observada en pacientes con una baja frecuencia de células T CD8⁺ específicas de *T. cruzi* productoras de IFN γ , en relación con pacientes asintomáticos. Estas diferencias son principalmente asociadas a un incremento en la frecuencia de diferenciación a células T CD8⁺ de memoria (CD27/CD28/CD45RA₋), con evidencias de agotamiento clonal, asociadas a un aumento de apoptosis en la población de células T CD4⁺ periféricas, en aquellos sujetos con infección de *T. cruzi* crónica severa (Albareda et ál. 2009). Asimismo, se han observado diferencias en la capacidad de producción de citocinas tales como TNF α e IL10 por parte de los linfocitos T y monocitos en pacientes que se encuentran en la fase severa con respecto a la fase leve de la

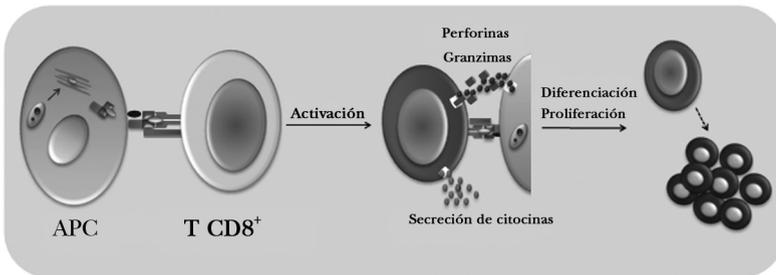
enfermedad (Dutra et ál. 2005). Igualmente, aunque la proporción de linfocitos T CD8⁺ circulantes de memoria (central y efectora) es mayor en los enfermos de Chagas con patología cardíaca avanzada que en pacientes asintomáticos, estos producen menos IFN γ en respuesta a epítomos parasitarios (Albareda et ál. 2006). Estos resultados son compatibles con la activación panclonal de los linfocitos T seguida de un estado de anergia, caracterizada ampliamente en la infección experimental, lo que probablemente sea un reflejo de un fenómeno de senescencia inmune similar al observado en otras patologías infecciosas crónicas, aunque esta última hipótesis no ha sido demostrada.

Durante la fase indeterminada de la enfermedad se establece un balance entre la respuesta inmune del hospedador y el parásito, donde tanto la respuesta inmune humoral como celular frente a antígenos del parásito juegan un papel importante. Sin embargo, este equilibrio es sumamente frágil, y puede perderse, permitiendo la proliferación parasitaria en los tejidos y generando las patologías de la fase crónica. Se postula que en la fase tardía de la infección, una vez que la carga parasitaria se encuentra controlada, la mayoría de los linfocitos T CD8⁺ específicos del parásito exponen un fenotipo efector o efector-memoria, es decir, un patrón de células bien diferenciadas generadas por una estimulación antigénica sostenida. Asimismo, se ha descrito que tras el tratamiento antiparasitario ocurre la aparición de un fenotipo «memoria central», que da lugar a una mejor respuesta protectora frente a una segunda infección. Sin embargo, y a pesar de los significativos avances ocurridos en este campo, la dinámica del sistema inmune frente a la infección natural en el hombre sigue siendo en gran parte desconocida. Es por ello que la identificación de patrones de respuesta inmunológica frente a moléculas específicas del parásito que puedan ser usadas como marcadores celulares de grado y pronóstico de la enfermedad de Chagas y evolución de la misma en el postratamiento sigue siendo un reto actual. En este sentido, los modelos de infección experimental han permitido determinar respuestas T CD8⁺ frente a diversos antígenos parasitarios, aunque solo algunos de estos han mostrado ser reconocidos por enfermos de Chagas.

6.3. Identificación de epítopes CD8⁺ contenidos en antígenos de *T. cruzi*

La activación de los linfocitos T CD8⁺ en la patología chagásica se produce tras el reconocimiento de péptidos antigénicos de 9 a 10 aminoácidos derivados de proteínas parasitarias, que serán presentados al receptor del antígeno (TcR) de los linfocitos T CD8⁺ por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I en el ratón o HLA-I en el hombre) presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno (figura 6.2). Estas moléculas son altamente polimórficas, y dicho polimorfismo afecta sobre todo al bolsillo de unión al péptido antigénico, de tal forma que la expresión de diferentes moléculas HLA condiciona los epítomos que pueden ser presentados a los linfocitos T CD8⁺. En este sentido, son muchos los parámetros implicados en la inducción de respuesta de células T CD8⁺ por parte de proteínas del parásito: la naturaleza del alelo, la eficiencia del procesamiento del epítomo, la translocación del mismo dentro del retículo endoplasmático, su afinidad al TcR del linfocito T, así como el grado de variabilidad de su secuencia (Álvarez et ál. 2008). De esta manera, la identificación y análisis de epítomos específicos del parásito que sean capaces de inducir una respuesta de linfocitos T CD8⁺ de potencial capacidad protectora serán de gran relevancia.

FIGURA 6.2: Activación y funciones efectoras de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos de *T. cruzi*



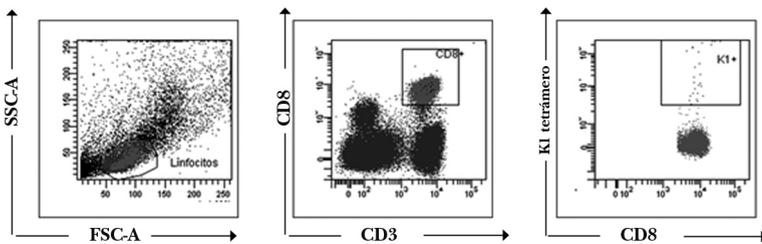
Nota: El reconocimiento por parte del TcR de linfocitos CD8⁺ específicos de epítomos del parásito, presentes en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC), da lugar a la activación y proliferación de los mismos, producción y secreción de citocinas y/o de proteínas citotóxicas tales como perforinas y granzimas que originan la lisis de la célula infectada.

Los ratones transgénicos C57BL/6-A2/K^b expresan los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la molécula humana HLA-A*0201, y los dominios $\alpha 3$ y de transmembrana de la molécula murina H2-K^b. De esta forma, se obtiene una interacción óptima de la molécula presentadora con las moléculas murinas CD8⁺ y $\beta 2$ -microglobulina, al mismo tiempo que el bolsillo de unión a péptidos es idéntico al humano. Con este modelo, tras inmunización o infección, se obtienen repertorios T frente a epítomos restringidos al HLA-A*0201 casi totalmente solapantes a los observados en el hombre en condiciones equivalentes, lo cual le confiere una especial relevancia. Asimismo, la molécula HLA-A*0201 se expresa en aproximadamente un 50% de la población mundial; por ello, la determinación de epítomos restringidos a la misma es de gran interés. Así, la inmunización de ratones transgénicos C57BL6-A2/K^b con la proteína de fusión KMP11-HSP70 nos ha permitido identificar la existencia de un epítomo críptico, así como de un epítomo inmunodominante (K1) localizado en el extremo amino-terminal 4-12 de la proteína KMP11, y restringido a la molécula presentadora de clase I HLA-A*0201 (Marañón et ál. 2001). KMP11 es específica de tripanosomátidos, se localiza asociada al citoesqueleto del parásito (Thomas et ál. 2000) y contiene un determinante antigénico lineal, situado en el extremo carboxilo de la proteína, el cual es reconocido con alta especificidad y sensibilidad por sueros de pacientes de Chagas en fase crónica (Thomas et ál. 2001). Igualmente, otros grupos de investigación han empleado similares sistemas de infección experimental para identificar epítomos restringidos a la molécula HLA-A*0201 en antígenos como las transialidasas o las proteínas de la superficie de amastigotes (ASP). Las transialidasas son una familia de antígenos con más de mil miembros en el genoma de *T. cruzi*. En el ratón, estas proteínas tienen un carácter altamente inmunodominante y son expresadas simultáneamente durante y tras la invasión de la célula hospedera. Se postula que la competición de esta enorme serie de péptidos puede conducir a una estimulación ineficiente de las células T CD8⁺, lo que da lugar a una activación retrasada y subóptima (Tarleton 2007).

En estrecha colaboración con el grupo de la doctora C. Puerta, de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá (Colombia), nuestros esfuerzos se han enfocado hacia el estudio de la respuesta inmune celular frente a diversos antígenos del parásito, con un

especial énfasis en aquellos específicos de tripanosomátidos. Entre ellos, la proteína KMP11, y en particular el péptido K1, son los que hasta la fecha nos han reportado resultados más prometedores. Así, se ha puesto en evidencia la capacidad del péptido K1 para estimular linfocitos T CD8⁺ de individuos infectados por el parásito *T. cruzi* e inducir la secreción de IFN γ , citocina involucrada en protección en modelos murinos. Para ello, se analizaron los linfocitos T CD8⁺ de 22 individuos colombianos HLA-A*0201⁺, 12 de los cuales eran pacientes chagásicos crónicos y 10 individuos sanos. Los resultados mostraron que dos pacientes chagásicos presentaron células T CD8⁺ secretoras de IFN γ en respuesta al péptido K1 con frecuencias relativas de 110 y 230 células por millón. Por el contrario, ninguno de los controles sanos respondió al péptido K1. Adicionalmente, ensayos de citometría de flujo para determinar desgranulación mostraron que los enfermos de Chagas respondedores a K1 presentan función citotóxica. Estos resultados demuestran que el péptido K1 es eficientemente procesado y presentado en el HLA de clase I y reconocido por linfocitos T CD8⁺ en el curso natural de la enfermedad de Chagas (Díez et ál., 2006). Con el fin de determinar de forma más precisa la frecuencia *ex vivo* de estas células T CD8⁺ específicas del péptido K1, se realizaron ensayos de unión a tetrámeros solubles fluorescentes cargados con el mencionado péptido. De esta manera se determinó que 15 de 19 pacientes colombianos infectados por el parásito tenían linfocitos T CD8⁺ específicos del péptido K1 con frecuencias de 0,09 a 0,34% (Lasso et ál. 2010) (figura 6.3).

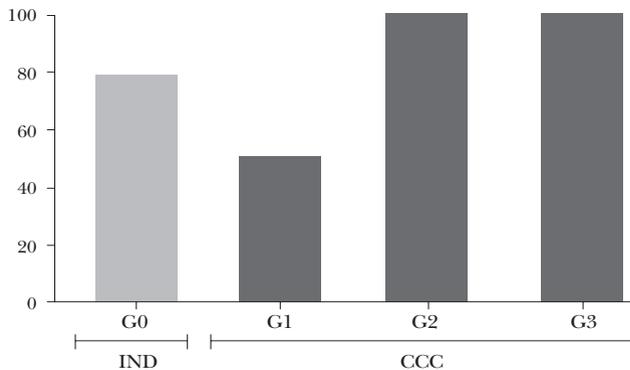
FIGURA 6.3: Detección de linfocitos T CD8⁺ específicos del péptido K1 en enfermos colombianos de Chagas



Nota: Dot plot obtenidos mediante citometría de flujo de la población de células CD3⁺/CD8⁺ presentes en un paciente de Chagas (panel central), así como de aquellas células CD8⁺ específicas para el péptido K1 (panel derecho), usando para ello un tetrámero HLA-A*0201 K1 fluorescente.

Por otra parte, no se encontraron diferencias en el porcentaje de individuos que reconocen el péptido K1 entre los pacientes crónicos indeterminados o asintomáticos (8/9) y los crónicos con sintomatología cardíaca (8/10), así como tampoco entre los pacientes con distintos grados de severidad de la cardiomiopatía chagásica, clasificada según los grados establecidos por Kuschmir en G1 a G3 (gráfico 6.1). Por otra parte, llamativamente se encontró que, mientras que la mayoría de los pacientes que reconocieron el péptido K1 portaban el subtipo HLA-A*0201, cinco de ellos portaban alelos A*02 diferentes al subtipo *0201. Así, estos pacientes se correspondían con los haplotipos A*0205, A*0222, A*0226, A*0259 y A*0287, indicando que el péptido K1 es un epítipo promiscuo que puede ser presentado en el contexto de diferentes moléculas del HLA-A*02. Interesantemente, análisis fenotípicos y de funcionalidad de las células T CD8⁺ específicas del péptido K1 mostraron que estas tienen un fenotipo predominante de memoria efectora (CCR7-, CD62L-) y son capaces de secretar las citocinas IL-2 e IFN γ y/o secreción de perforina, molécula involucrada en la actividad citotóxica de las células T CD8⁺ (Lasso et ál. 2010). En su conjunto, estos resultados sugieren que el péptido K1 es un blanco atractivo para el desarrollo de inmunoterapias frente a la enfermedad de Chagas.

GRÁFICO 6.1: Porcentaje de pacientes de Chagas que reconocen el péptido K1, analizados en función del estadio de la fase crónica de la enfermedad



Nota: IND, enfermos de Chagas en fase indeterminada (n = 9); CCC, enfermos con cardiomiopatía chagásica con distintos grados de severidad, clasificada según los grados Kuschmir de G1 a G3 (n = 10).

Actualmente estamos estableciendo la inmunodominancia de otros antígenos parasitarios en pacientes en distinta fase de evolución de la enfermedad de Chagas, incluidos en una reciente cohorte de pacientes «Chagas importado» construida en estrecha colaboración con el grupo del doctor M. Segovia del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia (España). Inicialmente, mediante técnicas informáticas, se llevó a cabo, para las proteínas HSP70, PFR2, PFR3 y TcMa, la selección de péptidos que contienen motivos de unión a la molécula HLA-A*0201. La proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) está altamente conservada en su secuencia de aminoácidos y es un antígeno inmunodominante en un amplio número de patologías, incluyendo enfermedades infecciosas. Las proteínas PFR2 y PFR3, específicas de kinetoplastidos, forman parte de la estructura flagelar de los mismos. El antígeno TcMa, localizado en la membrana del parásito, es homólogo a las glicoproteínas TcCA-2, TCR39 y B13, las cuales contienen idénticos dominios repetidos de 12 aminoácidos, altamente inmunogénicos. Así, tras la síntesis química de los distintos péptidos seleccionados y contenidos en los mencionados antígenos a estudio, se determinó su afinidad por la mencionada molécula presentadora HLA-A*0201. Además, utilizando ratones transgénicos C57BL/6-A2/K^b, hemos identificado dos epítomos T CD8⁺ inmunodominantes contenidos en la proteína HSP70 (Marañón et ál. 2010, 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases —ECCMID [Viena]—, manuscrito en preparación), tres en las proteínas PFR2 y PFR3 (Thomas et ál. 2010, VII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional —SEM-TSI [Salamanca]—, manuscrito en preparación) y tres en la proteína TcMa (Egui et ál. 2010, 20th —ECCMID [Viena]—, manuscrito en preparación). Interesantemente, estudios por ELISPOT de secreción de granzima B, utilizando células mononucleares de sangre periférica de enfermos de Chagas incluidos en la cohorte «Chagas importado», nos han permitido determinar que todos los péptidos candidatos fueron reconocidos por estos pacientes confirmándose, por tanto, que son naturalmente procesados y presentados durante el curso de la enfermedad de Chagas. Asimismo, estudios preliminares del perfil de secreción

de diferentes citocinas (IL-2, IL-4, IL-8, IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-17, etc.) en respuesta a dichos epítomos muestran que los patrones de secreción de algunas de estas citocinas varían según el grado de severidad de la enfermedad (datos de laboratorio).

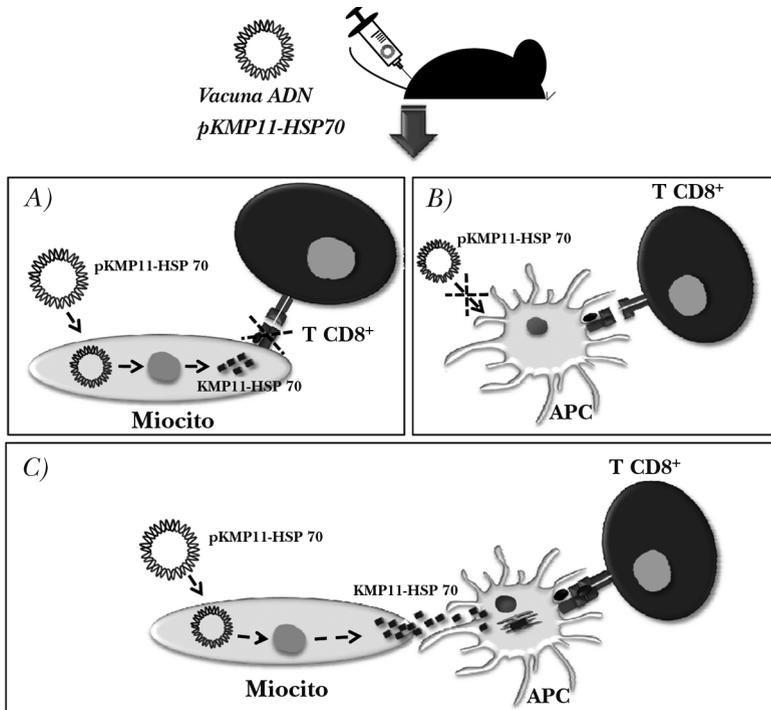
6.4. Inmunoterapia frente a la enfermedad de Chagas

La actual quimioterapia frente a *T. cruzi*, dirigida principalmente a combatir la fase aguda de la enfermedad, es altamente tóxica y resulta relativamente ineficaz en la fase crónica de la enfermedad. Por esta razón, y a pesar de las dificultades que entraña el desarrollo de una vacuna, es probable que esta, en conjunción con otros sistemas terapéuticos y de control vectorial, sea la forma adecuada para combatir la infección por *T. cruzi*. Así, la inmunoterapia se postula como una herramienta fundamental para el control de la enfermedad de Chagas, debiendo ser esta capaz de inducir una respuesta inmune antígeno-específica tanto humoral como celular, orientada hacia una respuesta de perfil Th1/Tc1 (revisado en Cazorla et ál. 2009). Las vacunas de ADN parecen ser vehículos idóneos para inducir una adecuada respuesta inmune que posibilite el control total de la infección por *T. cruzi*. Así, estas moléculas conjugan la simplicidad de su manipulación, la cual permite la construcción de quimeras e introducción de secuencias codificantes para moléculas estimuladoras/moduladoras de la respuesta inmune, la ventaja de expresar *in situ* el antígeno clonado y la presencia de secuencias internas que modulen *per se* la respuesta inmune hacia un subtipo Th1/Tc1.

Ensayos del laboratorio nos han permitido determinar que la inoculación intramuscular, en ratones susceptibles a la infección por *T. cruzi*, con un vector de ADN que porta los genes KMP11 y HSP70 fusionados pero no con el gen KMP11 en forma aislada, induce una respuesta inmunológica que protege significativamente frente a la infección experimental tardía, realizada nueve semanas tras la última inmunización. Al analizar la respuesta inmune generada en los ratones protegidos, observamos la activación de

linfocitos T CD8⁺ citotóxicos específicos del antígeno KMP11, el incremento de la expresión de citocinas de tipo Th1 y la generación de anticuerpos de subtipo IgG2a frente a KMP11 (Planelles et ál. 2001). Dado que se ha descrito que los miocitos no son capaces de presentar antígenos a través de clase I (esquema 6.1A), y que parece improbable que la inoculación intramuscular facilite la entrada del vector ADN a células dendríticas (esquema 6.1B), los resultados obtenidos sugieren que la proteína de fusión KMP11-HSP70 sería expresada por los miocitos y posteriormente transferida a las células presentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas, para integrar las vías de presentación cruzada (esquema 6.1C). En este contexto, se ha puesto en evidencia que la proteína HSP70 de *T. cruzi* sola y fusionada a la KMP11 induce la maduración de células dendríticas murinas. Estas células dendríticas maduras presentan un aumento en la expresión de las citocinas IL12, TNF α , de las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 y de los marcadores de activación CD25 y CD40, mostrando un claro incremento en la capacidad aloestimuladora de dichas células (Planelles et ál. 2002). Asimismo, se ha demostrado que la proteína HSP70 de *T. cruzi* madura igualmente células dendríticas humanas derivadas de células mononucleares de sangre periférica (Cuéllar et ál. 2008). Interesantemente, se observó una actividad funcional diferencial en las células dendríticas de enfermos de Chagas *versus* donadores sanos, maduras por la mencionada proteína HSP70 de *T. cruzi*. Igualmente hemos demostrado que esta capacidad de madurar células dendríticas reside en un polipéptido de 29 kDa correspondiente con la segunda mitad-amino de la proteína HSP70, lo cual incrementa la posibilidad de utilizar esta proteína de choque térmico como vehículo para desarrollar inmunoprolaxis basada en células dendríticas y terapias frente a agentes infecciosos.

ESQUEMA 6.1: Posibles vías de presentación del antígeno KMP11 a través del HLA de clase I, tras la inmunización intramuscular de ratones con una vacuna ADN que contiene los genes KMP11 y HSP70 fusionados



Nota: A) El ADN ingresa preferentemente en los miocitos, induciendo una alta expresión de la proteína KMP11. Sin embargo, estas células no realizan la presentación del antígeno. B) La entrada del vector de ADN en las células dendríticas es poco probable y conduciría a una presentación antigénica pobre. C) Las células dendríticas adquieren el antígeno expresado por el miocito y lo procesan, mediante la vía de presentación cruzada para estimular linfocitos T CD8⁺ específicos de KMP11.

La HSP70 de diversos organismos, eucariotas y procariontas ha mostrado ser muy efectiva para potenciar la respuesta inmune frente a la proteína antigénica a la que se encuentre acoplada. Así, existen numerosos estudios que muestran el papel adyuvante de la HSP70 como inductor de una respuesta inmune humoral y de linfocitos T citotóxicos específica del antígeno al que se fusiona, observándose que la activación de las células T citotóxicas ejercida por la HSP70 es independiente de la activación de células CD4⁺ (Huang et ál. 2000). Sin embargo, no todas las proteínas HSP70 (HSPs-70)

ejercen tal capacidad adyuvante, de igual forma. Ensayos de inmunización, sobre ratones C57BL/6 (*wild type*) y transgénicos *knockout* para los receptores TLR2 y TLR4, con las proteínas HSP70 de *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum* y *Mycobacterium tuberculosis*, evidencian que únicamente la proteína HSP70 de *T. cruzi* favorece la inducción de una respuesta mixta de anticuerpos (IgG1 e IgG2a), frente al hapteno OVA asociado, la cual, interesantemente, resulta ser independiente de los receptores TLR2 y TLR4 (Qazi et ál. 2007). Resultados recientes del laboratorio han mostrado que la inmunización de ratones con los vectores que contienen los genes PFR2 de *T. cruzi* o los genes PFR2-HSP70 fusionados inducen un alto nivel de anticuerpos específicos de isotipo IgG2a frente a los antígenos PFR. Sin embargo, solo la inmunización con el plásmido que porta los genes PFR2-HSP70 fusionados induce una clara respuesta celular Th1, observándose en células de bazo un significativo aumento de la expresión de las citocinas IL-2, IL12, TNF α e IFN γ , así como un descenso en el porcentaje de células que expresan IL4. De igual manera, la inmunización con los mencionados genes PFR2-HSP70 induce una fuerte activación de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno PFR2. Asimismo, se ha demostrado que la inmunización con este gen quimérico PFR2-HSP70 estimula una respuesta protectora frente al daño miocárdico crónico causado por la infección experimental con *T. cruzi* (Morell et ál. 2006).

6.5. Conclusiones

En resumen, los resultados reportados hasta el momento aportan una relevante información sobre el papel que los linfocitos T CD8⁺ juegan en el control de la infección experimental por *T. cruzi*. Sin embargo, el establecimiento de herramientas que permitan estudiar la dinámica de la respuesta antiparasitaria durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas es un tema sin resolver. Por otra parte, dada la particular localización del parásito en diversos tejidos, y la baja eficacia de las actuales estrategias quimioterapéuticas en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, estimamos que la utilización combinada de quimioterapia e inmunoterapia podría ser crucial para inducir el aclaramiento total de *T. cruzi* y, por tanto, el control de la infección.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos de Investigación de Excelencia Ref: P06-CTS-02242 y P08-CVI-04037 del Plan Andaluz de Investigación (Junta de Andalucía-España); Red de Investigación Colaborativa en Medicina Tropical, Ref. RD06/0021/0014-ISCI-RETIC (MICINN-España); Proyectos de Investigación número 1203-333-18692 (Colciencias-Colombia) y número 00000784 (Pontificia Universidad Javeriana, Colombia).

Bibliografía

- ALBAREDA, M. C., S. A. LAUCELLA, M. G. ÁLVAREZ, H. ARMENTI, G. BERTOCHI, R. L. TARLETON, y M. POSTAN. «*Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8⁺ T Cells in chronic disease patient». *Int Immunol* 18 (3) (2006): 465-471.
- ALBAREDA, M. C., G. C. OLIVERA, S. A. LAUCELLA, M. G. ÁLVAREZ, E. R. FERNÁNDEZ, B. LOCOCO, R. VIOTTI, R. L. TARLETON, y M. POSTAN. «Chronic Human Infection with *Trypanosoma cruzi* Drives CD4⁺ T Cells to Immune Senescence». *J. Immunol* 183 (6) (2009): 4103-4108.
- ÁLVAREZ, M. G., M. POSTAN, D. B. WEATHERLY, M. C. ALBAREDA, J. SIDNEY, A. SETTE, C. OLIVERA, A. H. ARMENTI, R. L. TARLETON, y S. A. LAUCELLA. «HLA Class I-T Cell Epitopes from trans-Sialidase Proteins Reveal Functionally Distinct Subsets of CD8 T Cells in Chronic Chagas Disease». *PLoS Negl Trop Dis* 2 (9) (2008): e288.
- CAZORLA, S. I., F. M. FRANK, y E. L. MALCHIODI. «Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection». *Expert Rev Vaccines* 88 (7) (2009): 922-935.
- CUÉLLAR, A., S. P. SANTANDER, M. C. THOMAS, F. GUZMÁN, A. GÓMEZ, M. C. LÓPEZ, y C. PUERTA. «Monocyte-derived dendritic cells from chagasic patients versus healthy donors secrete differential levels of IL-10 and IL-12 when stimulated with a protein fragment of *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70». *Immunol Cell Biol* 86 (3) (2008): 255-260.
- DA MATTA GUEDES, P. M., F. R. GUTIÉRREZ, F. L. MAIA, C. M. MILANEZI, G. K. SILVA, W. R. PAVANELLI, y J. S. SILVA. «IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis». *PLoS Negl Trop Dis* 16;4 (2) (2010): e604.
- DÍEZ, H., M. C. LÓPEZ, M. C. THOMAS, F. GUZMÁN, F. ROSA, V. VEÑAZCO, J. M. GONZÁLEZ, y C. PUERTA. «Evaluation of IFN-gamma production by CD8⁺ T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*». *Parasite Immunol* 28 (3) (2006): 101-105. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol* 21 (2005): 581-587.
- HUANG, Q., J. F. RICHMOND, K. SUZUE, H. N. EISEN, y R. A. YOUNG. «In vivo cytotoxic T lymphocyte elicitation by mycobacterial heat shock protein 70 fusion proteins maps to a discrete domain is CD4(+) T cell independent». *J Exp Med* 191 (2000): 403-8.

- MEIS, J. DE, A. MORROT, D. A. FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. M. VILLA-VERDE, y W. SAVINO. «Differential regional immune response in Chagas disease». *PLoS Negl Trop Dis* 3 (7) (2009): e417.
- KJOS, S.A., J. J. GILLESPIE, J. K. OLSON, y K. F. SNOWDEN. «Detection of Blastocystidia spp. (Kinetoplastida: *Trypanosomatidae*) in Chagas disease vectors from Texas, USA». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9 (2009): 213-216.
- LASSO, P., D. et ál. «Frequency of specific CD8⁺ T cells for a promiscuous epitope derived from *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chagasic patients». *Parasite Immunol* (2010). En prensa.
- MARAÑÓN, C., M. C. THOMAS, L. PLANELLES, y M.C. LÓPEZ. «The immunization of A2/K(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T. cruzi* KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes». *Mol Immunol* 38 (4) (2001): 279-287.
- MARTIN, D., y R. TARLETON. «Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection». *Immunol Rev* 201 (2004): 304-317.
- MORELL, M., M. C. THOMAS, T. CABALLERO, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection». *Vaccine* 24 (2006): 7046-7055.
- PLANELLES, L., M. C. THOMAS, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection». *Infect Immun* 69 (10) (2001): 6558-6563.
- PLANELLES, L., M. C. THOMAS, M. PULGAR, C. MARAÑÓN, S. GRABBE, y M. C. LÓPEZ. «The *T. cruzi* heat shock protein-70 kDa alone or fused to parasite KMP11 antigen induces functional maturation of mouse dendritic cells». *Immunol Cell Biol* 80 (3) (2002): 241-247.
- QAZI, K. R., W. OEHLMANN, M. SINGH, M. C. LÓPEZ, y C. FERNÁNDEZ. «Microbial Heat Shock Protein 70 stimulatory properties have different TLR requirements». *Vaccine* 25 (6) (2007): 1096-1103.
- TARLETON, R. L. «Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*». *Curr Opin Immunol* 19 (4) (2007): 430-434.
- THOMAS, M. C., J. L. GARCÍA-PÉREZ, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level». *DNA Cell Biol* 19 (1) (2000): 47-57.
- THOMAS, M. C., M. V. LONGOBARDO, E. CARMELO, C. MARAÑÓN, L. PLANELLES, M. E. PATARROYO, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera». *Clin Exp Immunol* 123 (3) (2001): 465-471.

7. Microepidemias de transmisión oral de la enfermedad de Chagas en Venezuela

Belkisyolé Alarcón de Noya^{1,3}, *Zoraida Díaz-Bello*¹,
Cecilia Colmenares^{1,3}, *Raiza Ruiz-Guevara*³,
*Reinaldo Zavala-Jaspe*¹ y *Óscar Noya González*^{2,3,4}

¹ Sección de Inmunología

² Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical

³ Cátedra de Parasitología, Escuela Luis Razetti
Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela

⁴ Centro para Estudios sobre Malaria, IAES, INHRR, MPPS (Venezuela)

7.1. Introducción

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas (ECh) causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* es una entidad exclusiva, en su forma vectorial, del continente americano, extendiéndose en 21 países, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado en 16 millones el número de personas afectadas y en 18 millones las expuestas al riesgo. El comité sobre la ECh de la OMS en su reunión de abril 2005 en Argentina emitió un informe en el cual expone un descenso de la incidencia de la ECh al comparar cifras de 1990 y 2006 (WHO 2009). El estimado de la población bajo riesgo en América pasó de 100 millones en 1990 a 28 millones en 2006, los infectados de 30 a 15 millones y las muertes anuales de más de 45.000 en 1990 a 12.500 muertes en 2006, estimando asimismo que la incidencia pasaría de 700.000 a 41.200 en 2006. Esta visión optimista se ve afectada por el progresivo aumento de reporte de casos en la cuenca amazónica (Pinto et ál. 2008) y por la detección de personas infectadas entre los inmigrantes latinoamericanos llegados a Europa (Schmunis 2007). Se avizora un repunte de la ECh relacionado con otros mecanismos de infección, hasta ahora subestimados, de modo que términos tales como *Chagas importado*, *Chagas de transmisión oral* y *Chagas urbano* son usados cada vez con mayor frecuencia.

7.2. Modalidades de la transmisión de *T. cruzi*

- *Vectorial*: cuando el triatomino infectado pica a un hospedador vertebrado, se estimula el reflejo de defecación y los tripomastigotes metacíclicos contenidos en sus heces penetran la piel o las mucosas. Los sitios de penetración en la piel o la conjuntiva ocular son los lugares de multiplicación inicial del parásito produciendo una reacción inflamatoria con manifestaciones clínicas en la puerta de entrada como el Chagoma de inoculación o el signo de Romaña, respectivamente, antes de que el parásito viaje por vía sanguínea a los órganos blancos.
- *Transfusional o trasplante*: los tripomastigotes en sangre periférica bien en fase aguda cuando son más numerosos o muy escasos en fase crónica pueden ser transfundidos con la sangre o sus productos. La presencia de amastigotes en órganos de un donante con ECh constituye un riesgo de infección para el receptor quien, además, se encuentra inmunosuprimido al ser transplantado.
- *Congénito*: de la misma manera que los tripomastigotes pueden atravesar las mucosas, también pueden atravesar el trofoblasto e infectar al feto; sin embargo, la frecuencia de la transmisión congénita parece variar de acuerdo con la región y en general se ubica alrededor de 5% (Torricio et ál. 2004).
- *Accidental*: la infección accidental no solo ocurre en personal de laboratorio por el manejo inadecuado de materiales o la falta de protección (campana, máscaras protectoras), durante el manejo de cepas o material biológico, sino también en personas que manipulan animales infectados como los cazadores, carniceros, médicos veterinarios y otros.
- *Oral*: en 1936 Mazza et ál. describieron la transmisión de la ECh por leche materna. Por otra parte, es probable que la transmisión oral de la ECh sea un mecanismo que contribuya a mantener el ciclo selvático en el cual los mamíferos ingieren vectores o pequeños reservorios infectados. Díaz-Ungría (1968) infectó experimentalmente por vía oral a

perros, monos y otros mamíferos a partir de heces de triatominos, de sangre infectada o de parásitos adicionados a alimentos.

7.3. Antecedentes de presencia de elementos del ciclo de transmisión de *T. cruzi* en ecosistemas urbanos en Venezuela

El hallazgo de triatominos en Caracas se remonta a 1920 (Quintini, 1920). Pinto en 1949 encuentra *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus geniculatus* dentro de las viviendas en Petare, un barrio en Caracas, y Pifano (1986) declara 39% de *P. geniculatus* infectados con *T. cruzi* en viviendas del valle de Caracas, donde también observó la infección natural de *Didelphis marsupialis*, *Calluromys philander* y *Sciurus granatensis*. *Triatoma maculata* se ha encontrado colonizando viviendas en la ciudad de Maracaibo (Torres, 1982). La existencia de focos enzoóticos de *T. cruzi* en la urbe caraqueña en los cuales participa *P. geniculatus*, *Rattus rattus* y *D. marsupialis* han sido descritos por Herrera y Urdaneta-Morales (1997).

7.4. Transmisión oral de la enfermedad de Chagas en Venezuela

En Caracas, no solo se han descrito todos los elementos de la cadena epidemiológica de la transmisión de *T. cruzi* sino que además se tiene conocimiento de la transmisión del parásito al hombre. En los últimos 10 años han ocurrido tres muertes infantiles por ECh en fase aguda, dos de ellos procedentes de la periferia de la ciudad y el tercero ocurrido durante la microepidemia de ECh agudo en una escuela en el noreste de la ciudad (Alarcón de Noya et ál. 2009).

En diciembre de 2007 se detecta un grupo numeroso de personas con ECh (niños y adultos) en una escuela ubicada en un área de clase media de la ciudad. De 1.000 personas examinadas desde el punto de vista parasitológico, serológico y clínico, la tasa de infección fue de 10,3%, observándose una letalidad inferior

al 1%. Este ha sido el primer episodio urbano con mayor número de personas afectadas reportado hasta la fecha, donde el agente causal provino de la misma ciudad. El estudio epidemiológico demostró asociación estadísticamente significativa entre la infección por *T. cruzi* y la toma del desayuno en la escuela. La persona responsable de la elaboración de los jugos naturales distribuidos en el desayuno, quien resultó con altos títulos de IgG e IgM anti *T. cruzi* (Alarcón de Noya et ál. 2010), relató la preparación de las bebidas destacándose la del jugo de guayabas, las cuales eran cocinadas la noche previa a su preparación. En la vivienda y el peridomicilio de esta última persona, ubicada al pie de la montaña El Ávila, se detectó la presencia de *T. cruzi* en el vector *P. geniculatus*, así como roedores y animales domésticos también infectados.

En mayo de 2008 se diagnostica un brote de ECh aguda en una familia procedente de un barrio también ubicado al pie de la montaña. La simultaneidad de los síntomas en los tres integrantes de la familia en quienes se demostró parasitemia hace pensar en contaminación de los alimentos por triatominos encontrados en la vivienda (Alarcón de Noya et ál. 2009).

Otro episodio de transmisión oral ocurrió en Venezuela en abril de 2009. La muerte de un escolar y la simultaneidad de fiebre alta en varios pobladores de un pequeño pueblo, en el litoral central del país, recordó a los epidemiólogos el suceso de la escuela en 2007 (Alarcón de Noya y Martínez, 2009). En esta ocasión los afectados fueron 88 y la mortalidad ascendió a 4, entre ellos una embarazada. A pesar de que se tomó muestras para serología a la mitad de los habitantes del lugar, la infección por *T. cruzi* en fase aguda pareciera haber afectado solo a integrantes de la comunidad educativa. *P. geniculatus* es el vector nuevamente incriminado, el cual es conocido por los habitantes del sector.

Los episodios escolares de transmisión oral de ECh fueron motivo de una gran cobertura mediática: la primera por ocurrir en una escuela de la capital del país afectando a numerosos niños de clase media; la segunda, por afectar también a una escuela, con mayor mortalidad, en una zona de alto turismo. En ambos casos se atribuyó al diagnóstico a otras entidades y los pacientes, algunos con síndrome febril prolongado y/o con derrame pericárdico, no tuvieron diagnóstico del agente causal por al menos tres semanas.

7.5. Impacto ecológico y clínico de la transmisión de la enfermedad de Chagas en la ciudad de Caracas

Tradicionalmente la ECh se ha considerado como una patología eminentemente rural y, aunque son conocidos los otros mecanismos de infección, se asocia a la transmisión vectorial. De allí que su control se haya centrado en el mejoramiento de la vivienda rural y el control de los vectores que la transmiten. El éxito de algunos países del cono sur en el control vectorial de la ECh (WHO 2009) ha creado una matriz de opinión optimista de los organismos dispensadores de salud, la cual se ve opacada con la aparición de sucesivos brotes de infección aguda, especialmente en la Amazonia. Es preocupante la detección de casos agudos asociados a la transmisión oral. Este hecho debe traducirse en un cambio en las estrategias de control de esta parasitosis para considerarla no solo como enfermedad metaxénica y zoonótica sino que además debe incluirse en los programas de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (OPS/OMS, 2006).

P. geniculatus es el triatomino con la distribución geográfica más amplia en América y se ubica desde los 0 a 2.000 metros de altitud. Las observaciones de diversos investigadores sobre los nuevos hábitos de los vectores deben ser evaluadas e incorporadas a un agresivo plan de control amigable con la conservación del medio ambiente. Las alteraciones ambientales de bosques que circundan las ciudades (deforestación, incendios, invasiones ilegales de faldas de montañas) alejan los animales silvestres, fuente principal de alimentación de los triatominos. Al disminuir la cobertura de vegetación, estos buscan refugio en las viviendas que han sustituido los ecotopos naturales de *P. geniculatus* (Reyes-Lugo 2009). La captura de este triatomino por los habitantes de Caracas se incrementó en los años 2008 y 2009 con la recepción en la consulta del Instituto de Medicina Tropical, de 569 y 658 ejemplares de *P. geniculatus*, respectivamente, en comparación con 50 a 60 ejemplares que se recibían por año. Es posible que la cobertura mediática de estos episodios haya influido al divulgar contenidos sobre la ECh, permitiendo la concientización y mayor actitud pro-activa de la población.

La presencia nocturna de *P. geniculatus* en el área domiciliaria en comunidades del centro norte de Venezuela se ha asociado con la temperatura, el número de personas y animales en las viviendas, con la distancia del bosque y las luces encendidas (Reyes-Lugo, 2009). La vivienda donde se elaboraron los jugos de la primera escuela se ubica en el noroeste de la ciudad, muy cerca de la montaña, donde predomina el clima húmedo tropical y es posible que las luces nocturnas atrajeran los triatominos que, al ingresar a la vivienda, incursionaron en los alimentos. Las bebidas pueden contaminarse no solo porque se mezcle el triatominos infectado durante la preparación como en el caso del *açai* en Brasil (Pinto et ál. 2008) sino también porque las heces del vector contentivas del parásito *T. cruzi* pueden caer en la fruta y sobrevivir varias horas como lo ha demostrado Añez et ál. (2009).

De lo aquí expuesto se pueden extraer algunas reflexiones:

- Los cambios ecológicos han permitido al vector *P. geniculatus* abandonar su vida selvática para adaptarse a la vivienda del hombre (domiciliación) y así tener acceso a la fuente de alimentación de roedores, animales domésticos y los propios moradores.
- La factibilidad de la contaminación fecal por estos triatominos de los alimentos y bebidas y la sobrevida del parásito *T. cruzi* en las frutas.
- La inadecuada conservación y manipulación de alimentos, especialmente cuando estos insumos se distribuyen a numerosas personas, especialmente a niños.
- La preparación nocturna de alimentos expuestos a la contaminación con agentes patógenos, coincidiendo con el período de actividad de los triatominos.

Clínicamente la fase aguda de la ECh es una entidad difícil de sospechar inclusive en su forma vectorial con puerta de entrada. Cuando el cuadro clínico agudo se debe a la transmisión oral, difícilmente se llega a establecer la ECh como diagnóstico diferencial. Aún planteándose el diagnóstico de la ECh, en los hospitales se podría realizar el despistaje mediante pruebas inmunoserológicas, con el inconveniente de que en los bancos de sangre solo se practica IgG específica y no se realiza la determinación de IgM,

marcador de la fase aguda. Tampoco se practica de rutina gota gruesa y extendido en casos febriles prolongados, perdiéndose aquí la oportunidad de realizar el diagnóstico etiológico temprano. El diagnóstico de un caso agudo de ECh sin la evidencia de puerta de entrada debe plantear la posibilidad de la transmisión oral y de inmediato se debe proseguir a la investigación activa de otros posibles casos (familia, escuela, lugar de trabajo) ya que pudieran encontrarse otras personas infectadas pero asintomáticas (Alarcón de Noya et ál. 2008). En situaciones de epidemia, el diagnóstico serológico requerido en un muestreo amplio solo se puede asumir con el método de ELISA para la detección de anticuerpos específicos IgM e IgG, y así obtener rápidamente los resultados y aplicar el tratamiento de forma inmediata. En las microepidemias de transmisión oral se suelen presentar casos graves y la mortalidad es alta; por esta razón no debe haber retraso entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento antiparasitario. El diagnóstico confirmatorio puede hacerse en un segundo tiempo (hemaglutinación indirecta, fijación de complemento, *Western blot*, etc.). La demostración del parásito se realizó preferentemente en los pacientes sintomáticos (frotis sanguíneo, cultivo, inoculación en ratones, PCR). En primera instancia debe iniciarse tratamiento a todos los casos sospechosos y probables y, una vez confirmados, se retira a aquellos en quienes no se confirmó la infección por *T. cruzi* (Alarcón de Noya et ál. 2008).

El seguimiento de este volumen de pacientes (191 solo en los dos brotes escolares) amerita la participación de un equipo multidisciplinario que vigila no solo las afecciones cardiológicas que se puedan presentar, sino también las fallas terapéuticas y el riesgo de la transmisión transplacentaria de las actuales maestras jóvenes y de las futuras madres, hoy niñas.

Agradecimientos

Financiamiento parcial: FONACIT F-2005000199, Proyecto Multidiagnóstico (Proyecto número UCV-G-2005000387), Misión Ciencia del FONACIT (Subproyecto 1-Proyecto número 2007001425), Venezuela.

Bibliografía

- ALARCÓN DE NOYA, B. et ál. «Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas, Venezuela: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio». *Revista Biomédica* 20 (3) (2009): 158-164.
- ALARCÓN DE NOYA, B., y J. MARTÍNEZ. «Transmisión oral de la Enfermedad de Chagas en Venezuela: un segundo brote escolar». *Salus* 13 (2) (2009): 9-10.
- ALARCÓN DE NOYA, B. et ál. «Large urban outbreak of orally-acquired acute Chagas disease, at a school in Caracas, Venezuela». *Journal Infectious Diseases* 201 (2010): 1308-1315 .
- ALARCÓN DE NOYA, B., J. TORRES, J. A. SUÁREZ, L. NARANJO, O. NOYA, y R. RUIZ. «Guía para el diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad de Chagas en fase aguda a nivel de los establecimientos de salud». *Avances Cardiológicos* 28 (2008): 250-267.
- AÑEZ, N., G. CRISANTE, y M. ROMERO. «Supervivencia e infectividad de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados». *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 49 (2009): 91-96.
- DÍAZ-UNGRÍA, C. «Estudio experimental del *Trypanosoma cruzi* en el perro y otros vertebrados». *Kasmera* 3 (1968): 73-88.
- HERRERA, L., y S. URDANETA-MORALES. «Synantropic rodent reservoirs of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela». *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 39 (1997): 279-282.
- MAZZA, S., A. MONTANA, C. BENÍTEZ, y E. Z. JANZI. «Transmisión del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con la enfermedad de Chagas». *Misión de Estudios de Patología Regional Andina* 28 (1936): 41-46.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles, Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos. «Informe de la consulta técnica en Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)», Río de Janeiro, mayo 2006.
- PIFANO, F. «El potencial enzoótico del complejo *Schizotrypanum cruzi-Didelphis marsupialis-Panstrongylus geniculatus* y sus incursiones en la vivienda humana del valle de Caracas». *Boletín de la Academia de Ciencias Físicas Matemáticas y Naturales* 46 (1986): 9-37.
- PINTO, A. Y. N., S. A. VALENTE, V. C. VALENTE, A. G. FERREIRA-JUNIOR, y J. R. COURA. «Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005». *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41 (2008): 602-614.
- PINTO, B. «Resultados preliminares de una encuesta de reconocimiento sobre Enfermedad de Chagas y Tripanosomiasis rangeli en un sector del Valle de Caracas (Petare, Edo. Miranda)». *Revista de la Policlínica Caracas* 18 (1949): 103-117.
- QUINTINI, J. «Nota sobre un Nuevo *Conorhinus* capturado en Caracas». *Gaceta Médica de Caracas* 27 (1920): 171.

- REYES-LUGO, M. «*Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera Reduviidae: Triatominae), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela». *Revista Biomédica* 20 (2009): 180-205.
- SCHMUNIS, G. A. «Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration». *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1) (2007): 75-85.
- TORRES, R. A. «Sobre un foco urbano de *Trypanosoma cruzi* en la ciudad de Maracaibo, Venezuela». *Kasmera* 10 (1982): 57-71.
- TORRICO, F., C. ALONSO-VEGA, E. SUÁREZ, P. RODRÍGUEZ, M. C. TORRICO, M. DRAMAIX., C. TRUYENS, e Y. CARLIER. «Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70 (2004): 201-209.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. «Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. Reunión abril 2005», 2009. Disponible en Internet en <http://www.who.int/tdr/TDR/SWG/09>.

8. Protozoos emergentes: del diagnóstico al control

*Basilio Valladares Hernández, Enrique Martínez Carretero,
Pilar Foronda Rodríguez y Jacob Lorenzo Morales*

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales
y Salud Pública de Canarias (España)

8.1. Introducción

Se aplica la denominación de protozoos emergentes a un grupo de protozoos, patógenos humanos, que por diversas razones se están encontrando en la actualidad con mayor frecuencia. Las mejoras en la sensibilidad en las técnicas de diagnóstico, los cambios medioambientales, los movimientos migratorios, etc., son algunas de las causas de esta emergencia o reemergencia.

Entre ellos podemos encontrar a especies de los géneros *Cryptosporidium* y *Giardia* y a las denominadas amebas de vida libre.

8.1.1. *Cryptosporidium* sp

Las especies del género *Cryptosporidium* son protozoos parásitos pertenecientes al *phylum Apicomplexa*. Estos protozoos infectan los bordes de las microvellosidades del epitelio intestinal de un amplio rango de hospedadores vertebrados, incluidos los humanos. Son parásitos intracelulares de células intestinales y, con menos frecuencia, del tracto respiratorio y el árbol biliar. Aunque *C. parvum* y *C. hominis* son las especies más frecuentes en humanos, se han detectado otras como *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. felis* y *C. canis*. Hasta los años ochenta, no se había encontrado en humanos, entrando como parásito oportunista de la mano del HIV. En la actualidad se ha encontrado en seres inmunocompetentes produciendo diarreas autolimitadas.

Para el diagnóstico son de utilidad las tinciones *acid-fast*, como son, por ejemplo, las tinciones de Zielh-Neelson o Kinyoun rea-

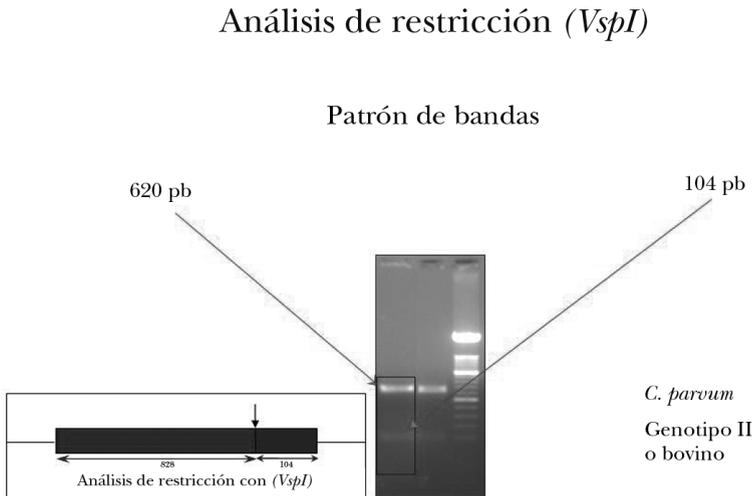
lizados en frotis a partir de las muestras. Los ooquistes aparecen en este caso de color rosado-rojo, y normalmente aparecen con gránulos oscuros. Estas formas de resistencia no presentan autofluorescencia, como ocurre en el caso de *Cyclospora* e *Isospora*. Por otro lado, se pueden observar varios estados del parásito en la superficie de los enterocitos en material de biopsia examinado por métodos histológicos o microscopía electrónica.

Se han descrito numerosas técnicas diagnósticas de tipo inmunológico para esta infección, aunque la detección de anticuerpos tiene baja sensibilidad y especificidad. El test de detección de ooquistes en heces por inmunofluorescencia directa es más sensible y específico.

Existen técnicas de detección de *Cryptosporidium* mediante métodos moleculares que son más sensibles que los métodos de detección por microscopía. Estos incluyen técnicas como la PCR (Abreu Acosta, Néstor et ál. 2007), así como variantes de la misma, en función de la región genómica que se amplifique. Para la caracterización a nivel de especie o genotipos con técnicas moleculares se utilizan numerosos métodos como el análisis de restricción (RFLP) de ADN genómico, técnicas de RAPD, análisis de isoenzimas, etc. Para hacer estudios epidemiológicos, se han realizado análisis de secuencias o de RFLP de diferentes regiones del genoma, el 18S rDNA, los espaciadores ITS1 y ITS2, el gen COWP, el gen de la hidrofolato reductasa-timidilato sintetasa, etcétera.

En un reciente trabajo realizado en nuestro instituto en colaboración con el laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario de la Candelaria (Abreu Acosta, Néstor et ál. 2007) con 109 muestras de pacientes inmunocompetentes con diarrea de etiología desconocida, 23 dieron positivas (21%) por técnicas moleculares, mientras que, mediante técnicas convencionales de microscopía, no se había logrado la detección del parásito, lo que demuestra la importancia de estas técnicas de cara a la sensibilidad en el diagnóstico.

FIGURA 8.1: Caracterización de *Cryptosporidium sp* mediante RFLP



8.1.2. *Giardia intestinalis*

La giardiosis es una causa muy común de diarrea en casi todos los vertebrados, incluidos los humanos. Los síntomas en humanos incluyen diarrea aguda o crónica, deshidratación, dolor abdominal, náuseas, vómitos y pérdida de peso y, si la infestación es masiva y de larga duración, avitaminosis de las vitaminas A y D con presencia de raquitismo óseo. La transmisión a otro nuevo hospedador es de manera directa por la ingestión de quistes que proceden de heces de hospedadores parasitados a través del agua o alimentos contaminados. En los países en vías de desarrollo, Asia, África y América Latina, 200 millones de personas aproximadamente tienen giardiosis sintomática. Según estudios morfológicos y genéticos se reconocen actualmente un total de 11 especies de este género de las cuales dos parasitan a humanos, *G. intestinalis* (sin. *G. lamblia* y *G. duodenalis*) y *G. enterica*.

El diagnóstico se realiza mediante la detección de trofozoitos o quistes en las heces o aspirados duodenales, mediante microscopía óptica. Asimismo, son de utilidad las técnicas de inmunoensayo enzimático o la inmunofluorescencia directa. La utilización de métodos moleculares supone una herramienta más sensible para

la detección del parásito y el genotipado, ayuda a la investigación epidemiológica del mismo.

Investigaciones realizadas en el Instituto de Enfermedades Tropicales demostraron que en Canarias el genotipo humano más frecuente es el B, encontrándose el E solo en cabras (Ruiz, Antonio et ál. 2008). Sorprendentemente, en un estudio realizado con heces humanas procedentes de zonas rurales de Egipto, se ha encontrado por primera vez, el genotipo E parasitando a personas (Foronda, Pilar et ál. 2008).

8.1.3. Amebas de vida libre

Los límites entre protozoos parásitos y protozoos de vida libre son generalmente mínimos. Existen casos en los que algunos protozoos de vida libre se pueden englobar en ambas categorías e, incluso, presentarse tan destructivos e infecciosos como los protozoos parásitos *sensu stricto*. En la actualidad, las amebas de vida libre están consideradas por el CDC de Atlanta como «patógenos emergentes».

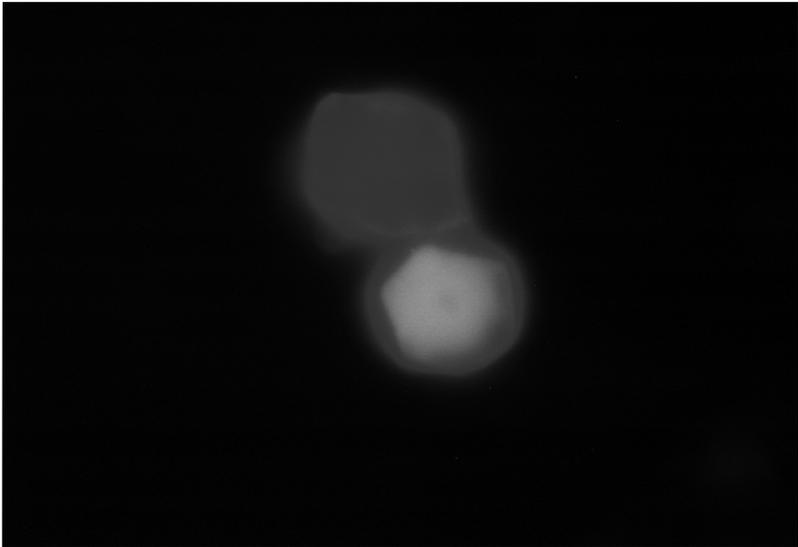
Incluidos dentro de las amebas de vida libre se encuentran los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* y *Sappinia* siendo las especies del género *Acanthamoeba* las más frecuentes, las mejor estudiadas y a las que en este capítulo les vamos a prestar mayor atención. Todas ellas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, no dependen de un hospedador para su transmisión y se encuentran preadaptadas a un parasitismo oportunista, pudiendo ser potencialmente patógenas. En reconocimiento a su habilidad para vivir de forma endozoica, aun cuando son capaces de existir en vida libre, se las ha denominado amebas anfizoicas.

En 1958 Culbertson describió por primera vez, a partir de un cultivo de células de riñón de mono, la presencia de amebas de vida libre potencialmente patógenas. Estas eran capaces de producir un efecto citopatogénico en cultivos celulares e incluso producir en pocos días una meningoencefalitis mortal en ratones inoculados por vía intranasal o intracerebral. El primer caso en humanos fue descrito en Australia en 1967, identificándose en primera instancia el agente etiológico como perteneciente al género *Acanthamoeba* aunque posteriormente estos datos fueron corri-

dos y los trofozoítos y quistes aislados se englobaron dentro del género *Naegleria*. En 1978 se describió el primer caso confirmado de infección cerebral por *Acanthamoeba*. Las primeras afecciones oculares provocadas por *Acanthamoeba* fueron descritas en Reino Unido y Estados Unidos en 1974 y 1975 respectivamente. A partir de la descripción de estos casos, Martínez en 1980 caracterizó las patologías debidas a estas amebas como infecciones oportunistas, describiendo infecciones en pacientes inmunodeprimidos e identificando las diferencias entre las patologías debidas a *Acanthamoeba* y a *Naegleria*.

Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* se han aislado en una amplia variedad de hábitats y su contacto con el hombre es un hecho común (Lorenzo-Morales et ál. 2005). Se ha observado que hasta un 50% de la población posee anticuerpos específicos frente a *Acanthamoeba* e incluso se han aislado de la nariz y garganta de individuos asintomáticos.

FIGURA 8.2: **Quiste de *Acanthamoeba spp.***



Nota: Tinción con calcoflúor en la que se puede observar la doble pared característica.

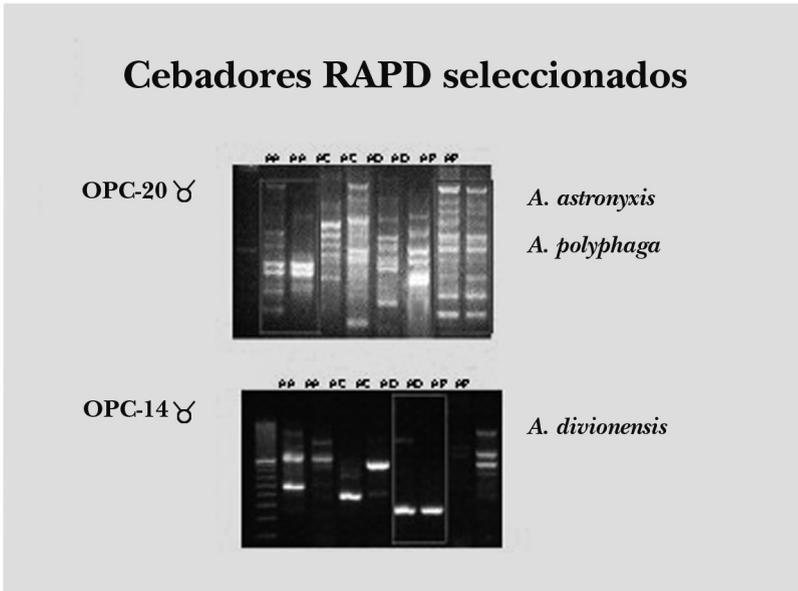
En un principio, las *Acanthamoebas* se clasificaban por su morfología y se incluían en tres grupos. Este sistema generaba bastante confusión y creaba problemas en el momento de la clasificación. Durante los últimos años, se han empleado diferentes estrategias para la clasificación de las especies de *Acanthamoeba*, tales como perfiles de isoenzimas, polimorfismos de restricción del ADN mitocondrial (mtDNA-RFLP) y polimorfismos de restricción de productos amplificados de ssurRNA, encontrándose diferencias con cualquiera de ellos y entre cepas de la misma especie principalmente en *A. castellanii* y *A. polyphaga*. Debido a la alta variabilidad intraespecífica encontrada, se emplearon ensayos de RFLP sobre el gen de la subunidad pequeña ribosomal del ADN mitocondrial (mtssurDNA) para el estudio de aislados de *Acanthamoeba* estrechamente relacionados. El empleo de este gen presenta la ventaja de no poseer intrones ni múltiples copias que distorsionen los resultados, siendo útil para la identificación rápida de aislados clínicos o para la identificación de una alta cantidad de muestras.

En los laboratorios de nuestro Instituto de Enfermedades Tropicales, en los últimos años, se ha empleado la técnica de RAPD (Random Amplified DNA Polymorphism) como herramienta útil para la identificación de *Acanthamoeba* a nivel de especies, y para el diseño de cebadores específicos para la identificación de las especies *A. astronyxis* (Ortega-Rivas et ál. 2005), *A. divionensis* (Ortega-Rivas et ál. 2003) y *A. polyphaga* (Ortega Rivas et ál. 2004).

Sin embargo, la taxonomía y clasificación de *Acanthamoeba* y de muchas de las amebas de vida libre restantes está en constante revisión, lo que viene reflejado por los nuevos datos obtenidos a partir de estudios de secuenciación del genoma de *Acanthamoeba* y el estudio de regiones espaciadoras internas transcritas (ITS).

En la actualidad se buscan criterios más objetivos para actualizar la clasificación; hasta ahora el más aceptado está basado en la secuenciación del gen ssurRNA. Las variaciones en esta secuencia, definen un total de 15 genotipos para el género *Acanthamoeba*. Esta clasificación está ampliamente apoyada en la actualidad y la mayoría de los autores agrupa ahora a los aislados de *Acanthamoeba* en genotipos y no en grupos morfológicos. Estos 15 genotipos agrupan un total de 21 especies de *Acanthamoeba* (Lorenzo-Morale et al. 2007).

FIGURA 8.3: Caracterización de especies a partir de RAPD



Nota: Las bandas específicas una vez secuenciadas eran utilizadas para el diseño de cebadores para el diagnóstico por PCR.

8.2. Mecanismo de infección

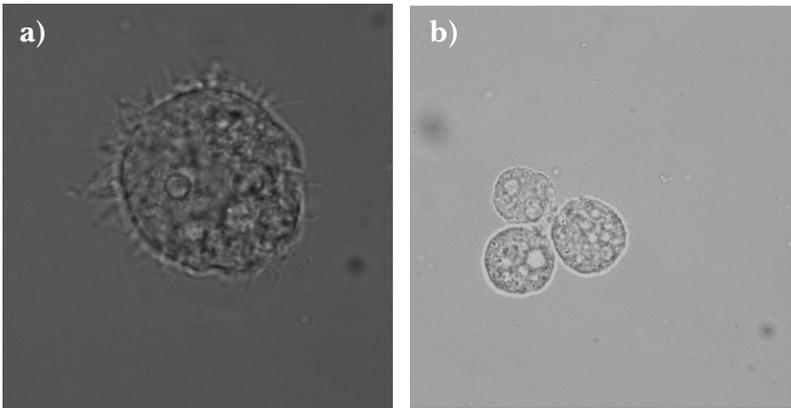
Las cepas patógenas de *Acanthamoeba* presentan como norma general mayor termotolerancia, mayor tasa de crecimiento, adherencia a las células del hospedador, excreción de productos citotóxicos y evasión de la respuesta inmune. La patogénesis de *Acanthamoeba* depende principalmente de tres factores: el hospedador, la ameba y las condiciones ambientales. Se cree que el proceso de patogénesis se inicia con la adhesión de la ameba a la célula hospedadora, seguido de la secreción de proteasas extracelulares y, finalmente, fagocitosis y/o muerte directa de la célula hospedadora.

La fijación a la membrana de las células del hospedador es uno de los pasos cruciales en el mecanismo de patogenicidad de estas amebas e incluso se ha observado que las amebas no patógenas presentan unos niveles muy bajos de unión a las células del hospedador. Cabe destacar que el número de acantópodos está

estrechamente relacionado con la capacidad de adhesión. Así, las amebas patógenas presentan más de 100 por célula mientras que, en las no patógenas, su número no sobrepasa los 20.

La capacidad del parásito para unirse al epitelio celular va a ser, por lo tanto, un requisito básico para el establecimiento de un proceso patológico además de un factor de virulencia, que va a determinar el grado de patogenicidad de diferentes cepas.

FIGURA 8.4: Fotografías al microscopio electrónico de cepas virulenta (a) y no virulenta (b)



La importancia de las proteasas extracelulares en la patogénesis de *Acanthamoeba* ha sido descrita en varias ocasiones. Hadas y Mazur citan la presencia de serín-proteasas de 35 y 65 KD en ocho especies de *Acanthamoeba*. Estudios posteriores revelaron la presencia en los productos de secreción de estas amebas de cisteín-proteasas de 43, 59, 70 y 100-130 KD, así como serín-proteasas de 33, 47, 60, 75 y 100 KD.

Cho et ál. en 2000 aíslan y caracterizan serín-proteasas secretadas por aislados de *Acanthamoeba* procedentes de casos de queratitis. Recientemente se ha observado que las serín-proteasas extracelulares son además capaces de provocar daños importantes en monocapas de células epiteliales humanas.

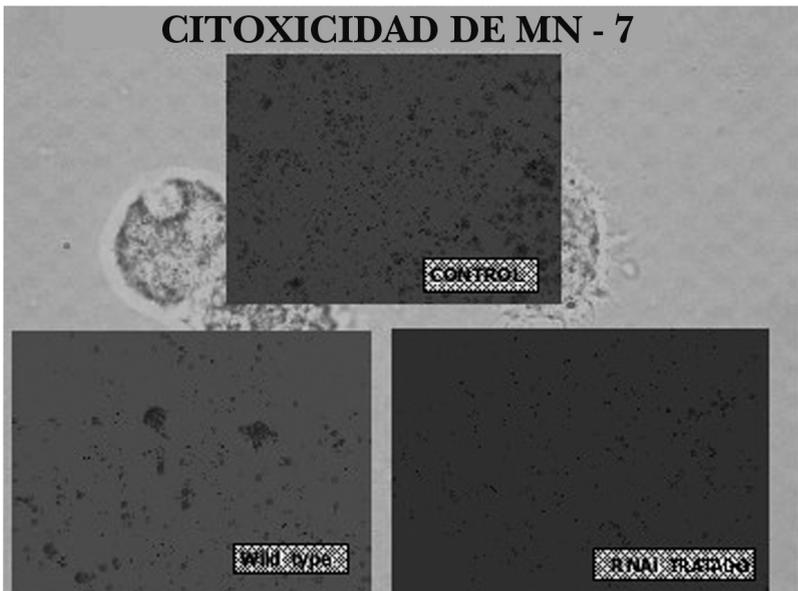
La actividad proteásica es mayor en cepas patógenas que en no patógenas, lo que, a su vez, está correlacionado con la habilidad de las mismas para provocar citotoxicidad en las células hospedadoras.

En nuestros laboratorios hemos puesto a punto el silenciamiento de genes a través de las técnicas de iRNA (Lorenzo-Morales et ál. 2005). Esto está basado en un mecanismo común en el que se crea un ciclo de degradación de RNA provocado por la presencia transitoria de RNA de doble cadena (dsRNA), lo que conduce a la destrucción de los RNA endógenos que son homólogos al dsRNA. Debido a que el sistema de RNAi elimina los mRNA de ambos alelos o genes repetitivos, es ideal para organismos asexuales diploides (como la mayoría de las amebas).

8.2.1. Silenciamiento del gen que expresa las serín-proteasas en *Acanthamoeba*

Hemos usado la técnica de RNAi (*soaking technique*) con la finalidad de inhibir el dominio catalítico de las serín-proteasas extracelulares de *Acanthamoeba*, intentando establecer la importancia de estas proteasas en la patogenicidad de *Acanthamoeba*.

FIGURA 8.5: Cultivo en monocapa de células corneales al que se le ha añadido la cepa patógena de MN-7 de *Acanthamoeba*, y se le ha silenciado o no a estas el dominio catalítico de las serín-proteasas



Tras realizar las comprobaciones pertinentes (medida de la actividad proteásica del sobrenadante, geles SDS-PAGE de gelatina, estudio de la citotoxicidad antes y después del tratamiento, *northern blot*, etc.), se ha comprobado que el siRNA (*Soaking technique*) silencia de forma efectiva la expresión génica de las serín-proteasas en *Acanthamoeba* y que las serín-proteasas extracelulares de *Acanthamoeba* están directamente relacionadas con la patogenicidad de estos protozoos (Lorenzo-Morales et ál. 2005).

8.2.2. Silenciamiento del gen que expresa la glucógeno fosforilasa en *Acanthamoeba*

Por otra parte, la capacidad que tienen las amebas de enquistarse es un hecho fundamental de estos protozoos de cara a defenderse de condiciones adversas en las que se incluye la terapia.

En la formación de quistes tiene un papel importante la síntesis de celulosa y se sabe que la enzima «glucógeno fosforilasa» juega un papel importante en su síntesis.

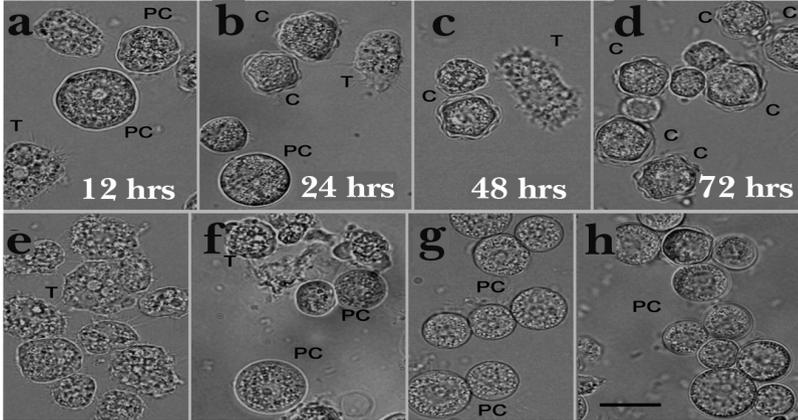
Con el silenciamiento del gen que codifica la glucógeno fosforilasa de *Acanthamoeba*, mediante la técnica de *soaking* empleando SIPORT®, hemos querido ver el papel de la glucógeno fosforilasa en el proceso de diferenciación de *Acanthamoeba* (Lorenzo-Morales et ál. 2008).

Se estudian los resultados, tras el análisis del silenciamiento mediante observación de enquistamiento. La comprobación de la síntesis de celulosa se analiza en cultivos y por *northern blot*.

Se analizan los resultados en cepas tratadas y no tratadas con RNAi.

FIGURA 8.6: Proceso de enquistamiento normal desde 12 a 72 h (a, b, c y d), con iRNA (e, f, g y h)

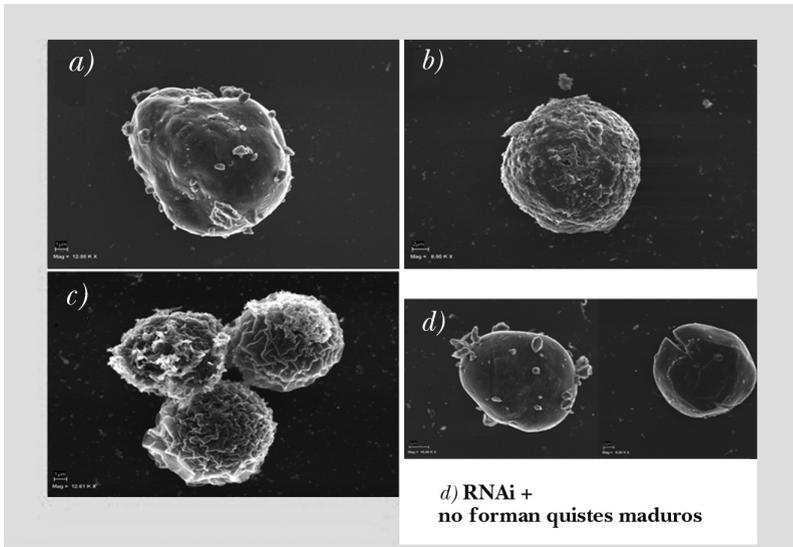
Acanthamoeba en medio NEM



RNAi

Fuente: Fotografía con microscopía óptica (ASM publications, Lorenzo-Morales et ál. 2008).

FIGURA 8.7: Desarrollo normal de quistes en 72 h (a, b y c), con iRNA no forman quistes maduros (d)



Fuente: Fotografía al microscopio electrónico.

Por lo anteriormente expuesto, tanto la glucógeno fosforilasa como la serín-proteasa serían buenas dianas terapéuticas para el control de las patologías causadas por *Acanthamoeba*.

Cabe destacar, en cuanto a la capacidad patógena de estas amebas, el hecho de ser transportadoras de otros patógenos. Así, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, hemos encontrado que, de 236 muestras positivas para *Acanthamoeba sp* procedentes de agua de consumo humano de la isla de Tenerife, 34 (14,41%) eran positivas para adenovirus de cuatro serotipos diferentes, siendo el serotipo HAdV2 el más frecuente (Lorenzo-Morales et ál. 2007).

Bibliografía

- ABREU-ACOSTA, N., M. A. QUISPE, P. FORONDA-RODRÍGUEZ, J. ALCOBA-FLÓREZ, J. LORENZO-MORALES, A. ORTEGA-RIVAS, y B.VALLADARES. «Cryptosporidium in patients with diarrhoea in Tenerife, Canary Islands, Spain». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, vol. 101 (6) (2007): 539-545.
- FORONDA, P. M., D. BARGUES, N. ABREU-ACOSTA, M. V. PERIAGO, M. A. VALERO, B. VALLADARES, y S. MAS-COMA. «Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt». *Parasitology Research*. 103 (2008): 1177-1181.
- LORENZO MORALES, J., A. ORTEGA RIVAS, P. FORONDA, N. ABREU, D. BALLART, E. MARTÍNEZ CARRETERO, y B. VALLADARES. «RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine protease genes in *Acanthamoeba*: molecular analysis and effect on pathogenicity». *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 144 2 (2005): 10-15.
- LORENZO-MORALES, J., A. ORTEGA RIVAS, P. FORONDA, E. MARTÍNEZ, y B. VALLADARES. «Isolation and identification of the pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources». *Parasitology Research*, vol. 95 (2005): 273-277.
- LORENZO-MORALES, J., N. CORONADO-ÁLVAREZ, E. MARTÍNEZ-CARRETERO, S. MACIVER, y B., VALLADARES. «Detection of four adenovirus serotypes within water isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain». *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77 (4) (2007): 753-756.
- LORENZO-MORALES, J., J. KLIESCIKOVA, E. MARTÍNEZ-CARRETERO, L. M. DE PABLOS, B. PROFOTOVA, E. NOHYNKOVA, A. OSUNA, y B. VALLADARES. «Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba spp.*: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference». *Eukaryotic Cell*. 7 (3) (2008): 509-517.
- ORTEGA RIVAS, A., J. LORENZO-MORALES, V. ALONSO, N. ABREU ACOSTA, P. FORONDA RODRÍGUEZ, A. DEL CASTILLO REMIRO, y B. VALLADARES. «Random Amplified Polymorphic DNA profiles as a tool for the identification of *Acanthamoeba divionensis*». *Current Microbiology*, vol. 47 (2003): 84-86.

- ORTEGA RIVAS, A., J. LORENZO MORALES, E. MARTÍNEZ CARRETERO, M. VILLA, B. VALLADARES, B. HERNANDEZ, y A. DEL CASTILLO. «Design and evaluation of a specific primer pair for the diagnosis and identification of *Acanthamoeba polyphaga*». *Current Microbiology*, vol. 48 (2004): 360-363.
- ORTEGA RIVAS, A., J. LORENZO MORALES, E. MARTÍNEZ, M. VILLA, A. CLAVEL, B. VALLADARES, y A. DEL CASTILLO. «A specific primer pair for the diagnosis and identification of *Acanthamoeba asteronyxis* by Random Amplified Polimorphic DNA Polymerasa Chain Reaction». *Journal of Parasitology*, vol. 91 (1) (2005): 122-126.
- RUIZ, A., P. FORONDA, J. F. GONZÁLEZ, A. GUEDES, N. ABREU-ACOSTA, J. M. MOLINA, y B. VALLADARES. «Occurrence and genotype characterization of *Giardia duodenalis* in goat kids from the Canary Islands, Spain». *Veterinary Parasitology* 14, 154 (1-2) (2008): 137-141.

9. Elementos móviles de ADN: mochileros del genoma

*María del Carmen Thomas Carazo, Francisco Macías Huete,
Patricia E. Carreira Moreno, Beatriz Rojas Ruiz,
Marta García-Cañadas y Manuel Carlos López López*
Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. P. T. de
Ciencias de la Salud (España)

9.1. Introducción

Los genomas de los organismos no son sistemas de información estáticos dado que están ocupados por un gran número de secuencias de ADN con capacidad de moverse de un lugar a otro del genoma. La primera evidencia de la existencia de este tipo de secuencias, conocidas como *elementos móviles de ADN*, fue realizada en 1950 por Barbara McClintock. Estudiando la herencia del color y la distribución de la pigmentación del maíz, McClintock observó la existencia de unas secuencias de ADN que se movían de un lugar a otro dentro del genoma. La inserción de estas secuencias en regiones concretas ocasionaba modificaciones en el color del grano del maíz por lo que los denominó «elementos controladores». Desde entonces, varios tipos de elementos genéticos móviles (MGE) han sido descritos en una gran variedad de organismos eucariotas, incluyendo protozoos parásitos, anfibios, moluscos, reptiles, insectos, plantas, mamíferos, etc.

Como consecuencia de su inserción, los MGE pueden generar mutaciones en genes produciendo inactivación o modificación en el patrón de expresión génica. La inserción en secuencias concretas puede conllevar a la formación de genes quiméricos, lo cual puede estar también ocasionado por las múltiples secuencias donadoras yceptoras de *splicing* que los MGE poseen. Pero, además, los retroelementos translocan otras secuencias que se en-

cuentran adyacentes a ellos, ya que estos poseen débiles señales de poliadenilación que son sobrepasadas durante la transcripción. Por tanto, durante la reversotranscripción del elemento estas secuencias adyacentes son también reversotranscritas, movilizadas e insertadas conjuntamente con el elemento. Además, la existencia de un elevado número de MGE en los genomas proporciona un importante sustrato para generar translocaciones, inserciones y deleciones cromosómicas.

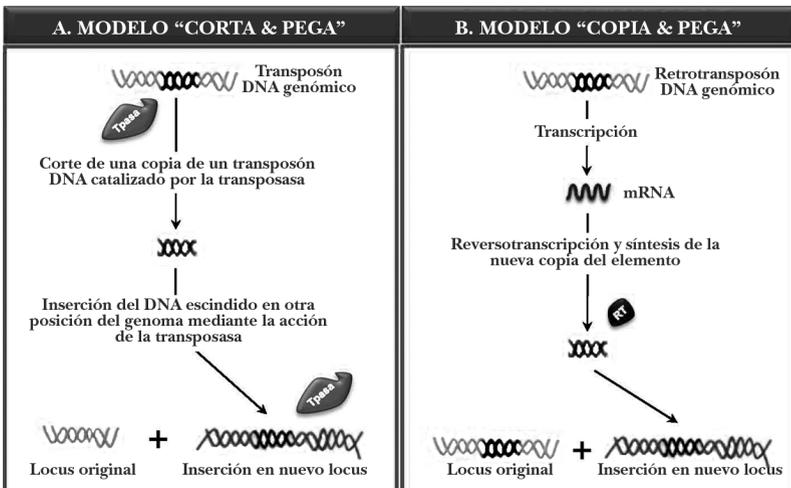
Los elementos móviles se consideraron durante décadas *ADN basura*, y fueron calificados como *secuencias egoístas* o *parásitos genómicos*, porque, además, explotaban los recursos de la célula hospedadora para sus propios fines replicativos. Sin embargo, hoy día existen datos sólidos que indican que estos elementos contribuyen, sustancialmente, al contenido de los genomas y juegan un papel importante en la evolución de los genes y genomas respecto a función y estructura. A pesar de que, en muchos casos, las implicaciones funcionales de los MGE no son bien conocidas, se postula que deben tener un papel universal y relevante desde el punto de vista de la biología del organismo que los hospeda. Se ha descrito que los ARN mensajeros maduros que contienen elementos transponibles corresponden principalmente a transcritos involucrados en inmunidad (inmunoglobulinas, MHC o en algunos dominios de citocinas). En cambio, aquellos mensajeros implicados en funciones esenciales del metabolismo, desarrollo o genes estructurales tienen una menor prevalencia de elementos transponibles. Asimismo, se ha reportado que, en el ratón, la inserción de MGE dentro de regiones reguladoras de ciertos genes neuronales altera su expresión, lo que da lugar a poblaciones distintas de células neuronales. Interesantemente, los resultados obtenidos en estudios comparativos de diversos genomas sugieren que las inserciones nocivas de estos elementos móviles van reduciéndose, mientras que aquellas que son beneficiosas son mantenidas a lo largo de la evolución de los genomas. De hecho, los MGE han llegado a ser «domesticados» y han evolucionado para suplir funciones esenciales en la dinámica de los genomas. Una gran cantidad de datos sugiere que las telomerasas, enzimas responsables de mantener la integridad de los telómeros, pueden tener su origen en un tipo de MGE

denominados retrotransposones sin LTR. Estas enzimas están constituidas por una ribonucleopartícula (RNP) que incluye una reversotranscriptasa y una molécula de ARN, la cual es reversotranscrita en el extremo del cromosoma.

9.2. Clasificación de los elementos móviles

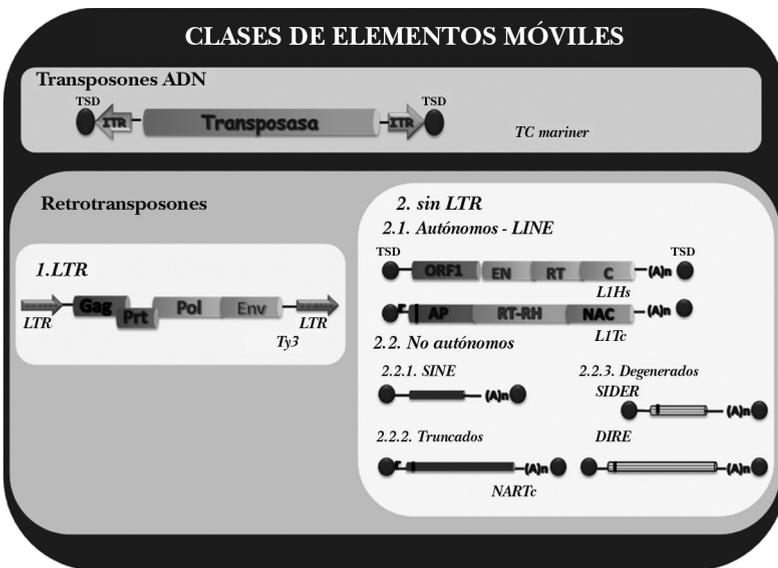
Según su estructura y mecanismo de movilización, los MGE se clasifican en transposones de ADN y retrotransposones. Los primeros codifican una transposasa y se movilizan por un mecanismo conocido como *corta y pega*. La característica principal del segundo tipo de elementos es que codifican una proteína con actividad reversotranscriptasa, la cual copia a ADN el mensajero del elemento una vez transcrito. Posteriormente, la nueva copia es insertada en otra localización del genoma. Es por ello que este mecanismo de *copia y pega* de los elementos móviles produce expansión del genoma que los hospeda.

FIGURA 9.1: Diferencias en el mecanismo de transposición de los transposones de ADN (*corta y pega*) que codifican una transposasa (Tpsa) y los retrotransposones (*copia y pega*) que codifican una reversotranscriptasa (RT)



Entre los retrotransposones se diferencian aquellos que portan largas terminaciones en sus extremos (retrotransposones con LTR) y aquellos que carecen de ellas (retrotransposones sin LTR). En el grupo de elementos sin LTR se encuentran unos que poseen gran tamaño, aproximadamente cinco kilobases (kb), y codifican las proteínas implicadas en su proceso de reversotranscripción e inserción. Es por ello que estos elementos se denominan autónomos o LINE (*long interspersed nucleotide elements*) y aquellos que carecen de capacidad codificante, de aproximadamente 0,3-0,5 kb, son denominados no autónomos o SINE (*short interspersed nucleotide elements*). Dentro de los retrotransposones sin LTR, existe un tercer grupo que engloba a aquellos elementos que proceden de truncamientos de los LINE y que, si bien portan secuencias homólogas a los LINE, no codifican proteínas funcionales.

FIGURA 9.2: Clases de elementos móviles



Transposones de ADN que codifican una transposasa. Retrotransposones, movilizados vía un ARN intermediario que es reversotranscrito por la enzima reversotranscriptasa que ellos codifican y que los hace autónomos en cuanto a movilidad. ITR (*inverted terminal repeats*), LTR (*long terminal repeats*), LINE o L1 (*long interspersed nucleotide elements*), SINE (*short interspersed nucleotide elements*), SIDER (*short degenerated retroposons*), DIRE (*degenerated ingi/L1Tc-related elements*). Los elementos autónomos indicados corresponden a los descritos en tripanosomátidos.

9.3. Elementos móviles en tripanosomátidos

El análisis del genoma de diversos tripanosomátidos ha mostrado que contienen una gran cantidad de copias de retrotransposones tanto de tipo LTR, como sin LTR. Sin embargo, estos protozoos parásitos no parecen contener transposones ADN. Entre los elementos de tipo sin LTR se han encontrado algunos que están insertados en secuencias concretas de los genomas que los hospedan. Así, por ejemplo, SLACS de *Trypanosoma brucei*, CREI de *Crithidia fasciculata* y CZAR de *Trypanosoma cruzi* se insertan dentro de la secuencia del *spliced leader*, siempre en la misma posición mientras que el elemento TATE de *Leishmania braziliensis* se inserta siempre en las regiones teloméricas. Otros elementos de tipo SINE, como la secuencia SIRE, se encuentran insertados en regiones 3' no traducidas de diversos genes de tripanosomátidos. Así, el elemento SIRE se integra en el dominio de polipirimidinas situado en las regiones intergénicas del *cluster* de la familia multigénica P2 β que codifica proteínas ribosomales. De esta manera, las señales de procesamiento situadas en el extremo 3' del elemento SIRE son usadas como alternativa al dominio de polipirimidinas desbaratado, afectando a la eficiencia de maduración y traducción de los ARNm P2 β situados corriente abajo del lugar de inserción. Además, el elemento SIRE se encuentra insertado en ciertas copias del gen que codifica la histona H2A de *T. cruzi*, modificando la estabilidad y el tamaño de aquellos mensajeros que la portan (Marañón et ál. 2000; Thomas et ál. 2000). En cuanto a los elementos de tipo LINE o L1, el genoma de *T. cruzi* contiene el elemento LITc y el genoma de *T. brucei* contiene *ingi*, que mantiene un alto grado de similitud con LITc a nivel de secuencia. En estos dos protozoos existen además elementos que se corresponden con versiones truncadas de LITc e *ingi*, denominadas NARTc y RIME, respectivamente. Existen también en el genoma de tripanosomátidos elementos degenerados, equivalentes en tamaño a los LINE, denominados DIREs (*degenerated ingi/LITc-related elements*). Estos elementos, por haber acumulado un alto número de mutaciones a lo largo de su secuencia, han perdido su capacidad codificante. También existen elementos cortos degenerados o SIDER (*short degenerated retroposons*)

que son equivalentes en tamaño a los SINE. En *Leishmania*, estos elementos se localizan principalmente en secuencias 3' no traducidas donde influyen negativamente en la abundancia de los mensajeros de los genes que los portan.

Hasta la fecha, de todos los retroelementos descritos en un eucariota, uno de los mejor caracterizados, a nivel molecular y en cuanto a la determinación de las diferentes actividades enzimáticas que el elemento codifica, es el presente en *T. cruzi*, denominado L1Tc. Este elemento, junto a NARTc, conforma el 5% del genoma de *T. cruzi*. L1Tc se transcribe activamente en los tres estadios del parásito (Martín et ál. 1995) y codifica todas las proteínas que requiere para su movilización, proteínas con actividad endonucleasa de tipo AP, reversotranscriptasa, ARNasa H y chaperona de ácidos nucleicos. La endonucleasa AP, denominada NL1Tc, tiene capacidad de reparar el daño producido en el ADN por agentes alquilantes y oxidantes. Este hecho se ha puesto de manifiesto en ensayos *in vitro* empleando la proteína recombinante purificada a homogeneidad como *in vivo*, mediante la sobreexpresión de NL1Tc en bacterias sensibles a la temperatura nulas para el gen endo IV (Olivares et ál. 1997). La proteína NL1Tc, además de hidrolizar sitios abásicos en el ADN genómico, tiene actividad 3'-fosfatasa y 3'-fosfodiesterasa que son también actividades reparadoras del ADN (Olivares et ál. 1999). Ensayos de cometa, empleando núcleos aislados de parásitos sobreexpresando la proteína NL1Tc, la proteína mutada en el sitio activo y parásitos sin transformar, evidenciaron que NL1Tc, en menos de 60 minutos, repara el daño producido en el ADN por agentes como la daunorubicina (Olivares et ál. 2003). L1Tc codifica también una proteína con actividad reversotranscriptasa (RTL1Tc), la cual es activa con sustratos homólogos y heterólogos y tiene capacidad de cambiar de molde, lo que supondría una fuente para generar copias de mensajeros quiméricos (García Pérez et ál. 2003). Asimismo se ha identificado una proteína codificada por L1Tc con actividad ARNasa H (Olivares et ál. 2002). Esta proteína, denominada RNL1Tc, es excepcionalmente activa en un amplio rango de pH y temperatura y, al igual que RTL1Tc, es activa con sustratos homólogos y heterólogos a L1Tc. Esta es la primera descripción de una actividad ARNasa H codificada por un retrotransposón sin LTR. Corriente abajo de RNL1Tc, se en-

cuentra una secuencia que codifica un polipéptido que porta dos *zinc-fingers* del tipo CCHH. La proteína recombinante que porta estos dominios ha mostrado, en ensayos de estabilización y desestabilización de hebras de ADN complementarias, tener actividad chaperona de ácidos nucleicos (NAC) (Heras et ál. 2005). Así, esta proteína, denominada C2-L1Tc, promueve la formación de híbridos de ADN de cadena complementaria estabilizando además dicha unión. Las regiones implicadas en dicha función, determinada con péptidos sintéticos y ensayos de retardo en gel, corresponden a una secuencia de localización nuclear (NLS) junto a un dominio básico o conjuntamente con el *zinc finger* presente en el extremo amino de C2-L1Tc (Heras et ál. 2009). En el genoma de *T. cruzi* se han identificado, al menos, 15 elementos L1Tc teóricamente retrocompetentes, los cuales codifican todas las proteínas funcionales anteriormente mencionadas en una única fase abierta de lectura. Además, podría haber elementos activos formados por tres fases de lectura en los que mecanismos de traducción particulares tendrían que estar teniendo lugar.

L1Tc se ha encontrado asociado a un gen codificante de una proteína transportadora perteneciente a la familia de transportadores ABC, integrado en la secuencia codificante del gen ADNj, así como asociado a secuencias de tipo SINE como RS13Tc y RS1Tc. Esta asociación entre LINEs (L1Tc) y SINEs (RS13Tc y RS1Tc) y entre L1Tc y NARTc se mantiene en varias cepas del parásito (Olivares et al. 2000). Diversos datos, entre ellos, los aquí mencionados, indican que los elementos transponibles tienden a agruparse en vez de distribuirse aleatoriamente a lo largo de los genomas. La implicación funcional de la asociación de los SINE con los LINE puede reflejar la necesidad de los primeros de usar la maquinaria enzimática de los LINE para su expansión. La similitud existente entre una secuencia de 13 nucleótidos localizada en el extremo 3' de los elementos L1Tc y NARTc podría justificar esta idea, dado que esta secuencia común podría reclutar la maquinaria del LINE requerida para su transposición. Por otra parte, la agrupación de LINE y SINE en regiones genómicas pobres en genes podría estar forzada por procesos mediados por el hospedador para intentar minimizar el efecto deletéreo resultante de la integración del LINE.

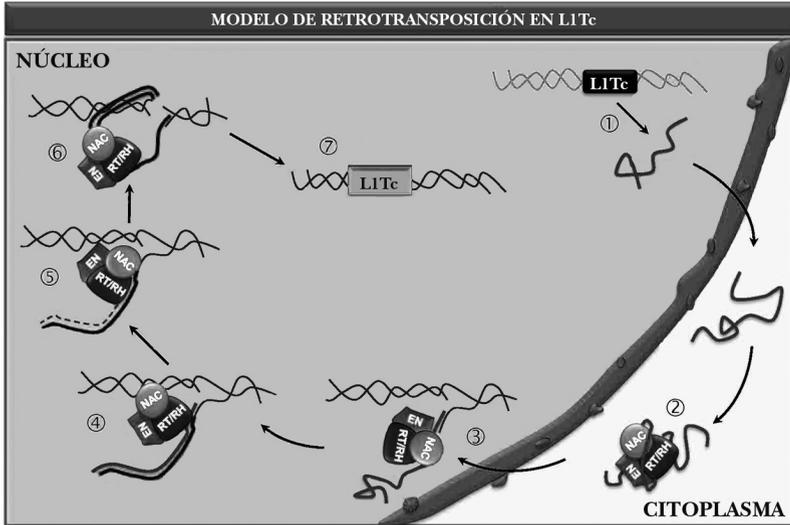
Un pequeño número de elementos móviles presenta posiciones genómicas que han permanecido relativamente inalteradas durante cientos de millones de años en muchas especies. La interpretación más probable de este fenómeno es que deben jugar un papel importante en la supervivencia del hospedador. En los tripanosomátidos *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* hay un elevado grado de sintenia génica. Los genes están organizados en agrupaciones génicas direccionales y los transcritos policistrónicos son procesados por *trans-splicing* y poliadenilación para generar mensajeros maduros y traducibles. Estos agrupamientos génicos direccionales están separados por pequeñas regiones de cambio de hebra, no codificantes, en las que el inicio de la transcripción tiene lugar. Las regiones de cambio de hebra tienen una elevada densidad de MGE a pesar del hecho de que estos organismos han divergido hace 100 millones de años. Esta conservación a lo largo de la evolución debe tener un significado funcional.

A pesar de que en tripanosomátidos no se ha descrito la existencia de promotores diferentes a la secuencia que se encuentra corriente arriba del miniexon o *spliced leader*, el carácter autónomo de un elemento móvil requeriría que este portara una secuencia promotora que, en términos de promotor interno, mediara la transcripción del elemento. La comparación de las secuencias correspondientes a los retroelementos LITc y NARTc, puso de manifiesto la existencia de una secuencia que mantenía un 100% de identidad, la cual, por su alto grado de conservación y por su localización, era una buena candidata a ser una secuencia promotora de estos elementos. Mediante ensayos de transfección de *T. cruzi* empleando construcciones que portaban dicha secuencia, denominada Pr77, corriente arriba de genes reporteros, se demostró que Pr77 era capaz de activar la transcripción génica (Heras et ál. 2007). Los resultados obtenidos en ensayos de *run on*, empleando núcleos aislados del parásito e inhibidores de las diferentes ARNs polimerasas (I, II, y III), evidenciaron que dicha transcripción era dependiente de la ARN polimerasa II. Pr77 es un promotor interno y genera un elevado nivel de transcritos traducibles. A diferencia del resto de los ARN mensajeros de *T. cruzi*, los mensajeros derivados de

Pr77 carecen de *spliced leader* en su extremo 5' y comienzan en el nucleótido 1 del elemento o cerca de este (Heras et ál. 2007).

Puesto que LITc codifica diferentes proteínas funcionales, se ha sugerido un mecanismo de transposición para este tipo de retroelementos que se basa en el propuesto para el elemento R2 de *Bombyx mori* y que se esquematiza en la figura 9.3. Así, en el núcleo del parásito, LITc sería transcrito desde su promotor interno y el ARN correspondiente se transportaría al citoplasma donde sería traducido generando diferentes proteínas con actividad endonucleasa, RT, ARNasa H y NAC. Estas proteínas, de manera individual o como una poliproteína, se unirían al mensajero del que fueron traducidas generando una ribonucleopartícula (RNP) que sería transportada al núcleo. Dentro del núcleo, la endonucleasa NLITc generaría un corte de la cadena negativa del ADN en el sitio de nueva inserción del elemento, generando un extremo 3' OH que sería empleado como iniciador para dirigir la reversotranscripción del mensajero de LITc, proceso que sería llevado a cabo por RTLITc. De esta manera, la hebra de ARN del híbrido ARN:ADN generado sería digerida por la ARNasa H de LITc. Probablemente un segundo corte, generado por la endonucleasa NLITc en el extremo 5' de la cadena positiva del ADN en el sitio de inserción, permitiría la síntesis de la segunda hebra de ADN sintetizada por la actividad ADN polimerasa que porta la proteína RTLITc (García Pérez et ál. 2003). De esta manera quedaría insertada una nueva copia de LITc en una nueva posición del genoma, la cual sería, a su vez, activa. Dicha copia estaría flanqueada por la secuencia del sitio de inserción que reconoció la endonucleasa, denominada sitio de duplicación directo (TSD, *target site duplication*).

FIGURA 9.3: Mecanismo de transposición propuesto para el elemento móvil LITc de *Trypanosoma cruzi*



Nota: 1. Transcripción de LITc y exportación del correspondiente ARN mensajero al citoplasma. 2. Traducción y síntesis de las proteínas con actividad endonucleasa AP (EN), reversotranscriptasa y ARNasa H (RT/RH) y chaperona de ácidos nucleicos (NAC). 3. Transporte al núcleo de la ribonucleoproteína formada por el ARN mensajero del elemento y las proteínas codificadas por LITc. Corte de la cadena negativa de ADN, en el sitio de inserción del elemento. 4. Reversotranscripción y copia del ARN mensajero del elemento. 5. Hidrólisis de la cadena de ARN del híbrido ARN/ADN. 6. Corte de la cadena positiva de ADN y síntesis de la segunda cadena de ADN correspondiente a LITc quedando una nueva copia de este insertada en una nueva localización cromosómica.

Interesantemente, Pr77 no es exclusivo de LITc ni de *T. cruzi* dado que está presente y conservado en diferentes especies de tripanosomátidos y entre LINE (LITc *e ingi*) y SINE (*NARTc* y *RIME*). Además, Pr77 también está presente en los elementos degenerados DIRE y SIDER por lo que se ha sugerido que tenga un papel universal (Requena et ál. 2008). A esto se suma el hecho de que, como se mencionó anteriormente, los retrotransposones se acumulan en regiones de inversión génica que, en tripanosomátidos, son los lugares de inicio de la transcripción génica por lo que se ha postulado que Pr77 pueda ser responsable de la transcripción de genes adyacentes y policistrones (Heras et ál. 2007).

Corriente abajo de Pr77 y arriba de la secuencia codificante de la proteína NLITc se localiza una secuencia de autoprosesamiento 2A similar a las víricas. Datos experimentales demuestran que

esta secuencia es funcional *in vitro* e *in vivo* y que, tanto en *T. cruzi* como en los virus que la portan, actúa controlando la traducción (Heras et ál. 2006). En LITc, la secuencia 2A podría controlar la capacidad de movilidad del elemento dado que, al localizarse corriente arriba y en fase con la secuencia codificante de todas las proteínas que codifica el retroelemento, estaría, probablemente, determinando la abundancia de los productos de traducción que median la movilización del elemento. El dominio consenso de la secuencia 2A no está restringido a *T. cruzi* sino que también está presente en el dominio N-terminal de la endonucleasa codificada por elementos de tipo LINE de tripanosomátidos como *Trypanosoma congolensis*, *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma vivax* (Heras et ál. 2006).

Otro ejemplo del diálogo entre MGE y el genoma que los hospeda es la adquisición de la función AP por los LINE. De hecho, la sobreexpresión de la endonucleasa AP codificada por LITc de *T. cruzi* permite al parásito vivir en un contexto rico en daunorubicina y tras exposición a dosis letales de radiación gamma (Olivares et ál. 2003). Por otro lado, la endonucleasa AP puede permitir al hospedador influir en las inserciones *de novo* de LINE, dirigiéndolas a posiciones genómicas específicas pobres en genes, en lugar de promover las inserciones aleatorias que pueden implicar efectos deletéreos. En resumen, el equilibrio entre la adquisición de funciones del hospedador por el retroelemento y viceversa puede llevar a renombrar los llamados elementos móviles *parásitos* a elementos *simbiontes*.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a la descripción de LITc, así como a las entidades financiadoras su apoyo. Este trabajo está actualmente financiado por los proyectos: Plan Nacional de I + D + i BFU2007-65095/BMC, BFU2007-64999/BMC, Proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía CVI 1227, Red de enfermedades Tropicales RETIC RD06/0021-0014.

Bibliografía

- GARCÍA-PÉREZ, J. L., C. I. GONZÁLEZ, M. C. THOMAS, M. OLIVARES, y M. C. LÓPEZ. «Reverse transcriptase activity in a protein encoded by the non-LTR retrotransposon from *T. cruzi*». *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (12) (2003): 2692-2701.
- HERAS, R. S., M. C. LÓPEZ, M. OLIVARES, y M. C. THOMAS. «The L1Tc non-LTR retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* contains an internal RNA-pol II-dependent promoter that strongly activates gene transcription and generates unspliced transcripts». *Nucleic Acids Research* 35 (7) (2007): 2199-2214.
- HERAS, R. S., M. C. THOMAS, F. MACÍAS, M. E. PATARROYO, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «Nucleic acids binding properties of the C2-L1Tc Nucleic Acid Chaperone encoded by L1Tc Retrotransposon». *Biochemical Journal* 424 (3) (2009): 479-490.
- HERAS, S., M. C. LÓPEZ, J. L. GARCÍA-PÉREZ, S. MARTÍN, y M. C. THOMAS. «The C-terminal domain of the L1Tc non-LTR retrotransposon from *Trypanosoma cruzi* contains two C2H2 zinc-finger motifs endowed with nucleic acid chaperone activity». *Molecular and Cellular Biology* 25 (21) (2005): 9209-9220.
- HERAS, S., M. C. THOMAS, M. GARCÍA, P. DE FELIPE, J. L. GARCÍA-PÉREZ, M. RYAN, y M. C. LÓPEZ. «L1Tc non-LTR retrotransposons from *Trypanosoma cruzi* contain a functional viral-like self-cleaving 2A sequence in frame with the active proteins they encode». *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63 (12) (2006): 1449-1460.
- MARAÑÓN, C., M. C. THOMAS, C. PUERTA, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation». *Biochemica et Biophysica*, acta 1490 (2000): 1-10.
- MARTÍN, F., C. MARAÑÓN, M. OLIVARES, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the ape family of DNA repair enzymes». *The Journal of Biological Chemistry* 247 (1) (1995): 49-59.
- OLIVARES, M., C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «The open Redding frame 1 of the L1Tc retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* codes for a protein with apurinic-apyrimidinic nuclease activity». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (40) (1997): 25224-25228.
- OLIVARES, M., M. C. THOMAS, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «The L1Tc, Long Interspersed Nucleotide Element from *Trypanosoma cruzi*, encodes a protein with 3'-phosphatase and 3'-phosphodiesterase enzymatic activities». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (34) (1999): 23883-23886.
- OLIVARES, M., M. C. THOMAS, A. LÓPEZ-BARAJAS, J. M. REQUENA, J. L. GARCÍA-PÉREZ, S. ÁNGEL, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «Genomic clustering of the *Trypanosoma cruzi* non-long terminal L1Tc retrotransposon with defined interspersed repeated DNA elements». *Electrophoresis* 21 (14) (2000): 2973-2982.
- OLIVARES, M., J. L. GARCÍA-PÉREZ, M. C. THOMAS, S. HERAS, y M. C. LÓPEZ. «The non-LTR retrotransposon L1Tc from *T. cruzi* codes for a protein with RNaseH activity». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (31) (2002): 28025-28030.
- OLIVARES, M., J. L. GARCÍA-PÉREZ, P. BRIONES, M. C. LÓPEZ, y M. C. THOMAS. «The endonuclease NL1Tc encoded by the LINE L1Tc from *Trypanosoma cruzi* protects parasites from daunorubicin DNA damage». *Biochimica and Biophysica*, acta, 1626 (2003): 25-32.

- REQUENA, J. M., C. FOLGUEIRA, M. C. LÓPEZ, y M. C. THOMAS. «The SIDER2 elements, interspersed repeated sequences that populate the Leishmania genomes, constitute subfamilies showing chromosomal proximity relationship». *BMC Genomics* 9 (2008): 263.
- THOMAS, M. C., F. MACIAS, C. ALONSO, y M. C. LÓPEZ. «The biology and evolution of transposable elements in parasites», *Trends in Parasitology* 26 (2010): 350-362.
- THOMAS, M. C., M. OLIVARES, M. ESCALANTE, C. MARAÑÓN, M. MONTILLA, S. NICHOLLS, M. C. LÓPEZ. y C. PUERTA. «Plasticity of the H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*», *Acta Tropica* 75 (2000): 203-210.

10. DEXH RNA helicasa en *Leishmania* y su potencial función en la traducción

*Enrique Martínez Carretero, Daniel Deniz García,
Raquel Afonso Leshman y Basilio Valladares Hernández*

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales

y Salud Pública de Canarias

Universidad de La Laguna (España)

10.1. Introducción

Los parásitos protozoos del género *Leishmania* causan un espectro de enfermedades tropicales y subtropicales conocidas como leishmaniosis. Varios cientos de millones de personas de 88 países están actualmente expuestos a esta enfermedad. Está causada por parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania* y se transmite a los vertebrados por medio de un *Phlebotomidos*.

Los protozoos parásitos del género *Leishmania*, pertenecen a los *trypanosomatidos* (del orden *Kinetoplastida*). Exhiben ciclos biológicos complejos, con diversas etapas de desarrollo que se alternan entre los hospedadores vertebrados e invertebrados. La leishmaniosis puede cursar con cuadros patológicos muy diferentes: desde úlceras en la piel que se resuelven espontáneamente a infecciones mortales de los órganos internos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que hay alrededor de dos millones de casos nuevos de leishmaniosis cada año en el mundo.

10.2. Relación *Leishmania* hospedador

La infección por *Leishmania* comienza con la introducción de la forma infecciosa, el promastigote metacíclico, en la piel por la picadura de un *Phlebotomo* infectado; una vez dentro del hospedador mamífero, los promastigotes invaden a los macrófagos y se diferencian de la forma amastigote en que son las formas proliferativas dentro del hospedador vertebrado.

La infección en humanos está causada por entre 20 y 30 especies. Entre las principales especies patógenas está el complejo *L. donovani* con tres especies (*L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*), el complejo *L. mexicana* con tres especies (*L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y el subgénero *Viannia* con cuatro especies principales [*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana*].

Estos parásitos infectan a los fagocitos profesionales (neutrófilos, monocitos y macrófagos), así como a las células dendríticas y fibroblastos. Las principales células huésped son los macrófagos, en el que multiplican, provocando la ruptura de la célula y extendiéndose a células no infectadas. La presencia de los macrófagos en todos los tejidos del cuerpo hace que estos parásitos tengan un gran potencial para dañar diferentes órganos. En la dermis, causan la forma cutánea de la enfermedad (que puede ser localizada o difusa); en la mucosa, causan la leishmaniosis mucocutánea y la propagación metastásica de la infección al hígado y bazo producen la leishmaniosis visceral o Kala azar. Los parásitos también pueden invadir otros órganos, tales como los ganglios linfáticos, médula ósea, pulmones y, en raros casos, pueden incluso llegar al cerebro.

Las especies son morfológicamente indistinguibles y solo se pueden diferenciar por análisis de isoenzimas, métodos moleculares o con anticuerpos monoclonales.

Los factores que motivan la aparición de una u otra forma de patología incluyen la especie de *Leishmania*, la localización geográfica y la respuesta inmune del hospedador. La leishmaniosis cutánea se caracteriza por la presencia de una o varias lesiones en la zona de la picadura del insecto vector, mientras que las personas con leishmaniosis visceral suelen presentar fiebre, pérdida de peso y hepato y esplenomegalia. Suele ir acompañado de anemia y niveles bajos de leucocitos y plaquetas. Algunos pacientes desarrollan tras la patología visceral manifestaciones dérmicas denominadas *post kala-azar*. La leishmaniosis visceral se ha manifestado también como una infección oportunista en pacientes con VIH.

Más del 90% de los casos de leishmaniosis visceral se concentran en la India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil. También podemos encontrar leishmaniosis en América desde el norte de Argentina a Texas (excepto Uruguay, Chile o Canadá), sur de Europa, medio este de Asia y en África, especialmente en el este y norte.

Como ya se ha comentado, el tipo de patología que causa depende de la especie de *Leishmania*, el genotipo y el estado nutricional del hospedador, el vector transmisor y factores ambientales y sociales. Diferentes especies del género *Leishmania* inducen síntomas distintos, pero pacientes que están infectados por la misma especie tienen diferentes síntomas y pueden diferir en su respuesta a la terapia. La base de esta variación es no bien conocida, aunque se han identificado varios genes que podrían estar involucrados. Estudios en modelos murinos de leishmaniosis por *Leishmania major* indican que la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad podría estar determinada por el tipo de Células T que se active. La progresión de la enfermedad parece estar asociado con una respuesta por linfocitos T helper tipo 2, que producen Interleucina-4 (IL-4), mientras que la resolución de la enfermedad parece correlacionar con un mayor nivel de activación de células Th1 productoras de Interferon- γ (IFN- γ). Sin embargo, se sabe que otros factores inmunológicos también están involucrados en la respuesta del hospedador. La producción de IL-10 por células T reguladoras podría explicar que se produzca enfermedad en ratones que presentan un tipo de respuesta Th1. Otros componentes del sistema inmunológico producidos por otras células del sistema inmunológico tienen también un papel importante, la IL-12, que es liberada por los macrófagos; es un importante factor de estimulación de la respuesta de Th1 frente a leishmaniosis, mientras que las células dendríticas y los neutrófilos influyen en la modulación de las respuestas Th1 o Th2 frente a la infección. Los estudios realizados revelan la complejidad de la respuesta inmune en relación con la susceptibilidad o resistencia a la leishmaniosis.

Resultados de nuestro laboratorio empleando el modelo murino infectado con *Leishmania amazonensis* muestran que la respuesta de tipo celular o humoral influye en la susceptibilidad de los diferentes órganos para ser infectados; sin embargo, la condición para la eliminación de parásitos de estos órganos está directamente relacionada con la producción de óxido nítrico.

Como se puede comprobar es muy difícil integrar en un simple modelo funcional la respuesta frente a este parásito ya que para su eliminación es necesaria la interacción entre diferentes componentes del sistema inmune.

10.3. *Leishmania* en su entorno molecular

A pesar de la distancia geográfica y evolutiva (las especies de tripanosomatidos divergieron hace más de 200 millones de años) que presentan las diferentes especies de *Leishmania*, las diferencias morfológicas significativas en las etapas de su ciclo de vida y en la variedad de manifestaciones de la enfermedad, el análisis comparativo de los genomas, han permitido identificar aproximadamente 6.200 genes conservados entre *Trypanosomatidae* y *Leishmania*, y más de 1.000 genes se encontraron únicamente en *Leishmania*. Si comparamos entre especies del género *Leishmania* como son *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*, el 99% de sus genes están conservados.

Cuando se analizan los aminoácidos traducidos a partir de las regiones codificantes, hay una homología del 92% entre *L. major* y *L. infantum* y un 77 entre *L. braziliensis* frente a *L. infantum* y *L. major*.

Esta alta homología a nivel genómico nos lleva a que debemos estudiar el procesamiento de las proteínas de estas especies para poder explicar las diferencias morfológicas y patológicas que presentan.

Desde el punto de vista molecular los tripanosomatidos poseen mecanismos únicos para la expresión de sus genes, tal como transcripción policistronica, *trans splicing* y la implicación de Pol I en la síntesis del mRNA y *RNA editing*. Por ejemplo el genoma de *L. major* cuenta con 32,8 megabases (Mb) de ADN distribuidos en 36 cromosomas relativamente pequeños de entre 0,28-2,8 Mb de tamaño. Los genomas de tripanosomatidos se organizan en grandes grupos de genes (*large polycistronic gene clusters*, PGC), que contienen decenas o centenares de genes que codifican proteínas dispuestos secuencialmente en la misma hebra de ADN. Esta inusual organización del genoma fue descrita por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major* que contiene 85 genes organizados en dos PGC con 32 genes por un lado y los 53 genes restantes agrupados en otro PGC. Esta organización en PGC ha quedado confirmada con la publicación de los genomas completos de diferentes especies. Por otro lado, los genes que codifican los ARN ribosomales se encuentran

entre los PGC y la mayoría de los genes de RNA de transferencia se organizan en grupos de 2 a 10 genes, en los extremos y pueden contener otros genes que son transcritos por POL III.

La mayoría de los organismos controlan la expresión de sus genes a nivel de la iniciación de la transcripción. Sin embargo, existen otros mecanismos de regulación durante el proceso de transcripción (a nivel de la estructura de la cromatina), el procesamiento del ARN, por la estabilidad de los transcritos, el transporte del ARN o durante la traducción.

Estos tripanosomatidos son organismos diploides, aun cuando algunos cromosomas son el aneuploides. Además, los extremos de los cromosomas en los tripanosomatidos contienen la repetición telomérica GGGTTA, mientras que las regiones subteloméricas se componen de elementos repetidos variables, que son responsables de una parte importante de los polimorfismos del tamaño observados entre los cromosomas homólogos. La inmensa mayoría de los genes que codifican sus proteínas carece de intrones. La transcripción es policistrónica, a diferencia de la mayoría de organismos eucariotas y sus cromosomas contienen generalmente por lo menos dos PGC. Los genes de una unidad policistrónica generalmente codifican proteínas funcionalmente relacionadas, lo que los diferencia de los operones de bacterias y nematodos. Una vez realizada la transcripción se produce la maduración de los ARNm que ocurre por *trans-splicing*, proceso que consiste en el corte y unión de un miniexon o Spliced Leader (SL) de 39 nucleótidos en el extremo 5' de los mRNA y polyadenilación del otro extremo. Todos los genes que forman parte de un PGC se transcriben simultáneamente, como consecuencia de la transcripción policistrónica; sin embargo, los mRNA maduros de genes adyacentes presentan concentraciones muy diversas o incluso su expresión depende del estado en que se encuentre el parásito. Esto es debido a que en tripanosomatidos la regulación es principalmente postranscripcional y depende en gran medida del procesamiento y estabilidad de los mRNA, jugando las secuencias no codificantes de la región de 3' (3'-UTR) ARN un papel fundamental en la expresión de los genes.

El ADN nuclear en las células eucarióticas se organiza en una estructura compleja formada por proteínas y ADN que se llama cromatina. La subunidad fundamental de cromatina es el nucleosoma,

integrada por un octamero de proteínas pequeñas básicas llamadas histonas alrededor de las cuales DNA se enrolla. El octamero de histonas consiste en dos copias cada una de las proteínas conocidas como histonas H3, H4, H2A y H2B. Finalmente una histona diferente, denominada histona H1, une los nucleosomes, y ayuda así a estabilizar la cromatina. El ADN de esta forma queda condensado formando la cromatina y la acción de las histonas H1 hace que aumente o disminuya esa condensación a lo largo del ciclo celular. Los cambios dinámicos en la estructura de la cromatina desempeñan un papel muy importante en la regulación de procesos ADN-dependientes tales como la transcripción. Generalmente los nucleosomas actúan como represores de la transcripción ya que impide la unión de los factores de la transcripción a las regiones del promotor. Sin embargo, los nucleosomas pueden aproximar secuencias alejadas del ADN y permitir activar así su transcripción. Modificaciones covalentes tales como la acetilación y la metilación también influyen en la transcripción: la acetilación se asocia a activación, mientras que la metilación se puede relacionar con activación o la represión. Las histonas de los tripanosomatidos son extremadamente divergentes de las descritas en otros organismos, pero, al igual que en otros organismos, los nucleosomas constituyen la unidad estructural básica de la cromatina. Cuando se analiza por microscopia electrónica la cromatina de los tripanosomatidos, se puede observar que no hay condensación durante mitosis ni se forman las fibras de 30 nanómetros que se encuentran comúnmente en eucariotas superiores. De aquí se deduce que la histona H1 puede ser especialmente relevante en dichos procesos. Cuando hemos analizado la histona H1 de *Leishmania braziliensis*, hemos observado que la región central presenta el motivo K-[K/R]-A-A-[A/P] repetido nueve veces. Estos pentapéptidos también se encuentran en proteínas homólogas pertenecientes a otros organismos unicelulares repetidos en al menos en cinco ocasiones como en *Bordetella pertussis*, *Chlamydea pneumoniae* y *Streptomyces coelicolor* y, curiosamente, no está presente en las proteínas de H1 de eucariotas superiores.

El papel funcional de este pentapéptido en la realización de ensayos de unión a ADN llevó a la conclusión de que la región central de la histona H1 de *L. braziliensis* parece esencial para la

unión con el ADN y probablemente está involucrado en la realización de la funcional atribuida a las proteínas histonas H 1.

Por otro lado, la producción constitutiva de transcritos hace que la regulación de la expresión génica esté fundamentalmente basada en la estabilidad de los ARNm y en la eficiencia con la que son traducidos. En otros microorganismos se ha visto que en estos procesos están involucradas una serie de proteínas responsables de esta regulación como son el factor de elongación 2 y el IF4a (DEXH helicadas), entre otras.

La gran familia de proteínas helicadas son proteínas conservadas, cuyo papel es fundamental en un gran número de procesos celulares relacionados con el procesamiento del ADN y el ARN, algunos de los cuales están involucrados en procesos patológicos para humanos como cáncer y procesos de autoinmunidad. Su típica función es separar las hebras tanto de ADN como de ARN, proceso que requiere la energía procedente de la hidrólisis de ATP. También participan en otros procesos vitales para el correcto funcionamiento celular, como es el procesamiento de ARNm y ARNr, su transporte y degradación y en el inicio de la traducción. En células humanas se encuentra formando complejos con ARN nucleares y complejos de ribonucleoproteínas. Un grupo de estas proteínas juega un papel fundamental en la exportación nuclear de ARN virales de retrovirus como HIV tanto sin procesar como parcialmente procesado. Otra importante función es su capacidad de unirse a ADN y, en especial, a regiones promotoras, lo cual las hace proteínas primordiales en la regulación transcripcional. Este hecho ha llevado a algunos autores a demostrar su relación con procesos cancerosos, ya sea por su acción represora, mediante la unión a determinados promotores como el promotor p16 INK4a o por su sobreexpresión como en el caso del tumor colorrectal y su capacidad de inhibir a la proteína supresora de tumores de mama BRCA1. Se ha relacionado con la proteína histona H2AX formando parte de un complejo con actividad reparadora de ADN. Por último, participan en el desarrollo de enfermedades de origen autoinmune como el lupus eritomatoso sistémico actuando fragmentos de esta proteína como autoantígenos.

Si analizamos la secuencias de aminoácidos de estas familias de proteínas, observamos que presentan en su extremo aminoterminal

dos dominios de unión a ARN de doble cadena, una zona central formada por siete motivos que constituye el dominio catalítico típico de helicasa y una región carboxiloterminial con dominios de unión a ácidos nucleicos de cadena simple, que es rica en aminoácidos glicinas (RGG box).

En nuestro laboratorio hemos aislado, secuenciado y caracterizado el gen de la proteína DEXH helicasa de *L. braziliensis*. Además hemos purificado la proteína recombinante y obtenido anticuerpos específicos frente a esta proteína. Los estudios de localización que hemos realizado nos indican que se trata de una proteína de localización citoplasmática, y que se acumula en unos gránulos citoplasmáticos compatibles con los denominados *gránulos de estrés*. Durante el estrés provocado por el choque del calor, el estrés oxidativo, la isquemia o la infección viral, la traducción del mRNA se reprograma y permite la síntesis selectiva de las proteínas respuesta a estrés y de reparación. Bajo estas condiciones, la traducción de los genes de la economía doméstica celular son secuestrados, y los mRNA sin traducir se acumulan en una estructuras citoplasmáticas conocidas como *gránulos de estrés* (SG). La formación SG se activa por la detención de la iniciación de la traducción en el ribosoma que implica la fosforilación del eIF2 o la inhibición de la función helicasa del eIF4A. A su vez la fosforilación del eIF2 puede regularse por varias vías, entre ellas por las proteínas quinasas inducidas por el estrés. La sobreexpresión de algunas proteínas de unión a mRNA asociadas a los SG puede inducir o inhibir la agregación de los SG. Se presume que la sobre expresión de estas proteínas puede perturbar el equilibrio de distribución de los mRNA entre los polysomas y los complejos de polysomas-libres del ribonucleoproteín (RNP) e inducir así la formación de SG. En condiciones normales, la mayoría de las proteínas de unión a ARN están implicadas en diferentes procesos del metabolismo del mRNA, tales como la traducción, la degradación, la estabilidad y la localización intracelular específica.

También sabemos que los SG muestran un flujo dinámico de proteínas y ARNm y que son los sitios en los cuales los RNP pueden experimentar remodelaciones estructurales y pueden ser almacenados, devueltos a los polysomas para su traducción o ser empaquetados temporalmente para la degradación.

Los ARN inmediatamente después de la transcripción se unen a las proteínas de unión a ARN y forman los RNP. Los RNP formados son esenciales en la localización celular, el procesamiento, la función y el destino del ARN. Pues bien, todo este proceso está regulado principalmente por las proteínas ARN helicasas, que tienen la capacidad de incorporar o retirar selectivamente proteínas de estos complejos.

La mayoría de las ARN helicasas pertenecen a la superfamilia 2 (SF2), que se divide en tres subfamilias en función del motivo II: DEAD, DEAH y DEXH.

Las proteínas de DEX (H/D) tienen capacidad para desenrollar el ARN de doble cadena, pero también están implicadas en remodelar los RNP. Presentan una región altamente conservada que están relacionados con el procesamiento del ARN como la transcripción, el premRNA *splicing*, la biogénesis del ribosoma, la exportación del ARN y la iniciación de la traducción. Pero también presentan unos dominios menos conservados, localizados en las regiones amino y carboxilo terminal, que les aportan características y funciones específicas a cada una de estas enzimas. Estos dominios son responsables de la especificidad del sustrato, de la localización subcelular y de los requisitos de cofactores. Por tanto, conocer los mecanismos de acción de estas proteínas será fundamental para entender el procesamiento del ARN y de la relación ARN-proteínas de unión. Los resultados obtenidos hasta ahora nos indican que la localización es citoplasmática, la proteína recombinante tiene capacidad de unirse a ADN y ARN de forma independiente de ATP y puede desenrollar ARN de doble cadena y su cinética es ATP dependiente. También hemos podido confirmar su participación en los gránulos de estrés de *Leishmania braziliensis*.

Bibliografía

- CDC CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. www.CDC.gov.
- LIPOLDOVÁ, M., y P. DEMANT. «Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis». *Nature review genetics* (7) (2006): 294-305.
- LYNN, M. A., y W. ROBERT McMASTER. *Leishmania: conserved evolution – diverse diseases Trends in Parasitology*, vol. 24, núm. 3.

- MARTÍNEZ-CALVILLO, S., J. C. VIZUET-DE-RUEDA, L. E. FLORENCIO-MARTÍNEZ, R. G. MANNING-CELA, y E. E. FIGUEROA-ANGULO. «Gene Expression in Trypanosomatid Parasites». *J. Biomed Biotechnol* (2010).
- MARTÍNEZ, E., M. C. THOMAS, V. ALONSO, E. CARMELO, A. C. GONZALEZ, B. J. DEL CASTILLO VALLADARES. *Parasitology* 88 (2) (2002): 199-203.
- RAJKOWITSCH L, D. CHEN, S. STAMPFL, K. SEMRAD, C. WALDSICH, O. MAYER, M. F. JANTSCH, R. KONRAT, U. BLÄSI, y R. SCHROEDER. «RNA annealers and RNA helicases». *RNA Biol.* 4 (3) (noviembre de 2007): 118-130.
- SCHNEIDER, S., y B. SCHWER. *J. Biol. Chem.* 276 (2001): 21184-21191.
- The DEAD-box protein family of RNA helicases Gene*, vol. 367 (15 de febrero de 2006): 17-37.

11. Aproximación al desarrollo de una vacuna sintética contra *Schistosoma mansoni*

Oscar Noya González, Sandra Losada Gallegos,
Henry A. Bermúdez Ramírez, María Angelita Lorenzo Sarmiento,
Marilyan Toledo Alfonso y Belkisyolé Alarcón de Noya
Secciones de Biohelmintiasis e Inmunología del Instituto de Medicina
Tropical, Escuela de Medicina Luis Razetti, Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela (Caracas)

11.1. Introducción

La esquistosomiasis es la trematodiasis humana más importante y, como problema de salud pública, la segunda parasitosis en importancia después de la malaria. Es causada por cinco especies del género *Schistosoma*. Se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial afectando a 74 países e infectando a 200 millones de personas de 600 millones expuestas al riesgo. Las especies que infectan al hombre son: *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. mekongi*, *S. intercalatum*, *S. bovis*, *S. mattheei* y *S. guineensis*, pero solo las tres primeras constituyen problemas importantes de salud pública para los humanos (WHO 2002; Losada et ál. 2005). Es una parasitosis asociada al contacto entre el hombre y algunos animales con cuerpos de agua dulce, contaminados con larvas acuáticas denominadas cercarias, provenientes de caracoles que a su vez fueron infectados por heces del hombre o de reservorios animales. El hombre es el principal responsable de su transmisión, a excepción de *S. japonicum* en el cual numerosas especies de animales juegan un papel fundamental en la epidemiología (zooantroponosis). La epidemiología cambiante en la esquistosomiasis está determinada por distintos factores: las especies de *Schistosoma*, los hospederos vertebrados que afecta, el mecanismo de infección de las aguas (heces u orina), los factores socioculturales (pobreza, migraciones, costumbres) y los cambios ambientales (lagos artificiales y represas, dispersión de los caracoles, etc.), entre otros. Estas tres condiciones, contaminación fecal de las aguas, caracoles y uso del agua por el hombre, son los

factores que determinan la persistencia de la esquistosomiasis en las áreas endémicas, independientemente de su ubicación geográfica.

Schistosoma mansoni es el único representante en América, distribuyéndose por Brasil, Venezuela, Surinam y algunas islas del Caribe como Guadalupe, Martinica, República Dominicana, Puerto Rico, Santa Lucía y Antigua. En África, se ubica en el delta del Nilo y en toda la región central y sur del continente, así como en el Oriente Medio. El hospedador intermediario es un caracol planorbideo del género *Biomphalaria*, siendo *B. alexandrina*, *B. sudanica*, *B. pfeifferi* y *B. choanomphala* los representantes en África y *B. glabrata*, *B. straminea* y *B. prona* en América. Si bien *S. mansoni* puede infectar a monos, mandriles y chimpancés en África y ratas en focos aislados en América, el hombre es el principal hospedador definitivo (Kojima y MacDonald 2005).

A pesar de su alta prevalencia y efecto sobre la calidad de vida de los habitantes, es hoy una de las enfermedades desatendidas a nivel mundial. Inicialmente, su control se basó en la eliminación de los caracoles hospedadores intermediarios, con molusquicidas químicos, pero en las tres últimas décadas se ha priorizado la quimioterapia de la población y, en mucho menor grado, las obras de ingeniería sanitaria (puentes, lavaderos, letrinas, suministro de agua potable, etc.). La aparición de resistencia creciente al Praziquantel, único fármaco antiesquistosoma en uso, aunado al alto coste de las obras de saneamiento ambiental, han incentivado el desarrollo de vacunas. Sin embargo, a pesar de los avances, la falta de técnicas de diagnóstico que demuestren cura parasitológica, la ausencia de modelos animales adecuados y marcadores de protección, entre otros, han limitado el desarrollo de una vacuna. Estas han sido tres de las líneas de investigación en las que el equipo de trabajo ha hecho aportes con el fin de aproximarnos al desarrollo y la posterior evaluación de una vacuna.

11.2. El parásito

El complejo ciclo de este parásito comienza con la penetración de las cercarias, que atraviesan la piel de los hospedadores vertebrados que se exponen a aguas dulces, convirtiéndose en los

siguientes estadios larvarios denominados esquistosómulos, que en un plazo de 6 a 10 semanas alcanzan la madurez sexual en el sistema porto-mesentérico al comenzar la oviposición. Los esquistosomas son verdaderos hemoparásitos que, a diferencia de todos los de su *phylum*, presentan sexos separados y habitan apareados en las venas mesentéricas y la porta, eliminando sus huevos muy cerca de las paredes del intestino grueso y el recto. De este modo, los huevos son depositados en los tejidos de estos órganos, siendo responsables de la patología a este nivel. Aquellos huevos que se desprenden y son arrastrados por la corriente sanguínea portomesentérica terminan deteniéndose y obstruyendo las vénulas portales. Si bien los vermes adultos llegan a consumir cantidades sustanciales de sangre, uno de los condicionantes de anemia y, en segundo lugar, las cercarias-esquistosómulos pueden ocasionar manifestaciones cutáneas y pulmonares, su papel patogénico es secundario en ambos casos. Son los huevos los principales causantes de la patología, al condicionar la formación del granuloma bilharziano, evento central de la inmunopatología de la esquistosomiasis y cuya expresión clínica dependerá de los tejidos más afectados: intestino (esquistosomiasis intestinal), hígado (esquistosomiasis hepatointestinal y hepatoesplénica) y, con menor frecuencia, afecciones pulmonares y neurológicas. Si bien sigue siendo controversial (Abath et ál. 2006), la mayoría de los autores señalan que la formación del voluminoso granuloma inicial con predominio de eosinófilos y posterior fibrogénesis está condicionada por una respuesta de tipo TH₂, en la que predomina la producción de IL-4 e IL-13, que estimulan, a nivel de los macrófagos y fibroblastos, la formación de colágeno por el aminoácido prolina a partir de la L-arginina. Por el contrario, el IFN γ y la IL-12 inhiben este proceso, así como la presencia del receptor soluble para IL-13 tal como ha sido demostrado en el suero de pacientes africanos (Mentink-Kane et ál. 2004). La disminución progresiva del tamaño de los granulomas con predominio de linfocitos permite una mayor sobrevivencia del hospedero y es consecuencia de un proceso de inmunomodulación determinado por una respuesta predominante TH₁. Los granulomas hepáticos condicionan el bloqueo progresivo de la circulación portal, que conlleva a los cuadros graves de hipertensión portal que se traducen en

esplenomegalia, várices esofágicas y hemorroidales, cuya ruptura asociada o no a la ascitis son causa de muerte en la fase crónica de la enfermedad (Kojima y MacDonald, 2005).

11.3. Interacción parásito-hospedero

Este parásito exhibe un rico espectro de complejos y eficientes mecanismos de evasión que le permiten resistir a la respuesta inmune (RI) de su hospedador. Entre ellos se destacan el esquistosómulo al producir PG_2 (prostaglandina que inmoviliza las células de Langerhans que pretenden atacarlo) (Angeli et ál. 2001) y en su proceso de maduración hasta el estadio adulto, este parásito incrementa sus máximas capacidades defensivas a través de mecanismos tales como la secreción-excreción de antígenos solubles consumidores de anticuerpos y complemento, disfraz o mimetismo antigénico produciendo moléculas similares a las de su hospedero y tomando de él moléculas (grupos sanguíneos, fibronectina, albúmina, etc.) con las que se recubre y esconde antígenos vitales para el parásito (Cocude et ál. 1999); la adquisición de una doble membrana plasmática (heptalaminar), que le permite desprender su capa externa cuando se fijan anticuerpos y así evitar su destrucción al fijar complemento; la expresión de proteasas en su superficie con capacidad de digerir los anticuerpos que se fijan en la membrana plasmática (Aslam et ál. 2008) y finalmente un grupo de enzimas (glutacion-peroxidasa, superóxido-dismutasa, etc.) con capacidad de neutralizar los radicales de oxígeno, tóxicos para el verme adulto (Wilson et ál. 2007).

Sin embargo, hay evidencias epidemiológicas (Hagan et ál. 1991) y experimentales de mecanismos efectores, con capacidad de destruir al parásito. Los animales infectados son resistentes a nuevas infecciones, que es lo que se denomina *inmunidad concomitante*, que consiste en la incapacidad de destruir los gusanos ya instalados, mientras que se establece la capacidad de eliminar las cercarias-esquistosómulos que tratan de invadir al hospedador ya infectado.

La RI en esquistosomiasis está asociada con un predominio de una respuesta TH_2 , caracterizada por altos niveles de IgE, aumen-

to de IL-4 y eosinofilia; sin embargo en los humanos se ha definido más recientemente como una TH₂ *modificada*, con altos niveles de IL-10, IgG₄ y moderados para IgE (Capron et ál. 2005). Se ha postulado que los antígenos alfa-1 y omega-1 del huevo, son los responsables de modular la RI hacia un patrón TH₂ al inducir la secreción de IL-4 y la degranulación de los basófilos en humanos y ratones (Everts et ál. 2009). En humanos, se ha demostrado la presencia de células T reguladoras y macrófagos supresores, que pudieran ser los responsables de modular la RI y los procesos inflamatorios (Aldrey et ál. 1988), no solo contra el propio parásito sino también contra otros antígenos de agentes infecciosos y no infecciosos (Maizels y Yazdanbakhsh 2003). En general se acepta que la inmunidad protectora está dirigida principalmente contra los esquistosómulos, siendo más vulnerables a la inmunidad protectora durante las primeras 72 horas pospenetración de las cercarias. En el caso de los vermes adultos solo se ha podido demostrar una inmunidad antifecundidad que, al disminuir la producción de huevos, disminuye la patología.

La respuesta inmune protectora en el humano parece ser de predominio TH₂. Se considera que la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC: *antibody dependent cytotoxicity*) en la que intervienen anticuerpos de las clases IgG (IgG₁ e IgG₃) e IgE y células (eosinófilos, macrófagos, plaquetas, mastocitos y neutrófilos) es el mecanismo efector más eficiente contra los esquistosomas. Las IgM e IgG tienen un papel dual ya que pueden actuar tanto como anticuerpos protectores como bloqueadores, como son las subclases IgG₂ e IgG₄, que actúan como anticuerpos bloqueadores y que corresponden a los isotipos predominantes en niños, de allí su mayor susceptibilidad. Se ha determinado que, más que los niveles individuales de cada isotipo, es el balance IgE/IgG₄ el determinante en el grado de resistencia a la infección. La IgA también ha sido relacionada con protección, especialmente relacionada con anticuerpos antifecundidad en humanos. Adicionalmente, se ha postulado que el TNF- α y el óxido nítrico (TH₁) producidos por las células endoteliales especialmente en pulmón juegan un papel accesorio en la destrucción de los esquistosómulos en su tránsito desde la piel hasta el hígado (Wynn et ál. 1994).

11.4. Antígenos como candidatos vacunales

Si bien se han utilizado antígenos crudos de estadios de cercaria-esquistosómulo y vermes adultos, los resultados de protección han sido muy bajos, con excepción del uso de cercarias irradiadas. Con esta estrategia se han logrado las más altas eficacias (48-91%) (Kariuki et ál. 2004), no obtenidas hasta ahora con antígenos purificados. A pesar de su alta eficacia, esta aproximación no es factible de ser aplicada en humanos por los riesgos que conlleva. Es por ello que se ha venido haciendo énfasis en moléculas puras o segmentos de los mismos, producidos como moléculas recombinantes, péptidos sintéticos o como vacunas de ADN (Noya et ál. 2007).

La selección de antígenos o subcomponentes de valor protector se ha basado en cuatro premisas fundamentales:

1. Reconocimiento diferencial de antígenos entre hospedadores permisivos versus no permisivos y entre personas resistentes y susceptibles.
2. Bloqueo de moléculas funcionales presentes tanto en adultos como en la cercaria/esquistosómulo. Entre ellas se encuentran enzimas responsables de la nutrición y metabolismo (catepsina B, D, L, gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa-G3PDH, aspariginil endopeptidasa, triosa-fosfo-isomerasa-TPI); enzimas responsables de la detoxificación de radicales de oxígeno (glutation-S-transferasa-Sm28GST, tioredoxina, superóxido-dismutasa-SOD); enzimas involucradas en la invasión tisular (elastasa, catepsina B, etc.).
3. Reconocimiento y alteración de moléculas estructurales, particularmente de componentes de la membrana plasmática (paramiosina, tetraspaninas, Sm23).
4. En nuestro caso, hemos añadido como estrategia la selección de moléculas que interactúan con otras, pudiendo interferir simultáneamente en varios puntos del metabolismo del gusano, bajo el concepto del *interactoma*.

CUADRO 11.1: Antígenos candidatos a vacunas contra *Schistosoma mansoni*

Antígenos candidatos a vacunas contra <i>Schistosoma mansoni</i>							
Antígeno	Tipo	kDa	Localización	Estadio	Descripción	Modelo	Protección %
Glutation S-Transferasa Sm28 GST	Péptido sintético MAP-8 Recombinante	28	Protonefridios Parénquima Tegumento	Adulto Esquistosómulo Huevo	Enzima	Ratón Rata Hámster	30-60
Paramiosina	Recombinante	97	Músculo Tegumento	Adulto Esquistosómulo	Proteína del músculo	Ratón Rata	30
IrV5 Antígeno Vacuna Irradiada	Recombinante	62	Tegumento Músculo	Adulto Esquistosómulo Huevo	Proteína del músculo	Ratón	50-70
Triosa fosfoisomerasa Sm28TPI	Péptido sintético MAP-4	28	Tegumento Parénquima	Adulto Esquistosómulo Huevo	Enzima	Ratón	30-60
Sm23	Péptido sintético MAP-3 cDNA	23	Tegumento	Adulto Esquistosómulo Huevo	Tetraspanina Proteína integral de membrana	Ratón	40-50 31-34
Asparaginil endopeptidasa Sm32	Recombinante	32	Tubo digestivo Protonefridios	Adulto Esquistosómulo Huevo cercaria	Enzima	Ratón	37-53
Sm14	Recombinante	14	Tubo digestivo Tegumento	Adulto Esquistosómulo Huevo	Proteína de unión a ácidos grasos	Ratón	67 (en ratones heterocigotos)
G3PDH	Péptido sintético MAP	37	Tegumento Parénquima	Adulto Esquistosómulo Huevo cercaria	Proteína citosólica (glucólisis)	Ratón	20-45
SOD GPX	cDNA virus <i>Vaccinia</i> recombinante	NR	Tegumento	Adulto	Enzimas antioxidantes	Ratón	22-60 23-85
Tetraspaninas	TSPI TSP2 Recombinante	NR	Tegumento	Adulto	Proteína integral de membranas	Ratón	34-52 57-64

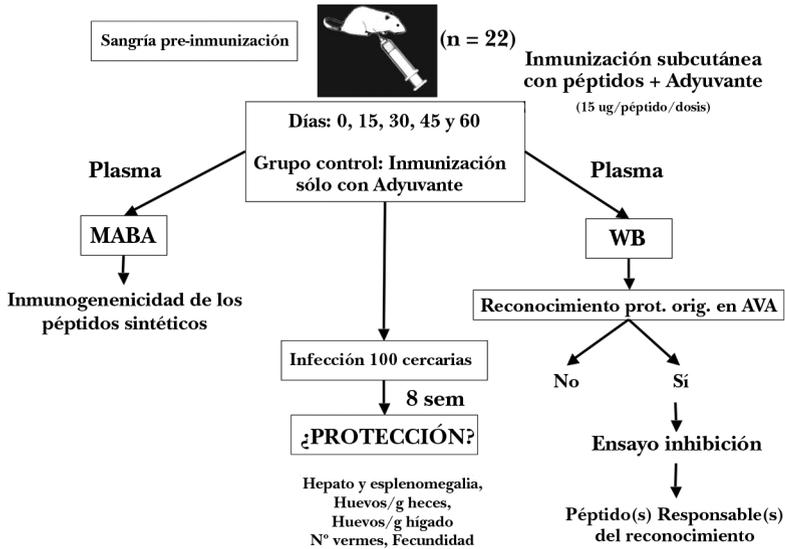
En el cuadro 11.1 se resumen las características más resaltantes de los principales antígenos vacunales estudiados hasta ahora. Sin embargo, las eficacias obtenidas en los modelos animales estudiados no sobrepasan el 40%, con excepción de los resultados preliminares con tetraspaninas, que superan el 50% (Tran et ál. 2006). De todas las moléculas estudiadas, solo la Sm28GST como molécula recombinante ha pasado de los modelos experimentales a humanos, en estudios de protección para *S. haematobium*. Todavía no hay resultados de eficacia de estos estudios en África, si bien ya ha demostrado ser inmunogénica y bien tolerada (Capron et ál. 2005).

11.5. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo

En nuestro caso hemos optado por utilizar la estrategia de síntesis química de péptidos, tal como se ha usado en otros modelos parasitarios con éxito (Patarroyo et ál. 1988). Asimismo, además de las cuatro aproximaciones descritas previamente para definir potenciales blancos inmunoproliféricos, nos hemos planteado que la vacuna debe ser multicomponente, con el objeto de tratar de bloquear o afectar simultáneamente distintas moléculas o vías metabólicas del parásito y minimizar las posibles estrategias de escape inmunológico que pudiera utilizar este complejo parásito. Los antígenos evaluados hasta ahora en nuestro laboratorio en el modelo murino son las catepsinas B (Sm31), D y L, la asparraginil endopeptidasa (Sm32), la Sm28TPI, la Sm28GST, la elastasa y la paramiosina. Se seleccionaron regiones de estas moléculas que cumplieran las siguientes características: ser inmunogénicas según algoritmos predictivos (Antheptot) que determinan las regiones hidrofílicas y expuestas; que correspondan a secuencias heterólogas con la molécula correspondiente del humano; ser buenos epítopes T (Rammensee et ál. 1999) y, en el caso de ser moléculas funcionales y cristalizadas, se priorizaron aquellas regiones cercanas al sitio activo. Como inmunógenos se utilizaron péptidos sintetizados químicamente por la estrategia t-boc y en forma polimerizable al añadir los aminoácidos CG y GC en los

extremos amino y carboxi terminales (Patarroyo et ál. 1988; Noya et ál. 2003). Estos péptidos fueron inoculados individualmente o en mezclas, utilizando Adyuvante Completo (ACF) e Incompleto de Freund (AIF) (esquema 11.1), por vía subcutánea. En dos protocolos de vacunación independientes utilizamos dos adyuvantes que preferencialmente potencian una RI de tipo TH₁, ellos son el oligonucleótido CpG (CpG ODN de Invitrogen, EE. UU.) y cocleato (AFCo1 del Instituto Finlay de Cuba). AFPL1 es un proteoliposoma de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* B vivas y su derivado el cocleato (AFCo1), es uno de los adyuvantes actualmente en estudio (Pérez et ál. 2007). Los péptidos han resultado ser inmunogénicos y en la mayoría de los casos, los anticuerpos generados reconocieron a la molécula originaria (Noya et ál. 2003; Chacón et ál. 2003). De ellas, solo hemos obtenido niveles de protección con péptidos de las moléculas Sm32, Sm28GST, TPI y paramiosina superiores al 50%, utilizando ACF y AIF. Por el contrario, empleando los mismos péptidos, no obtuvimos eficacia cuando se usó como adyuvantes CpG o Cocleato. Los péptidos derivados de la Sm32 y la Sm28GST no solo fueron eficaces en disminuir el número de vermes adultos, sino que también redujeron la fecundidad de los mismos, al disminuir significativamente el número de huevos/verme adulto depositados en hígados e intestinos. En los ensayos realizados no obtuvimos correlación entre títulos de anticuerpos y protección. Este resultado pudiera deberse a la participación de otros mediadores de la RI. Adicionalmente, al comprobar mediante proteómica la presencia de siete isómeros de la Sm28GST, pudiéramos inferir que los anticuerpos generados contra los péptidos de la Sm28GST no reconocen e inhiban a todas las isoformas de este grupo enzimático.

ESQUEMA 11.1: Ensayo de protección de ratones



Nota: MABA: Multiple Antigen Blot Assay; WB: Western Blot; AVA: Antígeno Soluble de Verme Adulto.

A excepción de la paramiosina, todas son moléculas que están también presentes en los humanos, por lo que resolvimos analizar la posible reactividad cruzada con la GST humana. Por *Western blot*, confirmamos que, al menos en el caso de esta enzima, los ratones inmunizados con los péptidos de la Sm28GST no reconocieron a la enzima de origen humano, ni el suero de conejos inmunizados con la GST de origen humano reconocieron a los péptidos de *S. mansoni*.

Debido a la posibilidad de que las regiones seleccionadas no estuvieran conservadas en todos los aislados de esta especie y a que existen muy pocas cepas de laboratorio de *S. mansoni* disponibles en el mundo, decidimos resolver esta interrogante utilizando sueros de animales infectados con otras especies del género *Schistosoma* de los grupos *Mansoni* y *Haematobium*, contra el antígeno de verme adulto (AVA) y los péptidos de *S. mansoni* utilizados en las inmunizaciones. El reconocimiento de algunas de las moléculas y péptidos de *S. mansoni* por sueros de animales infectados con especies de *Schistosoma* alejadas filogenéticamente nos permitió

concluir que las secuencias seleccionadas debían corresponder a regiones conservadas. La mayor reactividad cruzada se observó con *S. rhodaini* y *S. guineensis* (Losada et ál. 2005).

En la búsqueda de nuevos antígenos candidatos a ensayos de vacunación se han realizado estudios en colaboración con el grupo del doctor Ítalo Césari (IVIC, Venezuela), utilizando antígenos del tegumento de *S. mansoni* extraído con butanol y ACF y AIF como adyuvantes. Este material enriquecido en actina y algunas enzimas del tegumento del verme adulto [fosfatasa alcalina (FAL), fosfodiestererasa (FDE o SmNPP-5), fosfatasa ácida (FAC), Ca²⁺-ATPasa y acetilcolinesterasa (AChE) (Cesari, Simpson y Evans, 1981) ha inducido niveles de protección significativos en ratones C57BL/6 (Guidenn Sulbarán 2009)].

Son múltiples las aproximaciones que se pueden plantear para el desarrollo de una vacuna contra un complejo hemoparásito macroscópico, que despliega un abanico tan amplio de estrategias de evasión, destacándose los eficientes mecanismos de inmunomodulación, que limitarían la eficacia de eventuales vacunas. Es por ello imprescindible plantearse la utilización de un conjunto de blancos funcionales del parásito, reunidos en una vacuna multicomponentes, que necesariamente debe ser asociada a la administración de quimioterapia antiesquistosoma de la población vacunable, con el objeto de evitar que los infectados no respondan adecuadamente al inmunógeno seleccionado.

Agradecimientos

Esta investigación se ha realizado con la financiación de FONACIT Proyecto S1-200000564 y LANPIP-FONACIT Proyecto 2000001639.

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los colaboradores que han participado en alguna de las fases de esta investigación: Cecilia Colmenares, Fanny Guzmán, Johan Hoebeke, Laurence Sabatier, Oliver Pérez, Guidenn Sulbarán, Ítalo Césari, César Matos, Rosa Contreras, Ana C. Bruces, Nathalie Chacón. Los autores se excusan por la ausencia de algunas referencias que no han sido citadas por restricciones de espacio.

Bibliografía

- ABATH, F. G., C. N. MORAIS, C. E. MONTENEGRO, T. A. WYNN y S. M. MONTENEGRO. «Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies?». *Trends in Parasitology* 22 (2) (2006): 85-91.
- ALDREY, O., B. ALARCÓN DE NOYA, I. MACHADO, O. NOYA, N. BIANCO y G. PÉREZ. «Immunopathology of human schistosomiasis mansoni. I. Immunomodulatory influence on T cell function». *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 30 (1988): 393-399.
- ANGELI, V., C. FAVEEUW, O. ROYE, J. FONTAINE, E. TEISSIER, A. CAPRON, I. WOLOWCZUK, M. CAPRON y F. TROTTEIN. «Role of the parasite-derived PGD₂ in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection». *Journal of Experimental Medicine* 193 (2001): 1135-1147.
- ASLAM, A. et ál. «Proteases from *Schistosoma mansoni* cercariae cleave IgE at solvent exposed interdomain regions». *Molecular Immunology* 45 (2008): 567-574.
- CAPRON, A., G. RIVEAU, M. CAPRON y T. FRANCOIS. «Schistosomes : the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials». *Trends in Parasitology* 21 (2005): 143-149.
- CESARI, I. M., A. J. SIMPSON y W. H. EVANS. «Properties of a series of tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*». *Biochemical Journal* 198 (3) (1981): 467-473.
- CHACÓN, N., S. LOSADA, H. BERMÚDEZ, Í. CÉSARI, J. HOEBEKE y O. NOYA. «Immunogenicity of polimerizable synthetic peptides derived from a vaccine candidate against schistosomiasis: the asparaginy endopeptidase (Sm32)». *Immunology Letters* 88 (2003): 199-210.
- COCUDE, C., C. PIERROT, C. CETRE, J. FONTAINE, C. GODIN, A. CAPRON y J. KHALIFE. «Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasma kallikrein and human factor I». *Parasitology* 118 (1999): 389-396.
- EVERTS, B. et ál. «Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th₂ responses». *Journal of Experimental Medicine* 206 (2009): 1673-1680.
- HAGAN, P., U. J. BLUMENTHAL, D. DUNN., A. J. SIMPSON y A. WILSON. «Human IgE, IgGg4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*». *Nature* 349 (1991): 243-245.
- KARIUKI, T. M., I. O. FARAH , D. S. YOLE, J. M. MWENDA, G. J. VAN DAM, A. M. DEELDER, R. A. WILSON y P. S. COULSON. «Parameters of the attenuated schistosome vaccine evaluated in the olive baboon». *Infection and Immunity* 72 (2004): 5526-5529.
- KOJIMA, S., y A. MACDONALD. «Schistosomes: General». En *Parasitology*, edición de F. E. Cox, D. Wakelin, S. Gillespie y D. Despommier, 10ª ed. Topley y Wilson's, UK (2005): 600-609.
- LOSADA, S., N., CHACÓN, C. COLMENARES, H. BERMÚDEZ, A. LORENZO, J., P. POINTIER, A. THERON, B. ALARCÓN DE NOYA, y O. NOYA. «*Schistosoma*: cross-reactivity and antigenic community among different species». *Experimental Parasitology* 111 (3) (2005): 182-190.
- MAIZELS, R., y M. YAZDANBAKHS. «Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms». *Nature Reviews Immunology* 9 (2003): 733-744.

- MENTINK-KANE, M., A. et ál. «IL-13 receptor alfa-2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101 (2004): 586-590.
- NOYA, O., B. ALARCÓN DE NOYA, F. GUZMÁN, y H. BERMÚDEZ. «Immunogenicity of Sm32 synthetic peptides derived from the *Schistosoma mansoni* adult worm». *Immunology Letters* 88 (2003): 211-219.
- NOYA, O., S. LOSADA, H. BERMÚDEZ, M. A. LORENZO, M. TOLEDO, y B. ALARCÓN DE NOYA. «Vacunas Anti-esquistosoma». *Salus*. 11 (2007): 48-52.
- PATARROYO, M. E. et ál. «A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria». *Nature* 10; 332 (6160) (1988): 158-161.
- PÉREZ, Ó. et ál. «New vaccines require potent adjuvants like AFPL1 and AFCo1». *Scandinavian Journal of Immunology* 66 (2007): 271-277.
- RAMMENSEE, H. G., J. BACHMANN, N. N. EMMERICH, O. A. BACHOR, y S. STEVANOVIC. «Sypfeithi: database for MHC ligands and peptide motifs». *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219.
- SULBARÁN, G., *Immunoprofilaxis experimental con extracto butanólico de membranas de vermes adultos de Schistosoma mansoni en el modelo murido*. Tesis doctoral no publicada, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), 2009.
- TRAN, M. H., M. S. PEARSON, J. M. BETHONY, D. J. SMYTH, M. K. JONES, M. DUKE, T. A. DON, D. P. MCMANUS, R. CORREA-OLIVEIRA, y A. LOUKAS. «Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis». *Nature Medicine* 12 (7) (2006): 835-840.
- WILSON, M., MENTINK-KANE, J. PESCE, T. RAMALINGAM, R. THOMPSON, y T. WYNN. «Immunopathology of Schistosomiasis». *Immunology and Cell Biology* 85 (2007): 148-154.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. «Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-transmitted Helminthiasis». *First Report of the Joint Expert Committees, WHO Tech. Rep. Ser.* 912 (2002): 57.
- WYNN, T. A., I. P. OSWALD, I. A. ELTOUM, P. CASPAR, C. J. LOWENSTEIN, F. A. LEWIS, S. L. JAMES, y A. SHER. «Elevated expression of Th₁ cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*». *Journal of Immunology* 153 (11) (1994): 5200-5209.

12. La genómica aplicada a la detección de genes implicados en la diferenciación e infectividad en *Leishmania infantum*

Ana Alonso Ayala, Pedro José Alcolea Alcolea
y Vicente Larraga Rodríguez de Vera

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC (España)

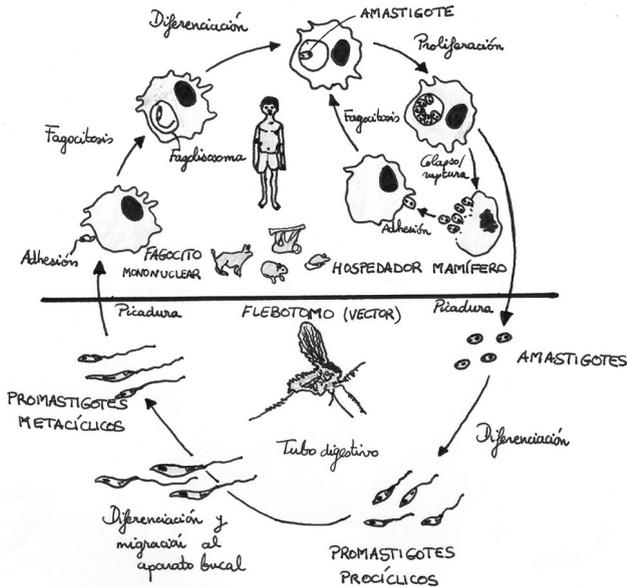
12.1. Introducción

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades producidas por protozoos parásitos del género *Leishmania*, pertenecientes a la familia de los tripanosomátidos (Killick-Kendrick 1990). Se transmite mediante la picadura de un mosquito hematófago de la subfamilia *Phlebotominae*, de la que se conocen 70 especies capaces de transmitir la enfermedad. Existen fundamentalmente tres presentaciones clínicas dependiendo de las especies implicadas y de la respuesta inmune del hospedador: cutánea, mucocutánea y visceral. Esta última está producida por *L. infantum* y es mortal sin tratamiento. Es una enfermedad endémica que afecta a 15 millones de personas, con 2 millones de nuevos casos al año, en 88 países de las zonas tropicales y templadas (el 90% de ellos en vías de desarrollo) (Desjeux 1996). Debido a su incremento de la prevalencia en los últimos años, ha sido declarada como enfermedad emergente por la Organización Mundial de la Salud y se ha descrito como parásito oportunista en personas inmunodeprimidas, fundamentalmente en enfermos de sida (Pasquau et ál. 2005). Es una enfermedad endémica en la cuenca mediterránea y en España la leishmaniosis visceral se considera un problema de salud pública, siendo el perro, del que hay aproximadamente siete millones de animales censados en el país, el reservorio de la enfermedad; en este hospedador los porcentajes de infestación varían entre el 10 y el 25%, con zonas de incidencia más elevada, hasta un 34% (Amela et ál. 1995).

Leishmania es un protozoo parásito que presenta un ciclo biológico digenético, en el que se alternan fundamentalmente dos estadios durante su diferenciación: la forma extracelular o promastigote que se desarrolla en el insecto vector y la forma intracelular o amastigote que se desarrolla en el hospedador mamífero.

Durante el ciclo biológico, el insecto vector, cuando ingiere sangre para su alimentación, inocula al hospedador mamífero los promastigotes metacíclicos que tiene en la probóscide. Estos promastigotes son fagocitados por los macrófagos donde se diferencian a la forma intracelular o amastigote. Los amastigotes se liberan a la sangre cuando, por su multiplicación, colapsan el macrófago, e inmediatamente infectan a otros fagocitos, aumentando la carga parasitaria del hospedador. Cuando otro flebotomo ingiere sangre de un hospedador infectado, los amastigotes son liberados en el interior del tubo digestivo y se transforman de nuevo en promastigotes, con lo que se cierra el ciclo biológico (esquema 12.1).

ESQUEMA 12.1: Ciclo biológico de *Leishmania*



Fuente: Adaptado de Sacks y Noben-Trauth, 2002.

La mayor parte de los estudios realizados sobre la respuesta del sistema inmune frente a la leishmaniasis se han llevado a cabo en el modelo murino (BALB/c) (Heinzel et ál. 1991). Estos estudios han permitido determinar que mutantes defectivos en las moléculas de clase II del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) son incapaces de controlar la infección por el parásito y su multiplicación, sugiriendo que las células T restringidas para las moléculas de clase II del MHC son esenciales para la resistencia frente al parásito. Parece claro que existe una dicotomía Th1/Th2 en la respuesta inmune que determina resistencia o susceptibilidad (Sacks y Noben-Trauth, 2002). El predominio de la subpoblación Th1 indica resistencia a la infección y el de la población Th2 se correlaciona con la aparición de la enfermedad. En el caso de la leishmaniasis canina, los mecanismos inmunológicos que se desarrollan durante la infección por *Leishmania* no se conocen en profundidad, debido a la gran variabilidad genética que presentan estos animales, además de las dificultades que entraña la investigación con el modelo canino; parece que se da una respuesta mixta entre las dos subpoblaciones Th1 y Th2 (Ramos et ál. 2008).

Una vez instaurada la enfermedad, solo el tratamiento farmacológico se muestra, hasta el momento, efectivo, aunque presenta efectos secundarios y problemas de recidivas como está sucediendo en India, Bangladesh y Sudán fundamentalmente (en este último país se han registrado 100.000 muertos por leishmaniasis en la última década). Urge, por tanto, la obtención de una vacuna que resulte efectiva frente a la enfermedad.

El laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ha desarrollado una vacuna de ADN protectora frente a la leishmaniasis canina basada en el gen que codifica el antígeno LACK, análogo del receptor de la proteína quinasa C activada, que induce un 70% de protección frente a una infección experimental por *L. infantum*. Es una vacuna en la que se utilizan dos vehículos recombinantes: el plásmido pORT (una modificación del plásmido pCIneo) en la primera dosis y un virus vaccinia Ankara modificado en la segunda dosis de inmunización (Ramos et ál. 2008). Esta vacuna nos ha permitido determinar la relación que existe entre la inducción de

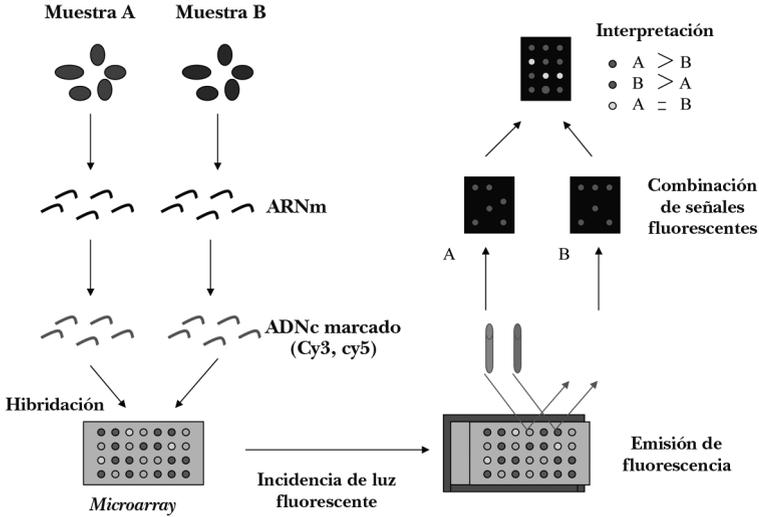
una respuesta Th1 y la resistencia a la infección, así como los parámetros utilizados para determinar si la respuesta desarrollada después de la infección experimental es protectora (Ramos et ál. 2008, 2009). Los resultados obtenidos mostraron que en los perros vacunados existía una disminución de la sintomatología y de la carga parasitaria, un incremento del nivel de activación celular en los principales órganos diana del parásito, médula ósea y ganglio linfático, frente a antígenos específicos de *Leishmania*, un incremento de anticuerpos específicos IgG2 y, por último, un aumento de la expresión de las citoquinas relacionadas con la respuesta Th1, como son la interleuquina 12 (IL-12) y el interferón gamma (IFN γ) (Ramos et ál. 2008). También se observó que se produce una disminución en la producción de la interleuquina 10 (IL-10), lo que sugiere que se está produciendo una inhibición de la respuesta Th2 inicial en los perros protegidos.

Con objeto de mejorar el nivel de protección obtenido hasta el momento y de evitar la utilización de un virus recombinante en la segunda dosis de inmunización, nos planteamos desarrollar una nueva vacuna que incluya genes candidatos que codifiquen antígenos responsables de la activación de tipo protector (Th1) en el mamífero reservorio de la enfermedad en nuestro ambiente geográfico, el perro. Para ello, en el laboratorio de Parasitología Molecular del CIB se está llevando a cabo el estudio de los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de *L. infantum* para la selección de genes relacionados con la infectividad del protozoo, a partir de la construcción de *microarrays* de ADN a partir de una genoteca completa de *L. infantum* obtenida por fragmentación al azar en la que se contemplan los aproximadamente 8.300 genes que tiene este parásito (Alcolea et ál. 2009). En los *microarrays* se imprimieron los productos de PCR purificados de las amplificaciones de los insertos seleccionados con un único par de oligonucleótidos (m13pUC18F23 y m13pUC18R23). El resto de *microarrays* existentes de diferentes especies de *Leishmania* son parciales y/o de oligonucleótidos en los que se contemplan solo los genes predichos en el proyecto genoma de *L. infantum* (Rochette et ál. 2009). Gracias a que disponemos de los *microarrays* a partir de la genoteca completa, hemos detec-

tado que no han sido localizados aún todos los genes del parásito en la secuencia del proyecto genoma. Por otra parte también nos planteamos estudiar los mecanismos de protección desarrollados por el hospedador mamífero frente al protozoo parásito para lo que se determinarán los perfiles de expresión génica en las células de uno de los principales órganos diana del parásito, el ganglio linfático, lugar preferente para la presentación de antígeno. Para este último estudio se utilizaron *microarrays* comerciales de oligonucleótidos de perro.

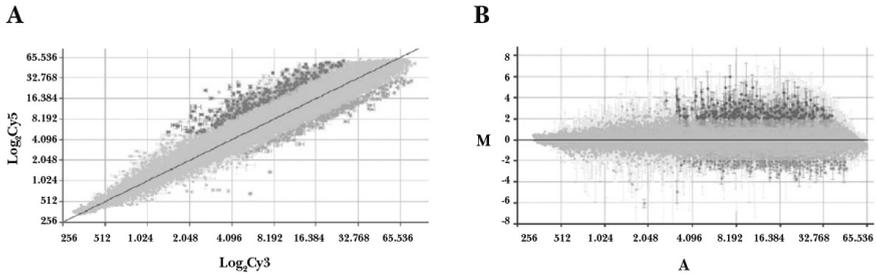
En un estudio de expresión génica diferencial se sigue el siguiente protocolo (esquema 12.2). Se basa fundamentalmente en la cuantificación relativa de los ARN transcritos mediante la comparación de los ARNm aislados de las dos muestras biológicas para comparar. En primer lugar, se realiza la extracción del ARN total de las dos muestras que se quieren comparar, se comprueba la calidad en un bioanalizador y se lleva a cabo la amplificación del ARNm, ya que normalmente la concentración que se obtiene es demasiado baja para realizar la posterior hibridación con los *microarrays*. Seguidamente se realiza la síntesis de los correspondientes ADNc incorporando dos moléculas fluorescentes; fundamentalmente para este tipo de ensayos se utilizan las cianinas Cy3 (verde) y Cy5 (rojo), según corresponda para cada comparación transcriptómica. Estos fluoróforos cumplen una serie de condiciones: son fotoestables, tienen una elevada intensidad de fluorescencia, presentan un espectro de fluorescencia bien separado y son, por tanto, resistentes al *fotobleaching* o apantallamiento. Se realiza una hibridación conjunta de las dos poblaciones de ADNc (una marcada con Cy3 y la otra con Cy5) con los *microarrays* de ADN, utilizando tres réplicas para cada experimento. Se analizan las intensidades de fluorescencia con un escáner y se recogen los datos en un *software* adecuado obteniéndose un código de colores. En la imagen combinada de colores el rojo indicaría que la cantidad de ADNc de una de las muestras que ha hibridado en ese punto es mayor que la de la muestra que se debe comparar, el color verde indicaría lo contrario y el color amarillo, que no hay cambios, es decir, que los genes en ese punto están regulados de igual forma (Ehrenreich, 2006).

ESQUEMA 12.2: **Análisis de la expresión génica diferencial mediante microarrays de ADN**



Por último se realiza una normalización de los datos de intensidad de fluorescencia y las desviaciones típicas y se aplica un contraste de hipótesis con un test estadístico como la t de Student (esquema 12.2). Los requisitos que utilizamos para la selección de *spots* son: los valores de cociente de intensidades de fluorescencia ($Cy5/Cy3$ si $Cy5 > Cy3$; $-Cy3/Cy5$ si $Cy5 < Cy3$) deben ser $F \geq 1,7$; la intensidad de fluorescencia para uno de los fluoróforos debe ser al menos 10 veces superior al valor medio del *background* (4000 UF) y el valor de significación estadística $< 0,05$ (gráfico 12.1).

GRÁFICO 12.1: *Scatter plot* medio de las tres réplicas del análisis de hibridación por *microarrays* del perfil de expresión de los promastigotes procíclicos y metacíclicos



Nota: (A) intensidad versus intensidad de fluorescencia en escala logarítmica en base 2, (B) *scatter plot* M/A. $M = (\log_2 Ri - \log_2 Gi)$ y $A = [(\log_2 Ri + \log_2 Gi) / 2]$, donde R y G son respectivamente la intensidad de fluorescencia de Cy5 y Cy3.

Cada punto seleccionado se corresponde con un *spot* (punto) del *array* y, en nuestro caso, con un clon de la genoteca. Los extremos de los insertos contenidos en los clones de la genoteca seleccionados en los análisis de expresión fueron secuenciados con el mismo par de oligonucleótidos que se utilizó para su amplificación durante la construcción de los *microarrays*. La última etapa es el ensamblaje y alineamiento de las secuencias de los extremos de los clones con las secuencias genómicas anotadas en el proyecto genoma de *L. infantum* para determinar qué genes están diferencialmente expresados. En la estrategia de ensamblaje de secuencias se siguieron varios requisitos que tenían que cumplir las secuencias para su selección. Se pusieron varios filtros entre los que destacan: valor $e < 1e-100$ para ambos alineamientos, una orientación convergente (antiparalela) entre las secuencias de ambas hebras del mismo cromosoma y una longitud máxima de 12 Kpb entre los extremos del inserto de cada clon. Por último, en nuestro caso comprobamos que la estrategia de secuenciación, ensamblaje y alineamiento no está afectada por inserciones y deleciones entre nuestro aislado de *L. infantum* y el secuenciado en el proyecto genoma (Alcolea et ál. 2009).

Los resultados de expresión génica se deben confirmar con otra técnica como la PCR cuantitativa en tiempo real o la técnica de *Northern blot*. Además en algunos clones aparece más de un so-

lapamiento con genes anotados; en estos casos, también es necesario realizar un análisis de expresión adicional para determinar qué genes están diferencialmente expresados, en nuestro estudio se realizan análisis de PCR cuantitativa a tiempo real.

La interpretación del conjunto de datos de genes diferencialmente expresados se lleva a cabo mediante el análisis de términos de procesos biológicos y funciones moleculares de la base de datos Gene Ontology (GO), que constituyen una nomenclatura controlada. Este análisis funcional se ha realizado mediante el programa informático BLAST2GO, con el que se obtienen gráficos acíclicos directos (DAG), que relacionan los términos de funciones moleculares y procesos biológicos que se encuentran en el conjunto de genes analizado.

Esta metodología la hemos llevado a cabo tanto para el estudio de los perfiles de expresión génica en los procesos de diferenciación de *L. infantum*, como para estudiar la influencia de forma aislada y/o combinada de los principales procesos implicados en la diferenciación del parásito.

12.2. El uso de los *microarrays* en la expresión génica diferencial entre las diferentes fases del ciclo biológico de *L. infantum*

En el laboratorio hemos llevado a cabo el análisis de los perfiles de expresión génica en la diferenciación global de *L. infantum*. Para ello, hemos comparado promastigotes en fase logarítmica versus fase estacionaria, promastigotes en fase estacionaria versus amastigotes intracelulares, amastigotes intracelulares versus promastigotes en fase logarítmica y la subpoblación en fase estacionaria PNA⁻ versus subpoblación PNA⁺, mediante la utilización de los *microarrays* genómicos completos del parásito, descritos anteriormente.

Como se ha indicado, *Leishmania* presenta en su ciclo biológico una fase extracelular, promastigote que vive en el tubo digestivo del insecto vector, donde se diferencia y adquiere la capacidad infectiva progresivamente a la vez que migra hacia la probóscide, pasando de promastigotes procíclicos, no infectivos, a promastigo-

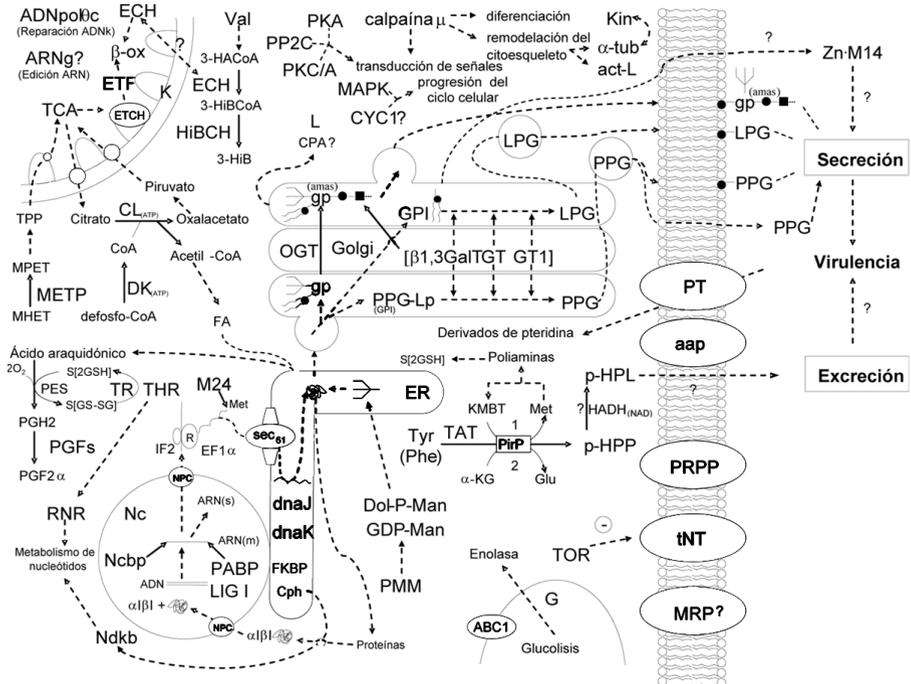
tes metacíclicos, infectivos. En el laboratorio se pueden mimetizar *in vitro* los procesos de desarrollo de los promastigotes en el tubo digestivo del vector, obteniéndose promastigotes procíclicos (en fase logarítmica) y promastigotes metacíclicos (en fase estacionaria). En el caso de los amastigotes, las formas intracelulares que se desarrollan en el interior del hospedador mamífero se obtuvieron *in vitro* mediante infecciones de macrófagos de una línea celular humana, la U937. Estos amastigotes intracelulares se diferencian tanto desde el punto de vista de la expresión génica como en la morfología de los amastigotes axénicos o *amastigotes-like*. Con el análisis de expresión génica global de las diferentes fases del ciclo biológico se detectaron unos 300 genes (aproximadamente un 3%) diferencialmente expresados entre las distintas fases del ciclo biológico, cifra que coincide con otros trabajos realizados con *microarrays* en *Leishmania* debido a la expresión constitutiva que presenta este parásito (Leifso et ál. 2007).

Como hemos comentado anteriormente, mediante la utilización de programas informáticos como BLAST2GO y la base de datos de GO, podemos relacionar los genes inducidos en cada condición con funciones moleculares y con procesos biológicos definidos. Así, los datos muestran que se inducen genes componentes del ribosoma y cuatro factores traduccionales en general en promastigotes frente a amastigotes. Estos términos de procesos biológicos están relacionados con las funciones moleculares de constitución estructural de los ribosomas y unión al ARN. Por otra parte, en los estadios en división (promastigotes en fase logarítmica y amastigotes) se sobreexpresan genes relacionados con procesos biosintéticos celulares y otros procesos metabólicos. Además también observamos que la mayoría de los genes inducidos en amastigotes están subexpresados en comparación con los promastigotes (Alcolea et ál. 2010b). Lo hemos corroborado aplicando el test de la distribución binomial con nuestros datos y los descritos por otros autores.

Además de tener una visión general de la regulación de la expresión génica en el ciclo biológico de *Leishmania*, nos planteamos la búsqueda de genes relacionados con la infectividad analizando las diferencias de expresión génica entre dos subpoblaciones de promastigotes en fase estacionaria, aislando promastigotes procí-

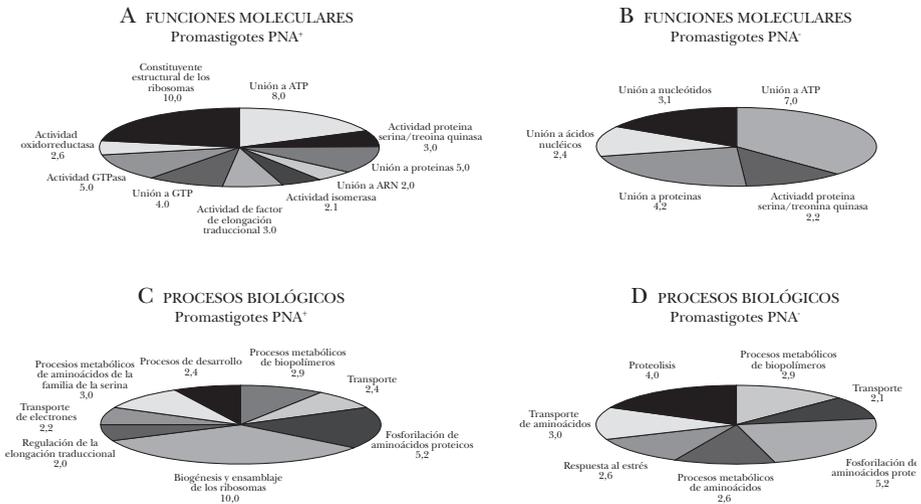
clicos y metacíclicos, siendo estos últimos los infectivos. Tomamos los promastigotes en el día 7 de cultivo e hicimos una selección negativa con un aglutinina de cacahuete (PNA) que nos permitió separar una población de promastigotes (aproximadamente un 1%) PNA⁻ (metacíclicos) de los PNA⁺ (procíclicos) que sí aglutinan con PNA, ya que no tienen bloqueados los residuos laterales D-galactosa por D-arabinosa en el lipofosfoglicano (LPG) de la superficie del parásito, como ocurre en los metacíclicos. No es posible esta separación en todas las especies de *Leishmania*; en *L. braziliensis* aglutinan las dos formas, y es necesaria la utilización de otra aglutinina para la separación; en el caso de *L. major*, sí está descrita la separación con PNA como marcador de metaciclógenesis (McConville et ál. 1992). Se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente y se obtuvieron un total de 317 genes diferencialmente regulados. La relación de las funciones de los distintos genes regulados diferencialmente mediante la utilización del programa informático BLAST2GO se muestra en el esquema 12.3.

ESQUEMA 12.3: Perfiles de expresión génica diferencial en promastigotes PNA⁺ y PNA⁻



En cuanto a las funciones moleculares se destaca que en los promastigotes procíclicos PNA⁺ están inducidos genes involucrados en la actividad del factor de elongación de la traducción, función estructural del ribosoma y unión a ARN, lo que sugiere que la expresión génica es más activa en el estadio procíclico en el cual el parásito se está diferenciando, al contrario de los promastigotes meta-cíclicos, que no se dividen. En cuanto a los procesos biológicos en PNA⁺ se inducen genes relacionados con el ensamblaje de ribosomas y genes que intervienen en el desarrollo y en los meta-cíclicos genes relacionados con la respuesta al estrés y la proteólisis (gráfico 12.2).

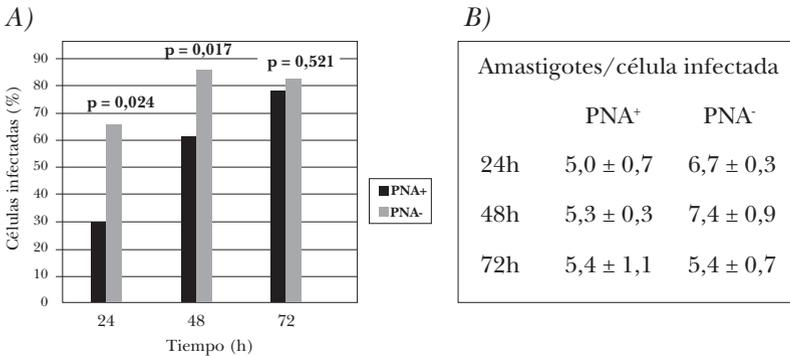
GRÁFICO 12.2: Funciones moleculares y procesos biológicos de los genes diferencialmente expresados en promastigotes PNA⁺ y PNA⁻



En los promastigotes PNA⁻ meta-cíclicos, entre otros genes, se inducen algunos que codifican para moléculas constituyentes del glicocáliz o necesarias para su biosíntesis. También se induce una cisteína proteasa (CPA), descrita como factor de virulencia en *L. mexicana* (Mottram et ál. 2004) y la tirosina aminotransferasa (TAT) que interviene en una ruta metabólica cuyo producto final es el p-hidroxifenil-piruvato (p-HPL) que está descrito, en este caso en otro tripanosomátido, *Trypanosoma cruzi*, como factor de virulencia (Nowicki y Cazzulo 2008).

Para corroborar que las dos subpoblaciones eran distintas, además de comprobar la mayor infectividad de los promastigotes metacíclicos PNA⁻, se estimularon cultivos de la línea celular U937 con PMA para ser posteriormente infectados con promastigotes PNA⁺ y PNA⁻ (gráfico 12.3). Se recogieron muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas para realizar preparaciones con Giemsa y así poder realizar recuentos para calcular el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada en cada caso. Se observó que a las 24 y 48 horas de post-infección las diferencias entre las dos subpoblaciones eran significativas, observando que la población de promastigotes PNA⁻ era más infectiva que la de los PNA⁺. Para analizar las diferencias entre los dos grupos, se aplicó el test de la t de Student pareado, ya que son subpoblaciones del mismo cultivo.

GRÁFICO 12.3: Resultados del nivel de infección de promastigotes procíclicos y metacíclicos



Nota: A) Proporción de células infectadas. B) Número de amastigotes por célula

Podemos concluir que las células PNA⁻ que presentaban una expresión génica diferente de la población general de promastigotes estacionarios con sobreexpresión de genes que están relacionados con el estrés celular y con la biosíntesis de la cubierta exterior del protozoo son claramente más infectivos. Por tanto la aglutinación con PNA se considera un marcador de metaciclogénesis en *L. infantum* (Alcolea et ál. 2009). La comparación transcriptómica de las dos subpoblaciones nos ha permitido la selección de genes candidatos que codifiquen antígenos relacionados

con la infectividad del parásito para el diseño de una nueva vacuna frente la leishmaniosis canina.

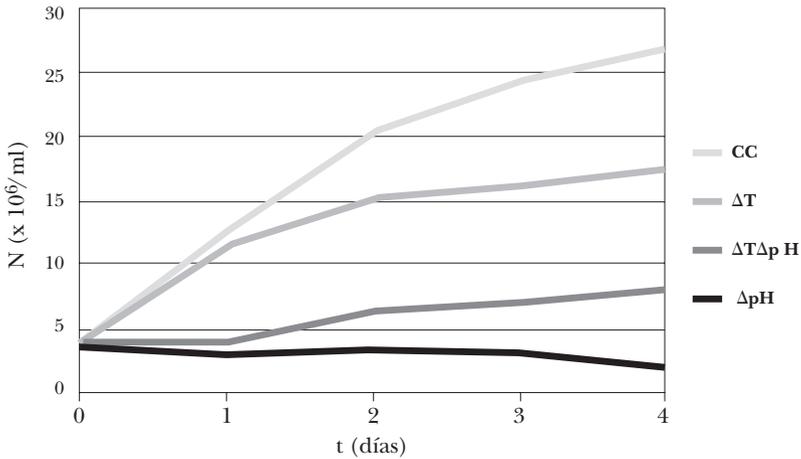
12.3. La expresión génica diferencial entre promastigotes y amastigotes de *L. infantum*. Efecto del pH y la temperatura

Además de llevar a cabo el estudio de los perfiles de expresión génica diferencial entre las distintas fases del ciclo biológico de *L. infantum*, nos planteamos estudiar la influencia aislada y/o combinada de los principales factores implicados en la diferenciación del promastigote a amastigote.

Como hemos comentado anteriormente, la diferenciación tiene lugar en la vacuola parasitófora o fagolisosoma en el interior de los macrófagos del hospedador mamífero en el que se da un ambiente hidrolítico con un pH ácido (4,5-5,5) y una temperatura de 35-37 °C. Las condiciones que se dan en el interior del fagolisosoma se pueden mimetizar *in vitro* para el cultivo axénico de amastigotes; sin embargo, como hemos comentado, está descrito que los amastigotes axénicos son diferentes de los intracelulares. De hecho muchos autores los denominan amastigotes en cultivo o *amastigote-like* (Somanna et ál. 2002).

En el laboratorio hemos llevado a cabo el análisis de las variaciones del transcriptoma de *L. infantum* en la diferenciación a amastigote modificando de forma aislada y/o combinada el pH y la temperatura del medio de cultivo. Se han definido los grupos experimentales y el control del siguiente modo: 37 °C/pH 4.5 (grupo $\Delta T/\Delta pH$), 37 °C/pH 7.2 (grupo ΔT), 27 °C/pH 4.5 (ΔpH) y 27 °C/pH 7.2. CC (grupo control). Todos los cultivos de los cuatro grupos se iniciaron con la misma densidad celular y se modificaron las condiciones el día cuatro de la curva de crecimiento (gráfico 12.4). Observamos que la acidificación (grupo ΔpH) disminuye la proliferación celular tanto a 27 °C como a 37 °C (gráfico 12.4) (Alcolea et ál. 2010a).

GRÁFICO 12.4: Curva de crecimiento de los grupos con variaciones en pH y/o temperatura y el grupo control

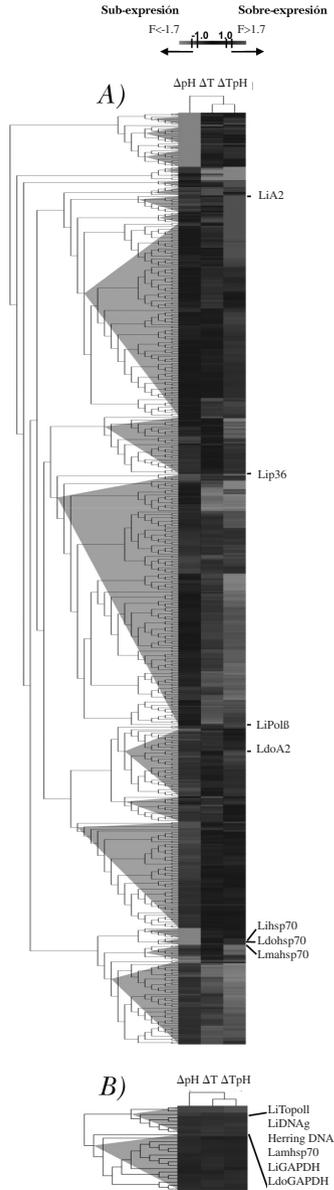


Como primera aproximación al estudio de las formas generadas por la influencia de la temperatura y el pH de forma combinada, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la detección de la glicoproteína de 46 KDa (gp46), también denominada antígeno de superficie del promastigote 2 (PSA2), ya que se expresa solo en este estadio (Kahl y McMahon-Pratt 1987). Se detectó reacción con el anticuerpo monoclonal anti-gp46 en todos los grupos excepto en el $\Delta T/\Delta pH$. Los datos indicaron que, modificando de forma combinada pH y temperatura, se obtienen formas más próximas al estadio amastigote que en el grupo ΔT y ΔpH a los cuatro días de tratamiento. Además pudimos comprobar que la morfología de las células del grupo $\Delta T/\Delta pH$ es esférica o casi esférica y un porcentaje de ellas presentaban una parte de flagelo emergente, formas similares a amastigotes o *amastigote-like*, en las que se comprobó también la expresión del gen A2, específico de amastigotes.

Para el análisis de los perfiles de expresión génica mediante los *microarrays* de ADN descritos anteriormente en la diferenciación del promastigote a amastigote y la influencia de los principales factores implicados, se tomaron muestras de todos los cultivos de todos los grupos CC, $\Delta T/\Delta pH$, ΔT y ΔpH y se siguieron los mismos pasos que en el experimento anterior.

Además de relacionar los genes inducidos en cada condición con funciones moleculares y con procesos biológicos definidos mediante la utilización de programas informáticos como BLAST2GO y la base de datos de GO como hemos comentado anteriormente, se realizó un análisis multivariante denominado análisis en serie de *microarrays* (SAM) para comparar simultáneamente los tres perfiles de expresión observados, correspondientes a $\Delta T/\Delta pH$, ΔT y ΔpH . De este modo, se consiguieron agrupar todos los clones seleccionados en los tres análisis de *microarrays* y, posteriormente, se realizó un análisis de *clustering jerárquico support Tree* (HCL-ST) para cada grupo de clones. Este análisis nos permitió confirmar que el perfil de expresión génica del grupo en el que se modificó únicamente la temperatura y en el que se modificaron simultáneamente temperatura y pH presenta una similitud mucho mayor que el perfil observado en la condición en el que solo se modificó el pH (gráfico 12.5). Es decir, la temperatura tiene mayor relevancia que el pH en la diferenciación del promastigote a amastigote (Alcolea et ál. 2010a).

GRÁFICO 12.5: Análisis en serie de *microarrays* y *clustering* jerárquico de los genes diferencialmente expresados en $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH



Nota: A) Genes que muestran diferencias estadísticamente significativas.
B) Genes que no muestran diferencias estadísticamente significativas

Una vez obtenidos los resultados del análisis del perfil de expresión génica diferencial entre las diferentes fases del ciclo biológico, así como la influencia de forma aislada y/o combinada de los principales factores implicados en la diferenciación del promastigote a amastigote, se seleccionarán distintos genes candidatos para la elaboración de una nueva vacuna frente a la leishmaniasis canina.

Se procederá a obtener transfectantes episomales estables de *L. infantum* que sobreexpresen los genes seleccionados, se determinarán los genes candidatos mediante ensayos de infección *in vitro* de los transfectantes generados, así como la elaboración de ensayos de protección en el modelo de ratón, y, por último, se elaborarán plásmidos que contengan los genes candidatos seleccionados para la elaboración de la nueva vacuna.

Como se ha mostrado en estos datos, la genómica es una herramienta muy útil, no solamente para el estudio de las modificaciones que se producen durante el desarrollo de las diferentes formas del parásito, sino también para la selección de genes que están relacionados con los procesos de adquisición de las características de infectividad. Estos genes pueden constituir una fuente excelente de antígenos capaces de inducir protección en el hospedador y, por tanto, como base para el desarrollo de nuevas vacunas específicas frente a la infección por *L. infantum*.

Agradecimientos

Vicente Larraga agradece la financiación del proyecto a la Fundación Ramón Areces. También quiere agradecer a Ana Chao su trabajo de corrección del manuscrito.

Bibliografía

- ALCOLEA, P. J., A. ALONSO, A. SÁNCHEZ-GOROSTIAGA, M. MORENO-PAZ, M. J. GÓMEZ, I. RAMOS, V. PARRO, y V. LARRAGA. «Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*». *Genomics* 93 (2009): 551-564.

- ALCOLEA, P. J., A. ALONSO, M. J. GÓMEZ, A. SÁNCHEZ-GOROSTIAGA, M. MORENO-PAZ, E. GONZÁLEZ-PASTOR, A. TORANO, V. PARRO, y V. LARRAGA. «Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*». *BMC genomics* 11 (2010a): 31.
- ALCOLEA, P. J., A. ALONSO, M. J. GÓMEZ, I. MORENO, M. DOMÍNGUEZ, V. PARRO, V. LARRAGA. «Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage». *Int. J. Parasitol.* 40 (2010b): 1497-1516.
- AMELA, C., I. MÉNDEZ, J. M. TORCAL, G. MEDINA, I. PACHÓN, C. CANAVATE, J. ALVAR. «Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain». *European journal of epidemiology* 11 (1995): 157-161.
- DESJEUX, P. «Leishmaniasis. Public health aspects and control». *Clinics in dermatology* 14 (1996): 417-423.
- EHRENREICH, A. «DNA microarray technology for the microbiologist: an overview». *Applied microbiology and biotechnology* 73 (2006): 255-273.
- HEINZEL, S. S., P. J. KRYSAN, C. T. TRAN, y M. P. CALOS. «Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA». *Molecular and cellular biology* 11 (1991): 2263-2272.
- KAHL, L. P., y D. MCMAHON-PRATT. «Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein». *J Immunol* 138 (1987): 1587-1595.
- KILLICK-KENDRICK, R. «Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review». *Med Vet Entomol* 4 (1990): 1-24.
- LEIFSO, K., G. COHEN-FREUE, N. DOGRA, A. MURRAY, y W. R. McMASTER. «Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed». *Molecular and biochemical parasitology* 152 (2007): 35-46.
- McCONVILLE, M. J., S. J. TURCO, M. A. FERGUSON, y D. L. SACKS. «Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania* major promastigotes to an infectious stage». *The EMBO journal* 11 (1992): 3593-3600.
- MOTTRAM, J. C., G. H. COOMBS, y J. ALEXANDER. «Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*». *Current opinion in microbiology* 7 (2004): 375-381.
- NOWICKI, C., y J. J. CAZZULO. «Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids». *Comparative biochemistry and physiology* 151 (2008): 381-390.
- PASQUAU, F. et ál. «Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region». *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24 (2005): 411-418.
- RAMOS, I., A. ALONSO, J. M. MARCÉN, A. PERIS, J. A. CASTILLO, M. COLMENARES, y V. LARRAGA. «Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response». *Vaccine* 26 (2008): 333-344.
- RAMOS, I., A. ALONSO, A. PERIS, J. M. MARCÉN, M. A. ABENGOZAR, P. J. ALCOLEA, J. A. CASTILLO, y V. LARRAGA. «Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection». *Vaccine* 27 (2009): 6695-6703.

- ROCHETTE, A., F. RAYMOND, J. CORBEIL, M. OUELLETTE, y B. PAPADOPOULOU. «Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*». *Molecular and biochemical parasitology* 165 (2009): 32-47.
- SACKS, D., y N. NOBEN-TRAUTH. «The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice». *Nature reviews* 2 (2002): 845-858.
- SOMANNA, A., V. MUNDODI, y L. GEDAMU. «In vitro cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms». *Acta tropica* 83 (2002): 37-42.

Índice de cuadros, esquemas y figuras

CUADRO 2.1:	Prevalencia de la hepatitis C	51
CUADRO 4.1:	Selección de propuestas planteadas desde el terreno con impacto positivo demostrado sobre los pacientes con infección/enfermedad de Chagas	83
CUADRO 5.1:	Seroprevalencia de los pacientes con enfermedad de Chagas estudiados en la URMTM entre 2007 y 2009 por país de origen	96
CUADRO 11.1:	Antígenos candidatos a vacunas contra <i>Schistosoma mansoni</i>	177
ESQUEMA 1.1:	Ciclo biológico de la malaria	29
ESQUEMA 1.2:	Ciclo de vida del parásito y las fases (preeritrocítica, eritrocítica y en el mosquito) en las que se basa la estrategia de desarrollo de vacunas de malaria	45
ESQUEMA 6.1:	Posibles vías de presentación del antígeno KMP11 a través del HLA de clase I, tras la inmunización intramuscular de ratones con una vacuna ADN que contiene los genes KMP11 y HSP70 fusionados	119
ESQUEMA 11.1:	Ensayo de protección de ratones	180
ESQUEMA 12.1:	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> (figura adaptada de Sacks y Noben-Trauth, 2002)	186
ESQUEMA 12.2:	Análisis de la expresión génica diferencial mediante <i>microarrays</i> de ADN	190
ESQUEMA 12.3:	Perfiles de expresión génica diferencial en promatigotes PNA ⁺ y PNA ⁻	194
FIGURA 1.1:	Estrategia de combinación de fármacos según la vida media de presentación en el organismo	41

FIGURA 2.1:	Instalaciones de seguridad biológica nivel BSL3 del CNB (CSIC, Madrid)	59
FIGURA 2.2:	Factoría del SARS-CoV en el compartimento intermedio celular	59
FIGURA 4.1:	<i>T. Cruzi</i> . Coura J. R. Lab. Doenças Parasitarias-IOC-Fiocruz	75
FIGURA 4.2:	Vector. Moreira CJC and Junqueira ACB_Lab. Doenças Parasitarias-IOC-Fiocruz	76
FIGURA 4.3:	Aneurisma apical. Peters & Pasvol. <i>Atlas tropical Medicine and Parasitology</i> , 6ª ed., 2007	79
FIGURA 5.1:	Radiografía de tórax indicando la presencia de cardiomegalia en paciente con cardiopatía dilatada	97
FIGURA 5.2:	Enema opaco indicando la presencia de megacolon	98
FIGURA 6.1:	Formas diferenciadas del parásito <i>T. cruzi</i> correspondientes a los diferentes estadios de su ciclo de vida	108
FIGURA 6.2:	Activación y funciones efectoras de linfocitos T CD8 ⁺ específicos de antígenos de <i>T. cruzi</i>	112
FIGURA 6.3:	Detección de linfocitos T CD8 ⁺ específicos del péptido K1 en enfermos colombianos de Chagas	114
FIGURA 8.1:	Caracterización de <i>Cryptosporidium sp</i> mediante RFLP	135
FIGURA 8.2:	Quiste de <i>Acanthamoeba spp.</i>	137
FIGURA 8.3:	Caracterización de especies a partir de RAPD. Las bandas específicas una vez secuenciadas eran utilizadas para el diseño de cebadores para el diagnóstico por PCR	139
FIGURA 8.4:	Fotografías al microscopio electrónico de cepas virulenta (a) y no virulenta (b)	140
FIGURA 8.5:	Cultivo en monocapa de células corneales al que se le ha añadido la cepa patógena de MN-7 de <i>Acanthamoeba</i> , y se le ha silenciado o no a estas el dominio catalítico de las serín-proteasas	141
FIGURA 8.6:	a, b, c y d, proceso de enquistamiento normal desde 12 a 72 h. e, f, g y h, con iRNA. Fotografía con microscopía óptica	143

FIGURA 8.7:	Desarrollo normal de quistes en 72 h (a, b y c), con iRNA no forman quistes maduros (d)	143
FIGURA 9.1:	Diferencias en el mecanismo de transposición de los transposones de ADN (<i>corta y pega</i>) que codifican una transposasa (T _{pas}) y los retrotransposones (<i>copia y pega</i>) que codifican una reversotranscriptasa (RT)	149
FIGURA 9.2:	Clases de elementos móviles	150
FIGURA 9.3:	Mecanismo de transposición propuesto para el elemento móvil LITc de <i>Trypanosoma cruzi</i>	156

Índice de gráficos y mapas

GRÁFICO 2.1:	Modificación del genoma SARS-CoV para el diseño de una vacuna para la prevención del SARS. A	57
GRÁFICO 2.2:	Protección inducida por la inmunización con mutantes de delección del SARS-CoV	61
GRÁFICO 5.1:	Inmigrantes de América Latina en Murcia en 2008	94
GRÁFICO 5.2:	Pacientes estudiados para <i>T. cruzi</i> por serología URMTM, 2007-2009	94
GRÁFICO 5.3:	Perfil demográfico de los pacientes entre 2007 y 2009	95
GRÁFICO 5.4:	Número de casos de Chagas distribuidos por edad	95
GRÁFICO 5.5:	Sintomatología en los pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica diagnosticados en la URMTM entre 2007 y 2009	99
GRÁFICO 5.6:	Seguimiento mediante PCR de los pacientes con enfermedad de Chagas tratados con benznidazol	102
GRÁFICO 6.1:	Porcentaje de pacientes de Chagas que reconocen el péptido K1, analizados en función del estadio de la fase crónica de la enfermedad	115
GRÁFICO 12.1:	<i>Scatter plot</i> medio de las tres réplicas del análisis de hibridación por <i>microarrays</i> del perfil de expresión de los promastigotes procíclicos y metacíclicos	191
GRÁFICO 12.2:	Funciones moleculares y procesos biológicos de los genes diferencialmente expresados en promastigotes PNA ⁺ y PNA ⁻	195
GRÁFICO 12.3:	Resultados del nivel de infección de promastigotes procíclicos y metacíclicos	196
GRÁFICO 12.4:	Curva de crecimiento de los grupos con variaciones en pH y/o temperatura y el grupo control	198

GRÁFICO 12.5:	Análisis en serie de <i>microarrays</i> y <i>clustering</i> jerárquico de los genes diferencialmente expresados en $\Delta T\Delta pH$, ΔT y ΔpH	200
MAPA 1.1:	Zonas de transmisión del paludismo (riesgo elevado, limitado y zonas donde no existe transmisión)	26
MAPA 1.2:	Zonas en las que existe resistencia del <i>P. falciparum</i> a cloroquina, a sulfadoxina/pirimetamina y multirresistencia	32

Índice alfabético

- ABREU, N., 134, 144-145
Activación, 109, 111-113, 117-120, 163, 166, 188
ADNc, 66-67, 189
África subsahariana, 14, 25-26
ALARCÓN, B., 21, 62, 123, 125-126, 129-130, 171, 182-183
ALBAJAR, P., 20, 71, 85
ALBAREDA, M., 110-111, 121
ALCOLEA, P., 185, 188, 191, 193, 196-197, 199, 201-202
ALMAZÁN, F., 58, 62
ALONSO, A., 45-46, 122, 131, 144, 158-159, 185, 201-202
Amastigotes, 88, 109, 113, 124, 186, 192-193, 196-198
Amebas, 22, 133, 136-142, 144
Antifolatos, 18, 29-30, 33, 37, 42
Antígenos, 23, 44-45, 56, 63, 65-67, 111-113, 116, 118, 120, 167, 174-178, 181, 188, 196, 201
AÑEZ, N. G., 128, 130
Áreas endémicas, 30, 64, 67, 74, 78, 172
ARN, 148-150, 154-156, 164-165, 167-169, 189, 193, 195
Asintomática, 64, 78, 89, 108, 129

BENÍTEZ, L., 66, 68, 130
BENITO, A., 18, 25
Benznidazol, 81-82, 91-92, 99-103
BERMÚDEZ, H., 171, 182-183
BONAY, P., 66, 68
BRITTO, C., 100-101, 103-104
BRUTTO, O. DEL., 64, 68

Caracol, 171-172
Cardiopatía, 78, 92, 97, 104
CARREIRA, P., 147
CARRILERO, B., 87, 93, 96, 104
CAZORLA, S. I., 117, 121
Células dendríticas, 109, 118-119, 162-163
CHAGAS, C., 20, 72-73, 75-76, 83
Cryptosporidium sp., 133, 135
CULBERTSON, C.G., 136
Ciclo de vida, 45, 68, 87, 107-108, 164
Cisticercosis, 15, 19, 63-69
Clínica, 13, 27, 34, 44, 63, 65, 81, 84, 89, 110, 173
Cloroquina, 18, 29-32, 35-37, 39-41
COLMENARES, C., 123, 181-182, 202
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 19, 21-23, 47, 57, 59, 107, 147, 185, 187
Control, 19-22, 29, 38, 42, 46, 52, 58, 63, 65, 68-69, 72, 77, 83, 92, 102, 109, 117, 120, 127, 130, 133, 135, 137, 139, 141, 143-145, 169, 172, 183, 197-198, 202

DIEGO, M. L. DE, 47, 58, 60, 62
DENIZ, D., 161
DI FEO, G., 54, 62
Diagnóstico, 27, 42-43, 45, 55, 65, 72, 77-78, 80-84, 89-90, 100-102, 104-105, 126, 128-130, 133-135, 137, 139, 141, 143, 145, 172
Diarrea aguda, 135
DÍAZ-BELLO, Z., 123
DÍEZ, H., 114, 121

- Diferenciación, 110, 142, 185-186, 188, 192, 197-199, 201
- DREW, D. R., 67-68
- DUTRA, 111
- Editing*, 164
- Educación, 20, 63, 65, 77-78, 82-83
- EGUI, A., 107, 116
- EHRENREICH, A. 189, 202
- Elementos genéticos móviles (MGE), 147-149, 154, 157
- Endémica, 14, 17, 63-64, 66, 74, 87-88, 92-93, 104, 107, 185
- Enfermedad de Chagas, foco de Barcelona, 14
 foco de Murcia, 14, 20, 50, 87, 89, 91, 93-95, 97, 99, 101, 103, 105
 importada, 104
 de transmisión oral, 78, 84, 123, 125-127, 129, 131
 urbano, 74, 85, 107, 123, 125-126, 131
- Enfermedades tropicales, 14, 22, 71, 105, 133, 136, 138, 157, 161
- Enjuanes, L., 19, 47, 57, 60, 62
- Epidemia, 19, 48-49, 52-53, 55-56, 129
- Epidemiología, 38, 72, 87, 130, 171
- Esquistosomiasis, 22-23, 73, 171-174
- Expresión génica, 22, 142, 147, 167, 188-199, 201
- Fármacos, 14, 18, 22-23, 29-33, 35-36, 39-41, 56, 91-92, 108
- Fase estacionaria, 192-193
 logarítmica, 191-193
- Fiebre Chikungunya, 19, 49
 Ébola, 19, 49, 54
 Lassa, 19, 49
 Valle del Rift, 49
- FLISSER, A., 65-66, 68-69
- GARCÍA-CAÑADAS, M., 147
- Genómica, 14, 23, 36, 46, 60, 134, 153-154, 157, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203
- Giardia*, 133, 135, 144-145
- GONZÁLEZ, L., 69
- GUARIENTO, M. E., 80, 85
- HARRISON, S., 66, 68-69, 91, 104
- HEINZEL, S. S., 187, 202
- Hemocultivo, 90, 100
- HERAS, S., 153-158
- HERRERA, L., 125, 130
- Higiene, 77
- HLA, 112-116, 119, 121
- Hospedador, 27, 34-36, 39, 43, 48, 54, 63-64, 87, 107, 109, 111, 124, 133, 135-136, 139-140, 148, 153-154, 157, 161-163, 172, 174, 176, 185-186, 189, 193, 197, 201
- IBORRA, M. A., 87, 104
- Infección, 14, 18-23, 25-27, 29, 31-32, 34-35, 38-39, 43, 46-49, 51, 53, 55-57, 60-61, 64, 66, 74-75, 77-78, 80-84, 87-89, 91-93, 97, 100-104, 107-111, 113, 115, 117, 119-121, 123-127, 129, 134, 137, 139, 161-163, 168, 171, 174-175, 187-188, 193, 196, 201
- Infectivo, 47-48, 54, 56-58, 192-194, 196
- Inmunidad concomitante, 174
- Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), 67, 69, 80, 90, 95, 129
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI), 80, 90, 95
- Inmunoterapia, 115, 117, 120
- Interferón gamma (IFN), 188
- Inserto, 188, 191
- Intracelular, 107, 109, 133, 161, 168, 186, 192-193, 197
- Investigación y desarrollo (I + D), 81, 157
- JOHNSON, K. S., 66, 69
- Kala azar, 162
- Kinetoplasto, 90, 100
- LAMIRANDE, E., 61-62
- LARRAGA, V., 185, 201-202
- Leishmania sp chagasi*, 162
donovani, 162
infantum, 23, 162, 164, 185, 187-188, 191-192, 196-197, 201-203
major, 162-164, 194, 202-203

- Leishmaniosis cutánea, 162, 185
 mucocutánea, 185
 visceral, 23, 162, 185, 202
- LESHMAN, R., 161
- Linfocitos T
- Th1, Th2, 110, 117-118, 120, 163, 187-188, 202
- LÓPEZ, M. C., 21, 107, 121-122, 147, 158-159
- LORENZO, A., 171, 182
- LOSADA, S., 171, 181-183
- MACÍAS, F., 147, 158-159
- Macrófagos, 109, 161-163, 173, 175, 186, 193, 197
- Malaria/paludismo, 13-14, 17-18, 20, 25-27, 29-31, 33-35, 37, 39-43, 45-46, 49, 72-73, 84, 123, 171, 183
- MARAÑÓN, C., 107, 113, 116, 122, 151, 158-159
- MARTÍNEZ, E., 22, 133, 137, 144-145, 161, 170
- MCCLINTOCK, B., 147
- MEIS, J. DE., 109, 122
- MENTINK-KANE, M., 173, 183
- MHC
 MHC-I, 112
 MHC-II, 187
- Microarrays (micromatrices), 23, 60, 188-193, 198-200
- Mortalidad, 18-19, 26, 43, 50, 52, 77, 82, 91, 107-108, 126, 129
- Movimientos migratorios, 14, 48, 74, 133
- MURCIA, L., 87, 100, 104
- NÉSTOR, 134
- Neumonía atípica SARS-CoV, 47
- NOBEN-TRAUTH, N., 186-187, 203
- NOYA, O., 23, 123, 130, 171, 176, 179, 182-183
- OLDSTONE, M. B. A., 47, 62
- OLIVARES, M., 152-153, 157-159
- OMS/WHO, 30, 40, 51, 53, 55, 88, 90, 100, 104-105, 123, 127, 131, 161, 171, 183
- Pacientes asintomáticos, 36, 51, 98-99, 110-111, 115, 137
- Parasitemia, 34, 36, 42-43, 80, 90-91, 101, 103, 108, 126
- Parásitos, 31-36, 39, 43-44, 72, 88, 90, 93, 101, 103, 125, 127, 133, 136, 147-148, 151-152, 157, 161-163, 185
- PARKHOUSE, M., 19, 63, 68-69
- PCR, 33, 35, 68-69, 90, 100-105, 129, 134, 139, 188, 191-192
- Péptidos, 23, 45, 63, 65-67, 112-113, 116, 153, 166, 176, 178-180
- PÉREZ, A., 69, 93
- PÉREZ-MOLINA, J. A., 103, 105
- Phlebotominae*, 185
- Plasmodium falciparum*, 14, 25-27, 30-33, 35, 38, 43, 46, 120, 183
malariae, 27, 31
ovale, 27
vivax, 25, 27, 30-31
- Población emigrante, 15, 20, 74
 vulnerable, 74, 92, 175
- Prevalencia, 14, 26, 51, 64, 67, 74, 88, 93, 96, 148, 172, 185
- Prevención, 15, 25-26, 29, 42, 45, 55-57, 72, 77, 83, 91, 130
- Promastigote, 161, 186, 191-199, 201-202
- Protozoo emergente, 22, 133
 parásito, 107, 186, 189
- PUERTA, C., 107, 113, 121, 158-159
- Quimioterapia, 103, 117, 120, 172, 181
- Quinina, 18, 29-30, 37, 40, 42
- Quistes, 135, 137, 142-143
- RAMOS, I., 187-188, 201-202
- Ratones transgénicos, 60, 113, 116
- Resistencias, 18, 25, 30, 33-39
- Respuesta inmune innata, 109
 adquirida, 117
- REYES-LUGO, M., 127-128, 131
- ROJAS, B., 147
- ROSAS, G., 67-69
- RT-PCR, 33
- RUIZ-GUEVARA, R., 123

- SACKS, D., 186-187, 202-203
- SCHANTZ, P., 64, 68-69
- SCHIJMAN, A. G., 101, 105
- Schistosoma sp.*, 171, 180-181
- SCIUTTO, E., 66, 68-69
- Secuencias adyacentes, 148
- egoístas, 148
- SEGOVIA, M., 20, 87, 104, 116
- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (HIV), 26, 48, 162
- Sistema inmune, 33-34, 109, 111, 163, 187
- sanitario, 74, 81
- Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS), 19, 47, 52-62
- SOLARI, A. S., 101, 105
- spliced leader*, 151, 154-155, 165
- T. cruzi, 22, 75, 77, 80, 83, 87-96, 100-102, 107-110, 112-114, 117-118, 120, 122, 124-126, 128-129, 151-154, 156-158
- Taenia solium, 19, 63-64, 68-69
- TARLETON, R. L., 101, 105, 109-110, 113, 121-122
- Técnicas moleculares, 35, 90, 134
- THOMAS, M. C., 22, 107, 113, 116, 121, 122, 147, 151, 158-159, 170
- TOLEDO, M., 171, 183
- TORRES, J., 125, 130-131
- Tóxicos, 108, 174
- Trans-splicing, 154, 165
- Transcripción policistrónica, 164-165
- Transfectantes, 201
- Transmisión congénita, 75, 92-93, 124
- por transfusiones, 21, 75, 88
- vertical, 88, 96, 107
- Tratamiento, 14-15, 18, 20, 22-23, 25-26, 29-34, 36, 40-42, 45, 63, 65, 67, 72, 77, 81-84, 91-92, 99-105, 108, 111, 129-130, 142, 185, 187, 198
- Triatominos, 72, 76, 88, 125-128
- Tripanosomátidos, 20, 113-114, 150-151, 154, 156-157, 164-166, 185
- Tripomastigote, 87-88, 107, 124
- Trypanosomiasis, 73
- URDANETA-MORALES, S., 125, 130
- Vacuna de bloqueo de la transmisión, 44
- recombinante, 61, 66
- sintética, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183
- Vacunación, 48, 50, 55-56, 61, 63, 65-68, 179, 181
- VALLADARES, B., 22, 133, 144-145, 161, 170
- Vector, 19-20, 24-25, 28-29, 38, 43, 56, 69, 72, 75-77, 87, 92, 103, 107, 117-120, 122, 124, 126-128, 131, 162-163, 186, 192-193, 202
- Vías de transmisión, 75
- VIOTTI, R. C., 92, 102, 105, 121
- Virus emergentes, 47
- de la inmunodeficiencia humana (VIH/sida), 25-26, 48, 55, 81, 162, 185
- WINCKER, P. C., 100-101, 105
- Xenodiagnóstico, 90
- ZACKIEWICK, C., 82, 85
- ZAVALA-JASPE, R., 123
- Zoonosis, 19, 48, 52

Nota sobre los autores

EQUIPO INVESTIGADOR

Dirección

Vicente Larraga Rodríguez de Vera

Investigadores

Raquel Afonso Leshman

Belkisyolé Alarcón de Noya

Pedro Albajar-Viñas

Pedro José Alcolea Alcolea

Ana Alonso Ayala

Henry A. Bermúdez Ramírez

Agustín Benito Llanes

Beatriz Camps Carmona,

Patricia E. Carreira Moreno

Bartolomé Carrilero Fernández

Cecilia Colmenares

Daniel Deniz García

Zoraida Díaz-Bello

Adriana Egui Machado

Luis Enjuanes Sánchez

Elizabeth Ferrer Jesús

Pilar Foronda Rodríguez

Teresa Gárate Ormaechea

Marta García Cañadas

Luis Miguel González Martínez

María Asunción Iborra Bendicho

José Manuel Jiménez-Guardeño

Vicente Larraga Rodríguez de Vera

Marta López de Diego

Manuel Carlos López López

Jacob Lorenzo Morales

María Angelita Lorenzo Sarmiento

Sandra Losada Gallegos

Francisco Macías Huete

Concepción Marañón Lizana

Enrique Martínez Carretero

Laura Murcia Flores

José Luis Nieto-Torres

Óscar Noya González

Michael Parkhouse

Concepción Judith Puerta Bula

José Ángel Regla-Nava

Beatriz Rojas Ruiz

Raiza Ruiz-Guevara

Manuel Segovia Hernández

María del Carmen Thomas Carazo

Marilyan Toledo Alfonso

Basilio Valladares Hernández

Mar Velarde Rodríguez

Reinaldo Zavala Jaspe

RAQUEL AFONSO LEHMANN es licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Premio Extraordinario fin de carrera) y en Biología, ambas licenciaturas por la Universidad de La Laguna. Actualmente es becaria del

Departamento de Parasitología, Ecología y Genética de la misma universidad, donde desarrolla su tesis doctoral. Su investigación está orientada al estudio de proteínas implicadas en la regulación génica de protozoos parásitos.

BELKISYOLÉ ALARCÓN DE NOYA es licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Central de Venezuela (UCV), donde es actualmente profesora titular, y realizó su tesis doctoral en la Universidad de Tulane (Nueva Orleans). Ha sido jefa de la Cátedra de Parasitología de la Escuela Luis Razetti, directora del posgrado nacional de Parasitología y coordinadora general de la Facultad de Medicina, así como decana encargada de la Facultad de Medicina de la UCV. Fue presidenta de la Sociedad Parasitológica Venezolana, investigadora invitada en las universidades de Tours, Perpignan y Estrasburgo (Francia) (Programas PCP, CNRS y Ecos-Nord), Chiba (Tokio) e Hiroshima (Japón), y en el Instituto López Neyra (Granada, España). Sus investigaciones se han orientado desde estudios clínico-epidemiológicos de enfermedades parasitarias hasta el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico y la terapéutica de esas patologías. Ha publicado cerca de noventa trabajos científicos en revistas científicas indexadas y más de ciento setenta comunicaciones a congresos.

PEDRO ALBAJAR VIÑAS, doctor en Medicina Tropical, es coordinador del Programa de Control de la enfermedad de Chagas, del Departamento de Control de Enfermedades Tropicales Desatendidas de la Organización Mundial de la Salud. Ha sido investigador y profesor invitado de varias instituciones académicas y científicas de América Latina y Europa, y miembro de sociedades, asociaciones y organizaciones de medicina tropical y de cooperación internacional en Brasil, España y Suiza, así como investigador en medicina tropical y salud internacional. Ha desarrollado su experiencia profesional principalmente en América Latina y Europa, en el área de concentración actual en enfermedades tropicales desatendidas y enfermedad de Chagas, en particular. Ha publicado, a nivel nacional e internacional, varios artículos, informes técnicos y capítulos de libro, además de presentaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales y otras colaboraciones en publicaciones técnicas.

PEDRO JOSÉ ALCOLEA ALCOLEA, doctor en Biología, es experto en Genómica, Proteómica y Biología Molecular de *Leishmania*. Trabaja en el Laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

ANA ALONSO AYALA, doctora en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid (UCM), es experta en Genómica, Proteómica y Biología Molecular de *Leishmania*. Trabajó en la facultad de Veterinaria de la UCM y actualmente lo hace en el Laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

AGUSTÍN BENITO LLANES, doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, es especialista en diagnóstico y control molecular de malaria, tanto del agente *Plasmodium* como del vector *Anopheles*. En la actualidad es el director del Centro Nacional de Medicina Tropical del Instituto de Salud Carlos III en Madrid y coordinador de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) del mismo. Ha sido responsable del Centro de Referencia de Control de Endemias (proyecto de Guinea Ecuatorial). Ha publicado numerosos artículos científicos de la especialidad en revistas nacionales e internacionales.

HENRY A. BERMÚDEZ RAMÍREZ, licenciado en Química por la Universidad Central de Venezuela (UCV), es investigador de la Sección de Biohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical-UCV y coinvestigador participante en cuatro proyectos de investigación. Ha recibido entrenamiento en Síntesis de péptidos en fase sólida en el Instituto de Inmunología en Bogotá (Colombia), y cursos en técnicas de proteómica en La Habana (Cuba) y Estrasburgo (Francia), así como Síntesis de péptidos y secuenciación de proteínas en Estrasburgo (Francia). Sus principales áreas de investigación son la síntesis de péptidos, el uso de técnicas bioinformáticas y modelado molecular en el estudio de proteínas y en el área de proteómica, particularmente espectrometría de masas, todo lo anterior dirigido al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y vacunas de enfermedades infectocontagiosas y parasitarias empleando péptidos sintéticos. Posee varias publicaciones en revistas indexadas y comunicaciones a congresos.

BEATRIZ CAMPS CARMONA, licenciada en Ciencias de la Comunicación, es especialista en comunicación audiovisual y perita en lingüística, edición escrita y traducción (español, catalán, inglés, francés, italiano y portugués), así como experta en inteligencia cultural y logística multinacional e intercultural. Actualmente es asistente ejecutiva del Programa de Control de la enfermedad de Chagas, del Departamento de Control de Enfermedades Tropicales Desatendidas de la Organización Mundial de la Salud. Su experiencia profesional se ha desarrollado en España, Francia, Reino Unido y Suiza, en

el área de concentración actual en enfermedades tropicales desatendidas y enfermedad de Chagas. Es coautora de numerosos trabajos nacionales e internacionales publicados en medios audiovisuales e impresos.

PATRICIA E. CARREIRA MORENO es licenciada en Biología Molecular y posgrado en Genética Médica por la Universidad de Santiago de Compostela. En la actualidad está realizando la tesis doctoral en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, adscrita al proyecto BFU2007-65095 del Plan Nacional, centrada en el estudio de secuencias y factores proteicos implicados en la transcripción del retrotransposón LITc de *Trypanosoma cruzi*.

BARTOLOMÉ CARRILERO FERNÁNDEZ es licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Murcia, máster en Ciencias Biomédicas Tropicales y diploma en Medicina Tropical por el Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo II (Bélgica). Es facultativo especialista de Área de la Unidad Regional de Medicina Tropical en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Ha realizado estancias en el Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo II de Bélgica, el Hospital CEBEC Bonaberi Duala (Camerún) y el Instituto de Inmunología del Valle (Colombia). Sus áreas de investigación son las enfermedades tropicales y la biología molecular en tripanosomátidos. Ha publicado varios artículos en revistas especializadas como *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* y *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

CECILIA COLMENARES es licenciada en Bioanálisis y en Biología por la Universidad Central de Venezuela (UCV). Es personal de la Cátedra de Parasitología, en la Escuela de Medicina Luis Razetti de la Facultad de Medicina, e investigadora en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical de la UCV. Actualmente está culminando el doctorado en el Posgrado Nacional de Parasitología de la Facultad de Medicina de la mencionada universidad. Ha sido investigadora invitada en Perpignan (Francia) (programa ECOS NORD) para el entrenamiento en técnicas bioquímicas, inmunológicas y Proteómica; en el Centro de Ingeniería Genética de La Habana (Cuba), para entrenamiento en técnicas de Proteómica. Sus principales áreas de investigación han sido el inmunodiagnóstico y los estudios epidemiológicos de enfermedades parasitarias. Ha publicado numerosos trabajos en revistas indexadas, tiene varias comunicaciones a congresos, tres tutorías de tesis de pregrado y dos asesorías de tesis de posgrado.

DANIEL DÉNIZ GARCÍA es licenciado en Biología, Biología Molecular y Celular por la Universidad de La Laguna y doctorando del Área de Biología Molecular de Protozoos Parásitos del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias. Actualmente es responsable de implantación de técnicas diagnósticas in vitro en entidades privadas y públicas de la empresa AD Diagnost.

ZORAIDA DÍAZ BELLO es licenciada en Biología por la Universidad Central de Venezuela (UCV) y magister en Inmunología del Instituto de Investigaciones Científicas de Venezuela. Es investigadora en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical de la UCV y actualmente está culminando el doctorado en el posgrado individualizado de la Facultad de Medicina de la misma universidad, con la tesis «Enfermedad de Chagas: Análisis Integral de Factores de Riesgo en un brote por transmisión oral en Caracas-Venezuela». Es investigadora invitada del Instituto de Parasitología López Neyra (Granada). Sus principales áreas de investigación son el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de la toxoplasmosis y tripanosomiasis americana y la epidemiología de estas parasitosis. Ha publicado varios trabajos en revistas indexadas, tiene numerosas comunicaciones a congresos, dos tutorías de tesis de especialización y tres de tesis de pregrado, dos con mención honorífica.

ADRIANA ÉGUI MACHADO es licenciada en Biología por la Universidad Central de Venezuela y máster en Inmunología Molecular y Celular por la Universidad de Granada. Becaria predoctoral de la Junta de Andalucía adscrita al Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra-CSIC, su trabajo de investigación, que viene desarrollando bajo la tutoría de Manuel Carlos López y Concepción Marañón, está vinculado al estudio de la respuesta inmunológica frente a la infección de *T. cruzi*, centrándose principalmente en el reconocimiento diferencial de epítopes de *T. cruzi* en linfocitos T CD8+ circulantes de pacientes chagásicos en distintas fases de la enfermedad.

LUIS ENJUANES SÁNCHEZ, licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Valencia, obtuvo su doctorado en Ciencias por la Universidad Complutense de Madrid por su trabajo con el virus de la fiebre porcina africana realizado en el Centro de Investigación Biológica del CSIC. En la actualidad es profesor investigador en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC (Madrid). Trabajó en el Instituto Nacional de la Salud (NIH) en Bethesda (EE. UU.) como *Fogarty Fellow*. Sus trabajos se han basado en la replicación,

en la estructura antigénica, evolución y en la malignidad de los coronavirus, y en la actualidad se centran en la base molecular de la replicación y transcripción de los coronavirus, la interacción virus-huésped y el funcionamiento de los genomas coronavirus como vectores vacuna, con énfasis en TGEV y SARS-CoV. Ha publicado numerosos artículos de investigación y más de veinticinco libros relacionados con su especialidad.

ELIZABETH FERRER JESÚS, licenciada en Bioanálisis por la Universidad de Carabobo (UC) (Venezuela), y en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, es doctora en Biología Molecular por esta última universidad. Realizó su formación posdoctoral en el Instituto de Salud Carlos III (RICET). Actualmente es profesora de Parasitología a dedicación exclusiva, escalafón titular, en la Facultad de Ciencias de la Salud de la UC, Sede Aragua, y jefa del Departamento de Parasitología y de la Sección de Parasitología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la citada universidad. Pertenece a la Junta Directiva de la Sociedad Parasitológica Venezolana (Secretaría de Actas), a la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, capítulo Aragua, y es miembro del Consejo Superior de Investigación y Producción Intelectual de la Facultad de Ciencias de la Salud (UC). También es coordinadora de la Comisión de Investigación del Departamento de Parasitología de dicha universidad. Ha participado en el Programa de Promoción al Investigador (PPI) del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación, PPI n.º 8.343, nivel II. Su línea de investigación es el diagnóstico inmunológico y molecular de enfermedades parasitarias, principalmente en teniasis/cisticercosis, enfermedad de Chagas y leishmaniasis. Ha publicado varios libros y artículos en revistas especializadas nacionales e internacionales.

PILAR FORONDA RODRÍGUEZ, doctora en Biología, es profesora contratada del área de Parasitología de la Universidad de La Laguna y habilitada para profesora titular de dicha disciplina. Ha publicado más de cuarenta artículos en revistas internacionales, especializados en epidemiología parasitaria y taxonomía molecular de parásitos.

TERESA GÁRATE ORMAECHEA es licenciada en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela y doctora por la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Realizó su formación posdoctoral en Parasitología Molecular, en el National Institute for Medical Research, Mill Hill (Londres) y en la División de Biología Celular, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid). Es miembro de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) financiada por el Instituto de Salud Carlos III. Es investi-

gadora y facultativa jefa de la Sección del Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Madrid), así como profesora ayudante de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la UCM. Sus líneas de investigación se centran en el control y biología de helmintos: diagnóstico, vacunación y relaciones hospedador-parásito, principalmente en teniasis/cisticercosis, fasciolosis, y anisakuoidosis. Ha publicado numerosos libros y artículos en revistas especializadas nacionales e internacionales.

MARTA GARCÍA CAÑADAS, licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada, ha sido becaria FPI (BES-2004-5729) y contratada para la realización de trabajos de investigación y tesis doctoral sobre el estudio de factores implicados en la regulación de la expresión del elemento móvil (LINE) más representado en el genoma de *Trypanosoma cruzi*, LITc y el mecanismo de su transposición in vivo. Ha participado en proyectos de investigación del Ministerio de Educación y Ciencia, Ministerio de Ciencia y Tecnología, de la Red de Enfermedades Tropicales, así como en proyectos de excelencia de la Junta de Andalucía. Ha realizado una estancia en The University of Michigan Medical School, Department of Human Genetics, con el grupo de investigación del PhD. John V Moran. Es coautora de «LITc non-LTR retrotransposons from *Trypanosoma cruzi* contain a functional viral-like self-cleaving 2A sequence in frame with the active proteins they encode», publicado en *Cell Mol Life Sci*.

LUIS MIGUEL GONZÁLEZ MARTÍNEZ es licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid y doctor en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna (Tenerife). Es investigador titular de los Organismos Públicos de Investigación en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. Ha aplicado su especialización en bioquímica y biología molecular al estudio de diferentes parásitos, desarrollando herramientas diagnósticas y llegando a la caracterización molecular y funcional de proteínas con la preparación de determinadas vacunas como objetivo final. También ha colaborado en el Centro Nacional de Medicina Tropical y el Centro Nacional de Microbiología, y con los equipos de investigación que componen las Redes de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET). Ha realizado estancias en el Lindsley F. Kimball Research Institute (New York Blood Center). Ha dirigido tres tesis doctorales y ha sido galardonado con el premio a la mejor comunicación escrita en el II Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Su trayectoria científica está avalada con varios artículos en revistas nacionales e internacionales, numerosas comunicaciones a congresos, así como la participación en proyectos científicos nacionales e internacionales.

M.^a ASUNCIÓN IBORRA BENDICHO, licenciada en Farmacia y especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, es facultativa especialista de Área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Su área de investigación es la biología molecular en tripanosomátidos. Ha publicado varios artículos en revistas especializadas como *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* y *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

JOSÉ MANUEL JIMÉNEZ-GUARDEÑO, licenciado en Biología por la Universidad de Málaga y máster en Biomedicina Molecular en la Universidad Autónoma de Madrid, desde 2009 está formándose como investigador predoctoral en el laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC) de Madrid, dirigido por Luis Enjuanes, con una beca JAE-CSIC. Actualmente estudia la relevancia de la proteína E del SARS-CoV en su interacción con el huésped. Ha publicado numerosos artículos de investigación en revistas especializadas.

VICENTE LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA, licenciado en Medicina y Cirugía, y doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, realizó estudios posdoctorales en la Universidad Hebrea y el Instituto Weizman de Israel, y en la Universidad Johns Hopkins de Estados Unidos como *Fogarty Fellow*. En la actualidad es director del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. Ha sido vicepresidente del CSIC y científico invitado en la Medical School de la Universidad de Nueva York. Pertenece a diversas sociedades científicas, entre ellas, la Academia de Ciencias de Nueva York, la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, y la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Es miembro de la Real Academia Nacional de Farmacia. Forma parte de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) financiada por el Instituto de Salud Carlos III. Su carrera científica se ha centrado en la estructura de las membranas biológicas y mecanismos de activación celular y ha trabajado en el desarrollo de vacunas recombinantes frente a *Leishmania infantum* y en la activación génica durante el mecanismo de protección frente al parásito. Ha publicado un centenar de trabajos en libros y revistas nacionales e internacionales especializadas.

MARTA LÓPEZ DE DIEGO es licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid y doctora en Ciencias por la misma universidad. Desde el año 2002 forma parte del laboratorio de Luis Enjuanes en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) de Madrid. Ha recibido becas de

colaboración y de formación de profesorado universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte entre los años 2002-2007. Actualmente estudia la relevancia de la proteína E del SARSCoV en su interacción con el huésped, mediante técnicas de genómica y proteómica funcionales. Además, está directamente implicada en el estudio de la inducción de protección mediada por mutantes atenuados de SARS-CoV. Ha publicado numerosos artículos de investigación en revistas especializadas.

MANUEL CARLOS LÓPEZ LÓPEZ, doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Granada y farmacéutico especialista en Análisis Clínicos, es investigador científico del CSIC y jefe del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, así como académico correspondiente de la Academia Iberoamericana de Farmacia. Ha realizado estancias en el Instituto de Inmunología de Bogotá (Colombia) y en la Tuberculosis and Related Infections Unit, MRC, Hammersmith Hospital (Londres). Su investigación se centra en la caracterización molecular, inmunológica y funcional de genes y antígenos de los parásitos *Trypanosoma* y *Leishmania*, relevantes para el establecimiento de sistemas específicos de diagnóstico y desarrollo de inmunoterapia frente a las enfermedades que ocasionan, así como en la caracterización molecular y funcional de secuencias repetidas de DNA presente en el genoma de los mismos. Es director de quince tesis doctorales y miembro de varias sociedades científicas nacionales e internacionales, como la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional o la American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Participa en la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) financiada por el Instituto de Salud Carlos III y es miembro de su Comité de Dirección. Dirige tres proyectos de investigación de I+D+I y es coinvestigador de un proyecto tecnológico. Es autor de un centenar de publicaciones científicas de la especialidad y coautor de cuatro patentes internacionales licenciadas.

JACOB LORENZO MORALES, doctor en Biología, es especialista en amebas de vida libre. Ha realizado diversas estancias en los mejores laboratorios del mundo en investigación de este tipo de protozoos emergentes y ha publicado más de treinta artículos en revistas internacionales, principalmente sobre dichos protozoos.

MARÍA ANGELITA LORENZO SARMIENTO, licenciada en Química por la Universidad Central de Venezuela (UCV), es investigadora en la Sección de Biohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical de la UCV y actualmente está

cursando estudios de doctorado en la Facultad de Farmacia-UCV (Posgrado Química de Medicamentos). Ha realizado estancias en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia en Bogotá y en el Parc Cientific de Barcelona (España). Su principal área de investigación es la síntesis de péptidos en fase sólida con aplicación en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y desarrollo de vacunas, así como el desarrollo de nuevos fármacos en el área de esquistosomiasis y leishmaniasis. Ha publicado varios trabajos científicos en revistas indexadas.

SANDRA LOSADA GALLEGOS, licenciada en Biología por la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV), es investigadora en la Sección de Biohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical de dicha universidad y actualmente está culminando el doctorado en el Posgrado Nacional de Parasitología de la Facultad de Medicina (UCV). Ha recibido entrenamientos de larga duración en técnicas básicas de Biología Molecular en Bogotá (Colombia), en técnicas bioquímicas e inmunológicas en Tours (Francia) y en técnicas de proteómica en Estrasburgo (Francia). Ha sido miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Parasitológica Venezolana y miembro del Comité Organizador del XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología en Venezuela. Sus principales áreas de investigación son el inmunodiagnóstico, inmunoprolifaxis y quimioterapia en esquistosomiasis mansoni y otras enfermedades parasitarias. Ha publicado numerosos trabajos en revistas indexadas, tiene varias comunicaciones a Congresos y dos tutorías de tesis de pregrado.

FRANCISCO MACÍAS HUETE es licenciado en Biología y máster universitario en Análisis biológico y diagnóstico de laboratorio por la Universidad de Granada. Ha sido becario FPI de la Junta de Andalucía, proyecto de excelencia CVI 1227. Es miembro de la RED de enfermedades Tropicales RETIC. Actualmente se encuentra finalizando los estudios de tesis doctoral en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, centrada en el estudio de secuencias promotoras presentes en retroelementos de tripanosomátidos. Es coautor de «Nucleic acids binding properties of the C2-LITc Nucleic Acid Chaperone encoded by LITc Retrotransposon» publicado en *Biochemistry Journal* y de la revisión sobre elementos móviles de parásitos que infectan mamíferos «The biology and evolution of transposable elements in parasites» publicada en *Trend in Parasitology*.

CONCEPCIÓN MARAÑÓN LIZANA es doctora en Ciencias Químicas por la Universidad de Granada y actualmente es investigadora contratada en el Instituto

de Parasitología y Biomedicina López Neyra-CSIC (Granada). Trabajó durante seis años en el Instituto Cochin de París y recibió el IAS Young Scientist Travel Grant Award en 2001 por sus aportaciones en la investigación sobre el sida, y la bolsa L'Oréal-Unesco «Por las mujeres en la ciencia» en 2009. Durante su carrera científica ha estudiado diversos aspectos de la modulación de la respuesta inmunitaria en enfermedades infecciosas y tumorales, y en la actualidad estudia la respuesta de linfocitos T CD8+ en pacientes de la enfermedad de Chagas. Ha publicado numerosos artículos en revistas científicas especializadas.

ENRIQUE MARTÍNEZ CARRETERO es doctor en Farmacia por la Universidad de La Laguna, donde actualmente es profesor titular de Parasitología y ostenta el cargo de decano de la Facultad de Farmacia. Es miembro de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) financiada por el Instituto de Salud Carlos III. Desarrolla su investigación en inmunología y biología molecular de protozoos parásitos dirigido al diagnóstico y estudio de la biología celular de especies de tripanosomátidos y amebas de vida libre. Ha publicado numerosos trabajos sobre la biología molecular de proteínas de diversos parásitos en revistas internacionales.

LAURA MURCIA FLORES, doctora en Biología por la Universidad de Murcia, es investigadora contratada en la Unidad Regional de Medicina Tropical del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Pertenece a la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) del Sistema Nacional de Salud. Sus líneas de investigación son la genómica y biotecnología molecular de hongos, telomerasa y cáncer, y la biología molecular de tripanosomátidos. Ha publicado varios artículos en revistas especializadas como *Molecular Microbiology* y *The Journal of Biological Chemistry*.

JOSÉ LUIS NIETO-TORRES es licenciado en Biología y en Bioquímica por la Universidad de Salamanca y máster en Biología Molecular en la Universidad Autónoma de Madrid. Desde 2008 dispone de una beca predoctoral JAE-CSIC en el laboratorio de Coronavirus del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), dirigido por Luis Enjuanes. Actualmente está dedicado al estudio de la relevancia de la proteína de la envuelta (E) en la patogénesis del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Ha publicado numerosos artículos de investigación en revistas especializadas.

ÓSCAR NOYA GONZÁLEZ, licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad Central de Venezuela (UCV), se doctoró en Parasitología y Medicina Tropical

en Louisiana State University en Nueva Orleans (EE. UU.). Es profesor titular de la Cátedra de Parasitología en la Escuela de Medicina Luis Razetti de la Facultad de Medicina de la UCV, y jefe del Centro para Estudios sobre Malaria de Instituto de Altos Estudios en Salud Doctor Arnoldo Gabaldón del Ministerio de Salud de Venezuela. Fue presidente de la Sociedad Parasitológica Venezolana, investigador invitado en las universidades de Tours, Perpignan y Estrasburgo (Francia) y Chiba (Tokio) e Hiroshima (Japón), director del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina y presidente de la Federación Latinoamericana de Parasitología. Perteneció al Comité de I+D en Vacunas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y al Comité Asesor Científico del Programa de Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe de la Universidad de las Naciones Unidas. Es miembro de la Academia de Ciencias de América Latina. Sus investigaciones van desde estudios clínico-epidemiológicos de enfermedades parasitarias hasta la identificación y síntesis química de péptidos para el diagnóstico y vacunas de esas patologías. Ha publicado cerca de noventa trabajos en revistas científicas indexadas y más de doscientas comunicaciones a congresos.

MICHAEL PARKHOUSE bioquímico e inmunólogo, realizó su período posdoctoral en California en los institutos Scripps y Salk. Actualmente es jefe de grupo en el Gulbenkian Institute of Science (Portugal). Tuvo una plaza en el National Institute of Medical Research (Reino Unido) y fue director del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid), y jefe de Inmunología en el Pirbright laboratory del Institute for Animal Health (Reino Unido). Su investigación se ha realizado en el área de la infección y la inmunidad, y su interés científico está dedicado a las relaciones e interacciones huésped-parásito.

CONCEPCIÓN JUDITH PUERTA BULA es doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada y bacterióloga de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), donde es profesora titular, jefa del Laboratorio de Parasitología Molecular y del Grupo de Investigación de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, que dirige actualmente. Inició su carrera en el Instituto de Inmunología del Hospital San Juan de Dios, contribuyendo con el estudio de la respuesta inmune frente a *Plasmodium falciparum* y la secuenciación de péptidos y proteínas de tripanosamátidos. Ha contribuido a la caracterización molecular de los genes que codifican para la proteína histona H2A de *T. cruzi*, en colaboración con Manuel Carlos López López. En la PUJ ha creado y liderado la investigación y la formación de estudiantes de pre- y posgrado, en el área de Parasitología. Su trabajo se ha centrado en el estudio molecular de *T. rangeli* como modelo

de aproximación a su contraparte patogénica *T. cruzi*, en el análisis de la respuesta inmune en pacientes chagásicos, en el desarrollo de pruebas de PCR para la identificación y detección de ambas especies de tripanosomas, en el estudio de la flora bacteriana potencialmente simbiótica de los insectos triatomíneos transmisores de estos parásitos así como en el estudio de posibles blancos terapéuticos contra la infección por *Leishmania braziliensis*. Es autora de numerosas publicaciones científicas de la especialidad, presentadas en congresos nacionales e internacionales, y merecedora de varias distinciones por su trabajo en el área.

JOSÉ ÁNGEL REGLA NAVA, licenciado en Química y Farmacobiología por la Universidad de Guadalajara y máster en Biología Molecular y Celular por la Universidad Autónoma de Madrid, actualmente está formándose como investigador predoctoral en el laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) de Madrid, dirigido por Luis Enjuanes, con una beca de la Caixa. Durante este período desarrolla un proyecto sobre el análisis de los genes virales responsables de la virulencia del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo y severo (SARS).

BEATRIZ ROJAS RUIZ, licenciada en Biología y máster oficial en Enfermedades parasitarias tropicales, es becaria predoctoral adscrita en el proyecto de investigación del Plan Nacional BFU-2007-64999, bajo la dirección de Manuel Carlos López López y María del Carmen Thomas Carazo, en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra-CSIC. Sus estudios están centrados en la determinación del mecanismo de integración del retrotransposón LITc en el genoma de *T. cruzi* y de las interacciones entre las proteínas que LITc codifica y el RNA intermediario.

RAIZA RUIZ-GUEVARA, médica-cirujana por la Universidad Central de Venezuela (UCV), es médico pediatra egresada del Hospital Universitario de Caracas. Cursó la maestría de Medicina Tropical en la Universidad Nacional de Brasilia (Brasil) y el doctorado en Medicina Tropical e Infectología, en la Universidad Federal do Triângulo Mineiro, en Uberaba (Brasil). Actualmente es jefa de la Cátedra de Parasitología de la Escuela de Medicina Luis Razetti de la UCV. Sus investigaciones se han orientado a estudios clínico-epidemiológicos de enfermedades parasitarias y evaluación de nuevos métodos para el reconocimiento de esas patologías. Ha publicado varios trabajos en revistas científicas indexadas y más de treinta comunicaciones a congresos.

MANUEL SEGOVIA HERNÁNDEZ, doctor en Medicina por la Universidad de Murcia, es catedrático de Microbiología y jefe de servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), así como director de la Unidad Regional de Medicina Tropical. Ha realizado estancias como becario posdoctoral PFPI en la School of Tropical Liverpool Medicine (Reino Unido). Su investigación se centra en los estudios sobre bases moleculares de la resistencia a antimicrobianos y en biología molecular en tripanosomátidos. Es miembro de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) financiada por el Instituto de Salud Carlos III. Ha publicado más de cien artículos científicos en revistas nacionales e internacionales especializadas.

MARÍA CARMEN THOMAS CARAZO, doctora en Farmacia, especialidad Bioquímica y Biología Molecular, es científica titular del CSIC y coordinadora del Servicio de Genómica y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (IPBLN). Es profesora y coordinadora de diferentes másteres en las universidades de Granada y de La Laguna. Ha realizado diferentes estancias posdoctorales en las universidades de California, San Francisco y en Glaxo-Wellcome, en Londres. Actualmente dirige un laboratorio en el IPBLN, centrado en la caracterización molecular de macromoléculas de interés en biomedicina, en el estudio de secuencias móviles de ADN y en secuencias contenidas en diferentes especies de *Trypanosoma* y *Leishmania*, responsables de la plasticidad génica de los genomas de los mencionados patógenos. Es miembro de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) financiada por el Instituto de Salud Carlos III. Es directora de seis tesis doctorales. Es autora de más de cincuenta artículos publicados en revistas recogidas en el Science Citation Index, y de varios capítulos de libros de la especialidad.

MARILYAN PILAR TOLEDO ALFONSO es licenciada en Bioanálisis por la Universidad Central de Venezuela, actualmente adscrita a la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Medicina de la misma universidad. Sus áreas de investigación están orientadas al desarrollo y mejoramiento del inmunodiagnóstico de enfermedades infecciosas y vacunas anti *Schistosoma mansoni*. Ha publicado dos artículos científicos en revistas indexadas especializadas.

BASILIO VALLADARES HERNÁNDEZ es doctor en Farmacia por la Universidad de Granada y especialista en Análisis Clínicos. Ha sido decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna. En la actualidad es catedrático de Parasitología de la Universidad de La Laguna y director del Instituto Uni-

versitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, así como vicepresidente de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional. Es miembro de la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, RD06/0021) financiada por el Instituto de Salud Carlos III. Ha publicado casi noventa artículos científicos en revistas científicas especializadas y ha dirigido diecisiete tesis doctorales sobre parasitología.

MAR VELARDE RODRÍGUEZ, licenciada en Farmacia, es maestra en Salud Internacional y Medicina Tropical y en Salud Pública. Es también perita en farmacología, logística mundial de distribución de medicamentos y farmacovigilancia, así como especialista en salud pública y comunitaria. Actualmente es consultora del Programa de Control de la enfermedad de Chagas, del Departamento de Control de Enfermedades Tropicales Desatendidas de la Organización Mundial de la Salud y de la Federación Internacional de Sociedades de la Cruz Roja y de la Media Luna Roja. Es Beca Fulbright de los Estados Unidos de América. Su experiencia profesional se ha desarrollado en España, Suecia y Suiza, en el área de concentración actual en salud internacional y enfermedades tropicales desatendidas. Es coautora de varios trabajos nacionales e internacionales publicados en medios especializados.

REINALDO ZAVALA-JASPE, licenciado en Biología por la Universidad Central de Venezuela (UCV), actualmente está cursando estudios de doctorado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Posgrado de Bioquímica). Trabajó como investigador en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical de la UCV en el área de la Enfermedad de Chagas. Su principal campo de investigación ha sido el diagnóstico inmunológico y molecular de la Enfermedad de Chagas y en la actualidad está dirigido al estudio de la regulación del calcio en células infectadas con rotavirus. Ha publicado varios trabajos en revistas indexadas, tiene comunicaciones a congresos y una tutoría de tesis de pregrado.

