

El Residente

ARTÍCULO DE REVISIÓN - PUNTO DE VISTA

Importancia de las proteínas de superficie y secretadas en la capacidad infectiva de tres patógenos humanos

Martínez-Velasco ML,* Espinoza B*

RESUMEN. Varios miembros de la familia *Trypanosomatidae* como *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* son parásitos patógenos del humano que presentan una diversidad de mecanismos para causar diferentes enfermedades, pero tienen en común que varias proteínas de superficie y secretadas juegan un papel principal en la biología de cada una de estas especies. Entre las proteínas secretadas están las proteasas, que son moléculas muy abundantemente expresadas en estos organismos, además de otras moléculas de diferente naturaleza que les permiten evadir la respuesta inmune del hospedero. Es tal la importancia de las proteínas secretadas en estos parásitos que presentan diversos mecanismos de secreción de proteínas, como la secreción mediante vesículas, o la existencia de estructuras especializadas para la secreción como el bolsillo flagelar, organelo cuya principal función es el intercambio de diversas moléculas con el medio exterior.

Palabras clave: Tripanosomátidos, patógenos, proteínas, superficie, proteínas secretadas.

ABSTRACT. Several species of trypanosomatids *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* are human pathogens that present a variety of different mechanisms to cause disease, but have in common the important biology role of surface and secreted proteins. Among the most abundant secreted proteins are proteases, and other molecules that allows them to evade the host immune response. The importance of secreted proteins in these parasites is such, that they have different mechanisms of secretion such as secretion through vesicles or even have a flagellar pocket, organelle whose main function is the exchange of different molecules with the external environment.

Key words: Trypanosomatids, pathogens, proteins, surface, secreted proteins.

Tres de las enfermedades parasitarias más ampliamente distribuidas en el mundo son ocasionadas por organismos que pertenecen a la misma orden: los cinetoplastidos, familia *Trypanosomatidae*. Estos organismos son: *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* y *Trypanoso-*

ma brucei, agentes causales de la leishmaniasis, tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) y tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) respectivamente. Estas parasitosis tienen aspectos en común: como presentar el mismo organelo, el cinetoplasto, que es un acúmulo de material genético en el citoplasma; ser transmitidas por vectores, que en los tres casos son insectos hematófagos; además, presentan un complejo ciclo de vida que implica al menos dos estadios distintos en vertebrados e invertebrados. Epidemiológicamente, estas enfermedades son relevantes por el número de humanos infectados y enfermos pero además por el hecho de que los fármacos empleados en su tratamiento son poco eficaces y tóxicos, aunado al hecho de la carencia de una vacuna que pudiera prevenir dichas enfermedades.¹

El término *leishmaniasis* agrupa un amplio espectro de enfermedades humanas ocasionadas por 5 diferentes especies de *Leishmania*: *L. major*, *L. donovani*, *L.*

* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dirección para correspondencia:
Circuito Exterior SN Ciudad Universitaria
Coyoacán, México, D.F. Tel. 55 56228943, Fax 56223369

Abreviaturas:
VSG: Glicoproteínas de superficie variables
GPI: Glicosilfosfatidilinositol
kDa: kilo Dalton

Recibido: 4 de agosto del 2009
Aceptado con modificaciones: 5 de septiembre del 2009

mexicana, *L. braziliensis* y *L. amazonensis*. De acuerdo a datos de la OMS se calcula una incidencia anual de aproximadamente 2 millones de casos en 88 países.² La enfermedad de Chagas se presenta en casi todo el continente americano con un estimado de aproximadamente 16-18 millones de infectados,³ para el caso de la tripanosomiasis africana que es causada por diferentes subespecies de *Trypanosoma brucei* se calcula que se presentan entre 300,000 y 500,000 casos nuevos anuales y que éstos van a ser mortales por las dificultades de su tratamiento⁴ (Figura 1).

Si bien estos tres parásitos presentan similitudes, también muestran diferencias, y quizá una de las más relevantes es el mecanismo de evasión de la respuesta inmune de sus hospederos: *T. brucei* distrae al hospedero cambiando frecuentemente sus principales proteínas de superficie, mientras *T. cruzi* expresa una gran variedad de proteínas de superficie y *L. major* altera las funciones de los macrófagos que ha infectado. Las proteínas de superficie parecen tener un papel importante en la biología de estos parásitos. Estas proteínas no sólo se localizan en la superficie celular sino que pueden llegar a ser secretadas (Cuadro 1). Las proteínas pueden ser recicladas desde y hacia la superficie del parásito mediante una vía endocítica y exocítica en un organelo llamado bolsillo flagelar, que emerge del citoplasma celular en la región posterior de la célula. Este organelo también tiene la im-

portante función de remover anticuerpos del hospedero que se hayan unido al parásito.⁵ Este organelo es de suma importancia para la célula, ya que es por ahí donde se da el intercambio de moléculas con el medio exterior⁶ (Figura 2). Junto con el bolsillo flagelar, otro organelo importante en la secreción de proteínas es el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático que participa en la formación de vesículas que migrarán hacia el bolsillo flagelar para ser secretadas; estas vesículas no presentan un contenido denso, por lo que no son fácilmente distinguibles de las vesículas endocíticas que se forman en la región del bolsillo flagelar y que están involucradas en el procesamiento de otras macromoléculas importantes.⁷

En *T. brucei* se sabe que por el bolsillo flagelar hay tráfico molecular y reciclamiento de proteínas como la prociclina y las glicoproteínas de superficie variables (VSG). Estas dos son las proteínas de superficie más abundantes y se transportan y reciclan desde el citoplasma, vía bolsillo flagelar, hacia la superficie celular, donde tienen funciones en el ciclo de vida del parásito.⁸

De acuerdo al destino de las proteínas secretadas se han clasificado en tres grupos: a) proteínas integrales o periféricas que se insertan en el bolsillo flagelar y subsecuentemente migran a otras regiones de la membrana. En este grupo se incluyen a las VSG de las formas sanguíneas de *T. brucei*⁹ y la cruzipaina de

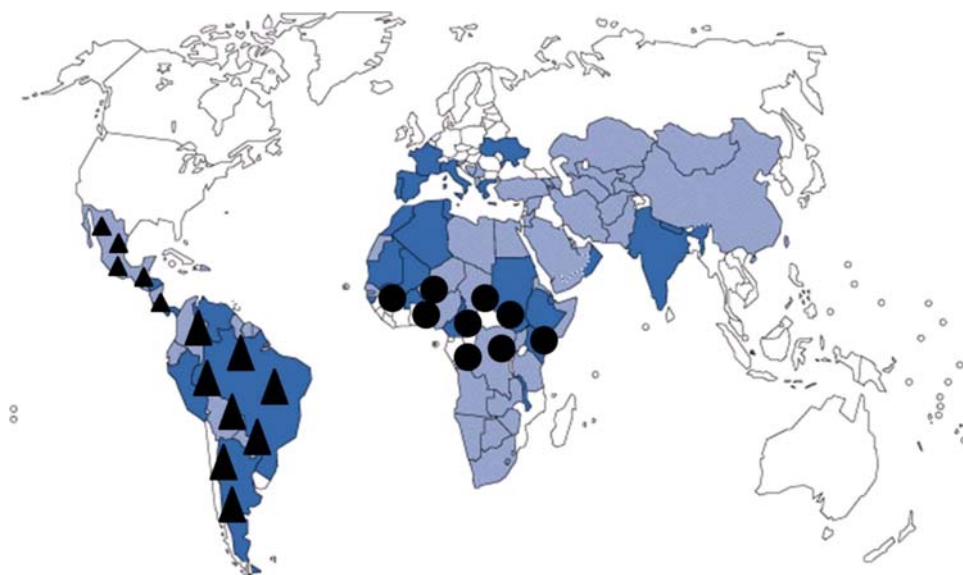


Figura 1. Distribución mundial de parasitosis causadas por cinetoplastidos. Mapa mundial donde se observa la distribución de la leishmaniasis (en dos tonos de gris), la enfermedad de Chagas (triptanosomiasis americana) (triángulos negros) y la enfermedad del sueño (triptanosomiasis africana) (círculos negros).

Cuadro I. Proteínas secretadas y su papel en el hospedero.

Parásito	Molécula	Función en el hospedero
<i>Leishmania</i>	Lipofosfoglicanos	Ruptura de fagolisosoma
	Fosfatasa ácida	Ruptura de fagolisosoma
<i>T. brucei</i>	Prociclina	Evasión respuesta inmune
	Glicoproteína de superficie variante VSG	Evasión respuesta inmune
<i>T. cruzi</i>	Cruzipaina	Hidroliza anticuerpos
	TcCPmet	Proteasa
	Proteasa de serina de 75 kDa	Hidrólisis péptidos en el insecto vector
	Tc80	Degrada colágeno
	T-DAF	Inactiva sistema complemento

T. cruzi;¹⁰ b) el segundo grupo está compuesto por las proteínas que se acumulan en organelos especiales, como los megasomas de *Leishmania*; y c) el tercer grupo que incluye a las proteínas que van a ser liberadas en el bolsillo flagelar donde estarán como proteínas solubles, como la cruzipaina de *T. cruzi* y los proteofosfoglicanos en *Leishmania*,¹¹ mientras que otras polimerizan dentro del bolsillo como la fosfatasa ácida encontrada en *Leishmania*.¹² Estudios realizados en *T. brucei* han mostrado que VSG sin el anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol, molécula que sirve de anclaje de proteínas a la superficie de la célula) no son secretadas eficientemente.¹³

T. brucei desarrolló como su principal mecanismo de protección una capa de proteínas que rodea toda la célula; esta capa está formada por un solo tipo de VSG que cambia constantemente en el estadio sanguíneo y la prociclina en el estadio presente en el insecto; estas dos proteínas le ayudan al parásito a evadir la respuesta inmune.¹⁴

T. cruzi presenta una gran cantidad de moléculas con actividad proteolítica, entre ellas la más abundante es la cruzipaina, una proteasa de cisteína que parece tener un papel primordial en la metaciclo génesis

(proceso de transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, fase infectiva para el humano). Además de que puede hidrolizar anticuerpos del hospedero y generar kininas que actúan como agentes proinflamatorios.¹⁵ Mediante manipulación genética se logró la sobreexpresión de la cruzipaina y se pudo saber que esta modificación aumenta la capacidad del parásito a transformarse a la fase infectiva.¹⁶

Otra proteasa de cisteína que se demostró que es secretada por los tripomastigotes es la denominada TcCPmet con un peso aproximado de entre 97 y 116 kDa; debido a que otras proteasas en el parásito tienen una función importante en la invasión celular se cree que esta proteasa pudiera tener un papel similar, esta proteína no es detectada en extractos totales del parásito, sólo en los sobrenadantes de cultivo, lo que indica que esta proteína es totalmente secretada.¹⁷

Otra peptidasa de *T. cruzi*, en este caso una proteasa de serina, se ha localizado también en el bolsillo flagelar, en la membrana y en vesículas de epimastigotes, lo que la hace una posible candidata a ser una enzima secretada y además posiblemente tenga una función en proteólisis intracelular en los reservosomas. La proteasa de serina de 75 kDa de *T. cruzi* sólo es capaz de hidrolizar péptidos y no grandes proteínas, por lo que pudiera tener como función la de proteger al epimastigote de la respuesta inmune del insecto vector y de esta manera afectar el proceso de metaciclo génesis.¹⁸

Otra función que tienen las enzimas secretadas por el parásito tiene que ver con facilitar la entrada del parásito a las células del hospedero y para ello *T. cruzi* tiene una proteinasa de 80 kDa denominada Tc80, que es capaz de degradar el colágeno tipo I y IV pre-



Figura 2. Epimastigote de *T. cruzi*, donde se observa el bolsillo flagelar (BF), núcleo (N), cinetoplasto (C) y flagelo (F).

sente en la matriz extracelular, facilitando de este modo la invasión celular.¹⁹

Otra proteína secretada por los tripomastigotes es la denominada T-DAF que es una proteína de 87-93 kDa que inactiva al sistema de complemento sérico del hospedero; esto lo hace interfiriendo con la formación y acelera el decaimiento de la convertasa C3 del complemento y de esta manera permite que el parásito sea resistente a este mecanismo de defensa por parte del hospedero.²⁰ Adicionalmente, presenta otra molécula que también inhibe al sistema de complemento; la glicoproteína de 160 kDa tiene un papel en el mecanismo de defensa del parásito mediante la inactivación de C4b del complemento.²¹

En el caso de *Leishmania*, las moléculas que son secretadas contienen lipofosfoglicanos que forman parte fundamental de su membrana y es el componente más abundante. En el caso de los promastigotes de *L. mexicana* mediante el bolsillo flagelar se secretan dos proteínas: la fosfatasa ácida en su forma de fosfoglicoproteína de 100 kDa y un fosfoglicano de alto peso; estas moléculas forman una red que se ha observado *in vitro* y que pudiera corresponder a lo observado en el tracto digestivo de las moscas de arena, el transmisor de este parásito. Los amastigotes de *L. mexicana* liberan fosfoglicano de alto peso molecular dentro de la vacuola parasitófora de macrófagos infectados, por lo que se ha hipotetizado que estas proteínas serían liberadas previo a la ruptura de los macrófagos infectados y por lo tanto podrían contribuir a la patología del desarrollo de la lesión.²²

Mediante el empleo de novedosas herramientas, como la proteómica se ha podido determinar que *L. donovani* secreta una gran cantidad de proteínas al medio, de las cuales se identificaron 151 de ellas; se ob-

servó que sólo unas pocas proteínas son secretadas mediante mecanismos clásicos que involucran el transporte mediado por una secuencia señal, este es el caso de las dos proteínas de superficie más abundantes: la proteasa Gp63 y el proteofosfoglicano. En contraste, se encontró una gran cantidad de proteínas secretadas mediante un sistema de vesículas. Entre las proteínas que se identificaron, predominan aquellas que tienen un papel importante en la sobrevivencia del parásito en el fagolisoma al ayudarlo a salir antes de ser eliminado, mientras que de las proteínas consideradas como factores de virulencia se pudieron identificar algunas proteasas, chaperonas como hsp 60 y 70 además de las proteínas involucradas en la formación de vesículas de transporte.²³

Los cinetoplastidos patógenos del humano causan patologías muy diferentes como ya se mencionó, pero estos tres parásitos tienen en común, como parte de su patogenicidad, la capacidad de alterar la respuesta inmune de los hospederos y si bien esto lo hacen de distintas formas comparten la importancia de sus proteínas de superficie, pero sobre todo las proteínas que pueden estar siendo secretadas. Este papel va desde ayudar para impedir que sean eliminados antes de poder invadir las células del hospedero, hasta el momento en que, una vez que se han multiplicado intracelularmente, deben de diseminarse en el hospedero y para ello cuentan con diversas proteasas que les permite salir de unas células e invadir otras. Para que esta secreción de proteínas sea exitosa cuentan con diversos mecanismos que les permite exportar a una gran cantidad de proteínas; algunas de estas proteínas pudieran ser consideradas como posible blanco terapéutico dada la importancia que tienen en la biología del parásito.

Bibliografía

1. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005; 309: 404-409.
2. WHO/TDR (World Health Organization-The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases) Web site on Leishmaniasis. www.who.int/tdr/diseases/leish
3. WHO. The World Health Report. 2002. (World Health Organization, Geneva, 2002).
4. The World Health Report. 2004: Changing History (World Health Organization, Geneva, 2004).

5. Bonhivers M, Nowacki S, Landrein N, Robinson D. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol.* 2008; 6(5): e105. Doi:10.1371/journal.pbio.0060105.
6. Sherwin T, Gull K. The cell division cycle of *Trypanosoma brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1989; 323: 573-588.
7. Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2006; 78(2): 271-291
8. Field MC, Natesan SK, Gabernet-Castello C, Koumandou VL. Intracellular trafficking in the trypanosomatids. *Traffic* 2007; 8: 629-639.
9. Borst P, Bitter W, Blundell PA, Chaves I, Cross M, Gerrits H, van Leeuwen F, McCulloch R, Taylor M, Rudenko G. Control of VSG gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91: 67-76.
10. Souto-Pradón T, Campetella OE, Cazzulo JJ, De Souza W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*; Immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell invasion. *J Cell Sci* 1990; 96: 485-490.
11. Foth B, Piani A, Curtis JM, Ilg T, McConville M, Handman E. *Leishmania major* proteophosphoglycans exist as membrane-bound and soluble forms and localize to the cell membrane, the flagellar pocket and the lysosome. *Int J Parasitol* 2002; 32: 1701-1708.
12. Stierhof Y-D, Ilg T, Russel DG, Hohenberg H, Overath P. Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. *J Cell Biol* 1994; 125: 321-331.
13. Triggs VP, Bangs JD. Glycosylphosphatidylinositol-dependent protein trafficking in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. *Euk Cell* 2003; 2: 76-83.
14. Schwartz K, Peck R, Tazeh N, Bangs J. GPI valence and the fate of secretory membrane proteins in African trypanosomes. *J Cell Sci* 2005; 118: 5499-5511.
15. Franke de Cazzulo B, Martínez J, North M, Coombs G, Cazzulo J. Effects of proteinase inhibitors on growth and differentiation on *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters* 1994; 124: 81-86.
16. Cazzulo J, Stoka V, Turk V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmacological Design* 2001; 7: 1143-1156.
17. Duschak V, Barboza M, García G, Lammel E, Couto A, Isola E. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitology* 2006; 32: 345-355.
18. Da Silva-López R, Morgado-Díaz JA, Tavares P, De Simone S. Purification and subcellular localization of a secreted 75 kDa *Trypanosoma cruzi* serine oligopeptidase. *Acta Tropica* 2008; 107: 159-167.
19. Santana JM, Grellier P, Schrevel J, Teixeira A. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J* 1997; 324: 129-137.
20. Joiner KA, Dias da Silva W, Rimoldi W, Hammer CH, Sher A, Kipnis T. Biochemical characterization of a factor produced by tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J Biol Chem* 1988; 263: 11327-11335.
21. Norris K, Schrimpf J. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1994; 62: 236-243.
22. Ilg T, Stierhof D, Wiese M, McConville MJ, Overath P. Characterization of phosphoglycan-containing secretory products of *Leishmania*. *Parasitology* 1994; 108: S63-S71.
23. Silverman JM, Chan S, Robinson D, Dwyer D, Nandan D, Foster L, Reiner N. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 2008; 9: R35.