Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Emérito Dr. Rodolfo R. Brenner

Análisis estructural y funcional de proteínas solubles que unen lípidos de parásitos helmintos

Structural and functional analysis of soluble lipid binding proteins from parasitic helminths

Análise estrutural e funcional de proteínas solúveis que ligam lipídios de parasitas helmintos

Gisela Raquel Franchini[1], Betina Córsico[2], Jorge Luis Pórfido[3], Valeria Silva[4], Marina Ibañez Shimabukuro[4], Florencia Rey Burusco[3]

[1] Dra. en Ciencias Naturales.
[2] Dra. en Ciencias Bioquímicas.
[3] Lic. en Biotecnología.
[4] Lic. en Bioquímica.

Todos los autores contribuyeron igualmente en la confección de esta revisión.

Laboratorio de Biofísicoquímica de Proteínas que Unen Lípidos.
INIBIOLP (CONICET-UNLP).
Calle 60 y 120 s/n, 1° Piso.
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Todos los autores contribuyeron de igual manera a este trabajo.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
Incorporada al Chemical Abstract Service.
Código bibliográfico: ABCLDL.
ISSN 0325-2957
ISSN 1851-6114 en línea
ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

Los parásitos helmintos producen y secretan una gran variedad de proteínas que unen lípidos (LBPs, del inglés *lipid binding proteins*) que podrían participar en la obtención de nutrientes tales como ácidos grasos y colesterol desde el hospedador. Asimismo, se postula que las LBPs podrían intervenir en la regulación de la respuesta inmune del hospedador. Conocer más acerca de las estructuras de estas proteínas, así como de sus interacciones con ligandos y membranas, es claramente pertinente para comprender las interacciones parásito-hospedador que ellas pudieran mediar. Por otra parte, dichos estudios permitirán profundizar en el conocimiento de los mecanismos de infección helmíntica y en el papel que estas proteínas juegan en la biología de los helmintos en general. Asimismo, esta información podría contribuir al establecimiento de medidas terapéuticas y de prevención de las enfermedades causadas por estos parásitos.

Palabras clave: proteínas que unen lípidos * proteínas de unión a ácidos grasos * parásitos * helmintos * nematodes * cestodes * ácidos grasos * lípidos

Summary

Helminth parasites produce and secrete a great variety of lipid binding proteins (LBPs) that may participate in the acquisition of nutrients such as fatty acids and cholesterol from their host. It is also postulated that LBPs might interfere in the regulation of the host's immune response. Knowing more about the structure of these proteins as well as their interactions with ligands and membranes is important in order to understand the host-parasite interaction that they could mediate. On the other hand, these studies will

contribute to obtain further knowledge about the mechanisms of helminth infection and the role that these proteins play in helminth biology. Moreover, this information would be useful to set new therapeutic and prevention measures for the diseases caused by these parasites.

Key words: lipid binding proteins * fatty aid binding protein * parasites * helminths * nematodes * cestodes * fatty acid * lipids

Resumo

Os parasitas helmintos produzem e secretam uma grande variedade de proteínas que ligam lipídios, LBPs (Lipid Binding Proteins, por sua sigla em inglês), que poderiam estar envolvidas na obtenção de nutrientes tais como ácidos graxos e colesterol a partir do hospedeiro. Do mesmo modo, é postulado que as LBPs poderiam intervir na regulação da resposta imune do hospedeiro. Saber mais sobre as estruturas dessas proteínas, bem como sobre as suas interações com ligantes e membranas é claramente pertinente para compreender as interações parasita-hospedeiro que elas pudessem mediar. Além disso, estes estudos irão permitir um melhor entendimento dos mecanismos de infecção helmíntica e o papel que estas proteínas desempenham na biologia de helmintos em geral. Também, essa informação poderia ajudar a estabelecer medidas terapêuticas e de prevenção das doenças provocadas por esses parasitas.

Palavras-chave: proteínas que ligam lipídios * proteínas de ligação de ácidos graxos * parasitas * helmintos * nemátodes cestodes * ácidos graxos * lipídios

Introducción

Las infecciones con parásitos helmintos (nematodos, trematodos, cestodos) causan enfermedades severas, muchas de las cuales debilitan al hospedador y en algunos casos llegan a tener consecuencias letales. Un gran porcentaje de la población mundial, principalmente en aquellas sociedades pertenecientes a países en vías de desarrollo, sufren de infecciones ocasionadas por helmintos. Puntualmente en América Latina un 30% de la población se ve afectada. Cabe destacar que muchas de estas infecciones están consideradas dentro de las denominadas "Enfermedades infecciosas desatendidas" (EID). Las EID son, en su gran mayoría, enfermedades crónicas cuyos efectos en la salud son perdurables, afectando el crecimiento, el desarrollo físico e intelectual y la capacidad de aprendizaje. Las poblaciones más vulnerables frente a las EID son aquellas que viven en condiciones socioeconómicas desfavorables, en viviendas precarias, sin acceso a servicios básicos, como agua potable, y sin saneamiento básico; o bien en condiciones ambientales deterioradas y con barreras en el acceso a los servicios de salud. Dentro de las parasitosis causadas por helmintos cabe mencionar: geohelmintiasis, esquistosomiasis, hidatidosis, dracunculosis y filariasis (1). Por otra parte, las infecciones por helmintos también afectan a animales domésticos y de cría, pudiendo generar grandes pérdidas económicas. No obstante el impacto de estas infecciones, existen grandes deficiencias en materia de diagnóstico e intervenciones, incluyendo el control de vectores, desarrollo de nuevas drogas y vacunas.

Los parásitos helmintos, en general, poseen ciertas limitaciones en su metabolismo lipídico y en algunos casos carecen de las rutas de síntesis de ácidos grasos y esteroles. Estos organismos dependen, por tanto, del suministro de estos nutrientes desde sus hospedadores. Recientemente se han descubierto, por su rol inmunodominante en los distintos tipos de infecciones, una gran variedad de proteínas que unen lípidos (LBPs) producidas por parásitos helmintos (2)(3). Si bien no se conocen con exactitud las funciones de las mismas, se postula que estas proteínas podrían estar involucradas en la captación de los lípidos desde el hospedador, así como en funciones internas relacionadas al metabolismo lipídico comunes a cualquier organismo multicelular o bien específicas de los tipos celulares y organizaciones estructurales de los helmintos. Por otro lado, estas proteínas podrían desempeñar un papel en el mantenimiento y protección de estructuras presentes en estadíos larvales, mediante la unión a derivados tóxicos del metabolismo lipídico. En estadíos adultos podrían estar involucradas en la modulación del entorno tisular local del hospedador y la evasión de su sistema inmune, a través del secuestro de moléculas mediadoras.

Una de las primeras aproximaciones al conocimiento de las funciones de una proteína puede provenir del estudio de su estructura. En la actualidad, las metodologías que aportan información más precisa acerca de las estructuras tridimensionales de proteínas son: cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN). Si bien ambas metodologías permiten

conocer con un detalle atómico las estructuras de las proteínas y, en líneas generales, las coordenadas resultantes son superponibles, existen ciertas diferencias que generan cierto debate sobre qué técnica es mejor y/o más representativa de la realidad. La cristalografía de rayos X se determina con la proteína en un estado cristalino con lo cual se pueden obtener resoluciones de hasta menos de 1 Angstrom. No obstante, la generación de un cristal puede ser un proceso extremadamente laborioso y muchas veces ocurre que las proteínas no cristalizan, entre muchas razones, por poseer regiones de alta movilidad. Por otra parte, la técnica de RMN es un poco menos laboriosa en términos de la obtención de la muestra y se realiza con la proteína en solución, razón por la cual esta técnica es considerada como la más adecuada para determinar la estructura de las proteínas solubles, considerando que se revelarían regiones o dominios proteicos con mayor movilidad o dinámica. La principal limitante de esta técnica es el tamaño de la proteína en estudio, siendo 40 kDa un tamaño restrictivo. Todas las proteínas que se presentan en este trabajo cumplen con los requisitos para poder resolver sus estructuras por RMN, a excepción de AgB que forma oligómeros. De todas maneras se están determinando sus estructuras por cristalografía de rayos X, lo cual permite complementar información con la obtenida por RMN y eliminar posibles artefactos. Por las razones antes mencionadas, el estudio de la interacción de estas proteínas con sus posibles ligandos mediante RMN es muy ventajoso. Dado que la proteína se halla en solución, se pueden realizar titulaciones con el ligando e ir detectando no sólo los residuos afectados sino también la cantidad de sitios de unión. Asimismo, también se pueden detectar cambios en la dinámica de los residuos e incluso colectar experimentos para la determinación de la estructura en presencia de ligandos. Es importante destacar que, por tratarse de una técnica no destructiva, todas las determinaciones antes mencionadas pueden realizarse utilizando una única muestra de proteína.

En este trabajo se presenta el estudio estructural y funcional de una variedad de LBPs y de sus interacciones con sus ligandos, con la finalidad de contribuir al conocimiento de sus funciones en el parásito y de su potencial participación en la interacción parásito-hospedador. Con esta finalidad se ha seleccionado un grupo de parásitos de importancia local, debido a los problemas médicos y veterinarios que causan en América del Sur, a saber: *Ascaris summ, A. lumbricoides, Necator americanus* y *Echinococcus granulosus*. La finalidad última de este trabajo es aportar conocimiento útil para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades causadas por estos agentes.

A continuación se detalla el estado del conocimiento acerca de las LBPs seleccionadas para su estudio estructural y funcional:

Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs)

Las proteínas As-p18, EgFABP1 y EgFABP2 pertenecen a la familia de las FABPs (del inglés *fatty acid binding proteins*); una familia multigénica de proteínas de bajo peso molecular (14-15 kDa) con una distribución filogenética muy amplia (4)(5), originalmente descriptas en mamíferos como FABPs intracelulares. Las FABPs son proteínas citosólicas que unen en forma no covalente ácidos grasos de cadena larga y otros ligandos hidrofóbicos. A pesar de la abundante información estructural disponible, las funciones de las FABPs aún no han podido ser completamente establecidas. Entre las funciones propuestas se encuentran la de captar y transportar ácidos grasos dentro de la célula, regular el metabolismo lipídico y proteger de la acción deletérea que podrían causar las concentraciones altas de ácidos grasos libres. También se ha postulado, para algunos miembros de esta familia, su participación en procesos de proliferación celular y de modulación del crecimiento (6)(7).

El parásito cestodo *Echinococcus granulosus* es el agente causal de la hidatidosis. Aunque tiene una distribución global afectando a más de 3 millones de personas, en la Argentina constituye un problema particular, ya que el 10% de la población vive en un área endémica. En *E. granulosus* se han descripto dos proteínas de la familia de las FABP: EgFABP1 y EgFABP2 (8)(9) producidas en protoescólices, forma larval presente dentro del quiste hidático. Estas proteínas tienen una similitud del 96% entre sí, y presentan una importante identidad de secuencia con la subfamilia de las FABPs cardíacas (HFABP) de mamíferos (9)(10). La cristalografía de rayos X de la proteína recombinante rEgFABP1 reveló la estructura característica de la familia: un barril β formado por 10 cadenas organizadas en dos hojas ortogonales, coronado por un motivo de hélice-vuelta-hélice a modo de tapa (11). Su capacidad de unión a diferentes ligandos ha sido analizada mediante ensayos de desplazamiento de un ligando fluorescente, revelando la capacidad de EgFABP1 de unir ácidos grasos de diversa longitud de cadena y grado de insaturación, aunque uniría con cierta preferencia ácidos grasos insaturados de cadena larga (12). Consistentemente, los estudios cristalográficos de rEgFABP1 indican como posible ligando un ácido graso de 16 C y espacio suficiente para ligandos mayores (11). Por otro lado, se ha estudiado la capacidad de EgFABP1 de transferir ácidos grasos fluorescentes a membranas artificiales. Estos ensayos de transferencia permitieron concluir que la interacción de la proteína con la membrana es necesaria para la transferencia efectiva del ligando, siendo ésta gobernada por fuerzas de tipo iónico e hidrofóbico. Estos resultados sugieren, a su vez, una posible participación

de EgFABP1 en el transporte e intercambio de lípidos entre distintas células del parásito (13).

Otra de las FABPs estudiadas es producida por *Ascaris suum y A. lumbricoides* –considerados por algunos autores como la misma especie (14)–, éste último causante de la infección por helmintos más común en humanos en el mundo entero (15). As-p18 es una proteína presente en el fluido perivitelino que rodea a la larva infectiva L3 en los huevos del nematode *Ascaris suum* (16). La larva L3 detiene su desarrollo hasta que sucede la ingestión por el huésped y puede sobrevivir manteniendo la infectividad de los huevos por más de 7 años. Sin embargo, se desconocen las bases bioquímicas responsables de la supervivencia a largo plazo de los mismos. As-p18 es una proteína de unión a ácidos grasos, cuya expresión se halla altamente regulada. Estudios por homología de secuencia habían predicho para esta proteína una estructura muy similar a otras FABPs de mamífero (16). No obstante, estudios filogenéticos la situaban en un *cluster* independiente dentro de la familia de FABPs, integrado exclusivamente por proteínas de nematodos (17)(18). Esta subfamilia de nemFABPs (del inglés *nematode fatty acid binding proteins*) presenta características únicas como la presencia de péptido líder, lo cual determina su exportación fuera de la célula que las sintetiza. Otras peculiaridades que distinguen a las nemFABPs son su secuencia extendida para la proteína madura (más de 140 aminoácidos *versus* alrededor de 130 para el resto de las FABPs (19) y el fino control en el patrón de su expresión (20).

La determinación de la estructura en solución por RMN de As-p18 unida a oleato ha revelado particularidades en la forma en que el ligando es unido. Adicionalmente, As-p18 presenta un *loop* notablemente extendido en una región inesperada, el cual se conjetura que podría estar involucrado en alguna función específica de nematodos (21) (Figura 1). Las evidencias estructurales mencionadas corroboran las singularidades de As-p18 como miembro de esta nueva subfamilia de nemFABPs, las cuales podrían reflejar la adaptación a una función específica dentro del huevo, relacionada con la supervivencia de la larva (22).

Respecto a la capacidad de unión de ligandos, se ha establecido que As-p18 es capaz de unir ácidos grasos de cadena larga y análogos fluorescentes en una relación 1:1, no mostrando afinidad de unión por el retinol (16). Asimismo, se ha analizado la composición de los ligandos endógenos a partir de la purificación de As-p18 recombinante en *E. coli*. El análisis por cromatografía de capa fina, seguido de cromatografia gaseosa, muestra a los ácidos grasos como ligandos exclusivos para esta proteína con una ligera preferencia hacia los saturados, como el ácido esteárico y palmítico, por sobre los insaturados, siendo el ácido oleico el más abundante dentro de esta categoría.

Antígeno B

El Antígeno B del cestodo *E. granulosus* (EgAgB) pertenece a una nueva clase de proteínas específicas de cestodos que unen ligandos hidrofóbicos, conocidas como HLBPs (del inglés *hydrofobic ligand binding proteins*). Moléculas de esta clase se han descripto en otros cestodos incluyendo *Moniezia expansa*, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia crassiceps*, *Taenia solium* y *Taenia hydatigena*. El EgAgB es una lipoproteína (23) secretada en grandes cantidades hacia el fluido presente en el interior del quiste hidático por las células de la capa germinal y por los protoescólices. En cuanto a su composición, se ha encontrado que la fracción proteica del EgAgB se arma en base a una subunidad de 8 kDa que presenta un alto contenido de α-hélices anfipáticas (24-26). Esta subunidad está codificada por una familia multigénica y polimórfica, constituida al menos por 10 genes conocidos, pertenecientes a 5 subfamilias distintas, denominadas *EgAgB8/1 al EgAgB8/5*, (25)(27-33). La forma en que se asocian estas subunidades para dar lugar a la molécula nativa es aún desconocida. Se ha observado que existe una transcripción diferencial de estos genes en protoescólices, adultos inmaduros, adultos maduros y oncosferas de *E. granulosus* (31-34). Algo similar ocurre en *E. multilocularis* con la expresión diferencial de estas subunidades en las distintas etapas del desarrollo del parásito (35). Respecto a la fracción lipídica del EgAgB, se han realizado estudios *in vitro* de unión a ácidos grasos naturales y análogos fluorescentes (36) que sugieren que los ligandos hidrofóbicos de esta molécula serían los ácidos grasos y triacilglicéridos. Por otra parte, recientemente ha sido publicado

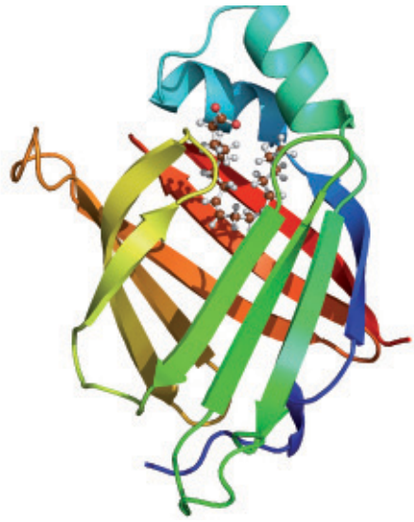

Figura 1. *Modelo de cintas de la estructura de As-p18 obtenida por cristalografía de Rayos X. Cabe destacar que el ligando (oleato) se encuentra en una orientación poco común, con el grupo carboxilato fuera del barril* β.

un estudio que indica que el EgAgB nativo no sólo une ácidos grasos y triacilglicéridos, sino una amplia variedad de clases lipídicas, como ésteres de esteroles, colesterol y fosfolípidos (37). Con el fin de avanzar en el estudio de las interacciones entre el EgAgB y los lípidos, se ha analizado la interacción entre distintas subunidades de EgAgB y ácidos grasos fluorescentes, así como su capacidad de transferirlos hacia membranas artificiales, concluyéndose que una interacción directa con la membrana, mediada por fuerzas electrostáticas, sería necesaria para que ocurra la transferencia de estos ligandos. En cuanto a la función del EgAgB, su capacidad de unir ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos, moléculas que no pueden ser sintetizadas *de novo* por *E. granulosus*, así como el hecho de encontrarse presente en la interfase con el hospedador, sugieren que esta proteína podría actuar como transportador de lípidos entre el hospedador y el parásito. En este sentido, es interesante mencionar que otra proteína de la familia de las HLBPs de cestodos, como la HLBP de *Taenia solium*, mostró ser capaz de adquirir lípidos del hospedador y transportarlos hacia el interior del parásito (38). Por otro lado, se ha postulado que podría ser una molécula del parásito relacionada con la modulación de la respuesta inmune del hospedador (39), favoreciendo su establecimiento y permanencia. No resulta claro si es la fracción proteica la responsable de esta modulación, o si los lípidos pueden mediar también algún tipo de señalización. Con el propósito de avanzar en este sentido, se está analizando la capacidad de las subunidades de EgAgB libres de lípidos de interaccionar con células del sistema inmune.

Proteínas que unen ácidos grasos y retinol de nematodos (FAR)

Las FAR (del inglés *fatty acid and retinol* binding proteins) son una clase novedosa de proteínas exclusivas de nematodos que unen ácidos grasos y retinol. Tienen un tamaño aproximado de 20 kDa, son producidas en distintos estadíos larvales y secretadas por parásitos adultos (40). Sus estructuras ricas en alfa-hélices presentan alta estabilidad y no poseen análogos estructurales en otros grupos animales. Se ha descripto que las FAR son componentes mayoritarios en las secreciones de parásitos en humanos, animales y plantas (40)(41), lo que ha posibilitado emplearlas como herramientas de diagnóstico (42). Se hipotetiza que podrían ejercer roles en la interacción con el hospedador y en la patogénesis mediante el transporte o secuestro de lípidos farmacológica e inmunológicamente activos, pero su función biológica no se conoce aún con certeza (43). Cabe destacar que se ha demostrado que una FAR, Ace-FAR-1 de *Ancylostoma ceylanycum* es capaz de inferir inmunidad (44).

Como objeto de estudio se ha seleccionado una proteína FAR del nematodo *Necator americanus*. *N. americanus* es un parásito intestinal hematófago que afecta poblaciones del norte argentino, hallándose una positividad superior al 30% (43), que puede llegar al 50% en comunidades aborígenes (44). Entre los genes expresados por el parásito adulto y el estadío larval L3 se identificó la proteina Na-FAR-1 (47). Estudios estructurales por RMN (48) y cristalografía de rayos X (49) parcialmente publicados, han mostrado que Na-FAR-1 presenta alta similitud con la estructura cristalográfica recientemente reportada para Ce-FAR-7, del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (50). Ce-FAR-7 presentaría dos cavidades discretas en las que podría ubicar distintos tipos de ligandos mientras que hélices extra presentes en la región C-terminal de Na-FAR-1 delimitarían una única cavidad hidrofóbica interna de mayor tamaño, que le permitiría unir hasta cuatro oleatos (Figura 2).

Las FAR unen ácidos grasos naturales, sus derivados fluorescentes y retinol con una afinidad en los órdenes micromolar y submicromolar (39)(51)(52) y son capaces de transferir ligandos hacia membranas artificiales (53). Ensayos de cromatografía en capa fina realizados recientemente sobre la proteína Na-FAR-1 recombinante purificada desde *E. coli,* han permitido confirmar la unión de ácidos grasos y han revelado la presencia de lípidos de naturaleza polar, que aún resta identificar, entre los que podría encontrarse fosfatidil etanolamina.

Poliproteínas de nematodes (NPAs)

Dentro del grupo de las LBPs de helmintos, las NPAs (del inglés *nematode polyprotein antigen/allergen)* constituyen una clase novedosa. El término poliproteínas se refiere a la expresión de las NPAs como precursores de alto

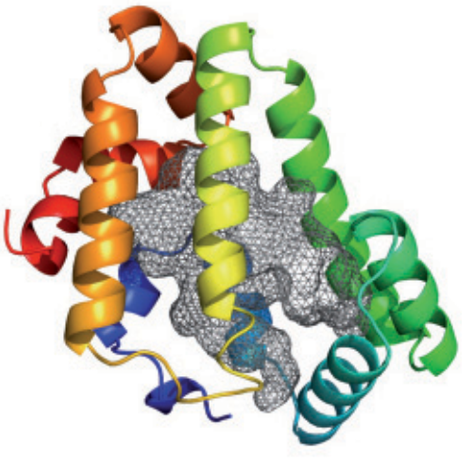

Figura 2. *Representación de la estructura cristalográfica de Na-FAR-1 en su forma holo. Las hélices alfa se distribuyen delimitando una única cavidad hidrofóbica interna en la cual se ubicarían los ligandos.*

peso molecular conteniendo unidades repetitivas en *tándem*. Estas unidades son clivadas postraduccionalmente en múltiples entidades proteicas de aproximadamente 15 kDa que pueden presentar funciones similares o diferentes entre sí. Desde el punto de vista estructural las NPAs son pequeñas, solubles y con alto contenido de αhélices (54). Las NPAs no solo son interesantes por ser exclusivas del *Phyllum* Nematoda, y por lo tanto poseer una estructura y capacidades de unión que pueden ser novedosas, sino también por su potencial relevancia en el éxito del parasitismo (55). Además, las NPAs son las únicas LBPs conocidas que se producen como poliproteínas. El interés por estas proteínas surge como consecuencia de que son encontradas como el antígeno inmunodominante en las infecciones causadas por nematodos, y en algunos casos constituyen potentes alergenos.

Las NPAs unen lípidos pequeños como ácidos grasos y retinol. Cada unidad de 15 kDa presenta un solo sitio de unión para sondas fluorescentes (56). De esta manera, las NPAs pueden ser clasificadas como LBPs no específicas y su probable función sería como proteínas transportadoras extracelulares presentes en el líquido pseudocelómico y tejido conectivo de nematodos, así como también en el fluido secretado en estrecho contacto con los tejidos del hospedador.

Recientemente se ha resuelto la estructura en presencia del ligando de la proteína ABA-1A de *Ascaris suum* (57) (Figura 3). Esta fue la primera subunidad de NPA caracterizada estructuralmente en su totalidad. Más aún, los resultados demuestran que pertenece a un nuevo tipo de clase estructural de proteínas, no presentando homología con ninguna de las proteínas de vertebrados descriptas hasta el momento. Actualmente, se está determinando la estructura en su forma libre de ligandos empleando RMN. La información así obtenida permitirá describir con mayor precisión las regiones de la proteína involucradas en la unión al ligando, y por lo tanto contribuirá al diseño racional de drogas.

Resumiendo, conocer las estructuras y funciones de estas proteínas podría contribuir no sólo al conocimiento de la biología de los parásitos helmintos, sino también a la generación de nuevas estrategias de prevención y/o tratamiento de las enfermedades provocadas por ellos, así como al mejoramiento de los métodos diagnósticos. Actualmente, las terapias disponibles para el tratamiento de estas enfermedades son en muchos casos limitadas o poco eficientes. La falta de actualización de dichos tratamientos ha conducido a la aparición de resistencia de los parásitos a los agentes quimioterapéuticos empleados para combatirlos (58) (59), lo cual pone de manifiesto la necesidad de contar con nuevos blancos de drogas para combatir este tipo de infecciones. Las LBPs de parásitos presentan ciertas características que permitirían postularlas como posibles blancos para quimioterapia contra las diversas helmintiasis, ya sea como diana en sí mismas o para incrementar la asimilación y/o distribución de las drogas hacia sus lugares de acción.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha recibido el apoyo de la Universidad Nacional de La Plata, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) de Argentina, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Wellcome Trust (Reino Unido, WT 083625) otorgados a Betina Córsico.

CORRESPONDENCIA

DRA. GISELA RAQUEL FRANCHINI
INIBIOLP (CONICET-UNLP)
Calle 60 y 120 s/n, 1º Piso
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
CP 1900, LA PLATA, Buenos Aires, Argentina.
E-mail: gfranchini@conicet.gov.ar

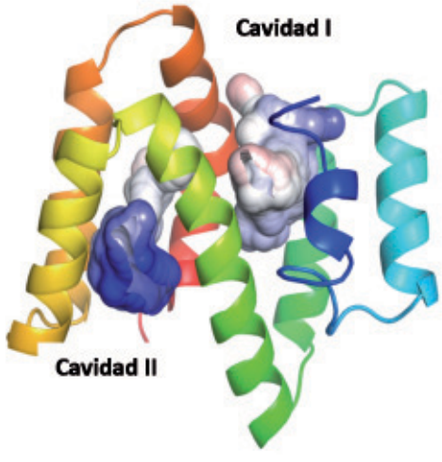

Figura 3. *Representación de tipo cinta de la estructura resuelta por RMN de ABA-1A de* Ascaris suum. *Código PDB: 2XV9.*

Referencias bibliográficas

1. Notas descriptivas sobre enfermedades desatendidas. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5753&Itemid=4141. (Fecha de acceso 22 de agosto de 2012).
2.. Tree TI, Gillespie AJ, Shepley KJ, Blaxter ML, Tuan RS, Bradley JE. Characterisation of an immunodominant glycoprotein antigen of *Onchocerca volvulus* with homologues in other filarial nematodes and *Caenorhabditis elegans*. Mol Biochem Parasitol 1995; 69(2): 185-95.
3. Rodriguez-Perez J, Rodriguez-Medina JR, Garcia-Blanco MA, Hillyer GV. Fasciola hepática: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. Exp Parasitol 1992; 74(4): 400-7.
4. Ockner R, Manning J, Poppenhausen R, Ho W. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal muco-

sa, liver, myocardium, and other tissues. Science 1972; 177: 56-8.
5. Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2006; 142(3-4): 262-74.
6. Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid binding proteins. Annu Rev Nutr 2008; 28: 73-95.
7. Furuhashi M, Hotamisligil G. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. Nat Rev Drug Discov 2008; 7: 489-503.
8. Esteves A, Dallagiovanna B, Ehrlich R. A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins. Mol Biochem Parasitol 1993; 58: 215-22.
9. Esteves A, Portillo V, Ehrlich R. Genomic structure and expression of a gene coding for a new fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*. Biochim Biophys Acta 2003; 1631: 26-34.
10. Esteves A, Joseph L, Paulino M, Ehrlich R. Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths. Int J Parasitol 1997; 27: 1013-23.
11.. Jakobsson E, Alvite G, Bergfors T, Esteves A, Kleywegt GJ. The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. Biochim Biophys Acta 2003; 1649: 40-50.
12.. Alvite G, Di Pietro SM, Santomé JA, Ehrlich R, Esteves A. Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. Biochim Biophys Acta 2001; 1533: 293-302.
13. Pórfido JL, Alvite G, Silva V, Kennedy MW, Esteves A, Córsico B. Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes. PLoS Negl Trop Dis 2012; en prensa.
14. Leles D, Gardner SL, Reinhard K, Iñiguez A, Araujo A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? Parasit Vectors 2012; 5:42.
15. Dold C, Holland CV. Ascaris and ascariasis. Microbes Infect 2011,13(7):632-7. Epub 2010 Oct 8.
16. Mei B, Kennedy MW, Beauchamp J, Komuniecki RP, Komuniecki R. Secretion of a novel developmentally regulated fatty acid binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascris suum*. J Biol Chem 1997; 272: 9933-41.
17. Plenefisch J, Xiao H, Mei B, Geng J, Komuniecki P, Komuniecki R. Secretion of a novel class of iFABPs in nematodes: coordinate use of the *Ascaris /C. elegans* model systems. Mol Biochem Parasitol 2000; 105: 223-36.
18. Marcelino AM, Smock RG, Gierasch LM. Evolutionary coupling of structural and functional sequence information in the intracellular lipid-binding protein family. Proteins 2006; 63(2): 373-84.
19. Santomé JA, Di Pietro SM, Cavagnari BM, Córdoba OL, Dell'Angelica EC. Fatty acid-binding proteins. Chronological description and discussion of hypotheses involving their molecular evolution. Trends Comparative Biochem Physiol 1998; 4: 23–38.
20. Kennedy M, Harnett W, eds. Parasitic nematodes: Molecular biology, biochemistry and immunology. Oxon and New York: CABI publishing; 2001.
21. Ibáñez-Shimabukuro M, Rey-Burusco F, Cooper A, Kennedy MW, Córsico B, Smith BO. Resonance assignment of As-p18, a fatty acid binding protein secreted by developing larvae of the parasitic nematode *Ascaris suum*. Biomolecular NMR assignments 2012; en prensa.
22. Michalski ML, Monsey JD, Cistola DP, Weil GJ. An embryo-associated fatty acid binding protein in the filarial nematode *Brugia malayi*. Mol Biochem Parasitol 2002; 124(1-2):1-10.
23. Oriol R, Williams J, Pérez Esandi M, Oriol C. Purification of liprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hidatic fluid. Am J Trop Med Hyg 1971; 20: 569-74.
24. Lightowlers MW, Liu D, Haralambous A, Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. Mol Biochem Parasitol 1989; 37: 172-82.
25. Fernández V, Ferreira HB, Fernández C, Zaha A, Nieto A. Molecular characterization of a novel 8 kDa subunit of *Echinococcus granulosus* Antigen B. Mol Biochem Parasitol 1994; 77: 247-50.
26. González-Sapienza G, Nieto A, Fernández C, Orn A, Wernstedt C, Hellman U. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* Antigen B. Parasitol Immunol 1996; 18:587-96.
27. Frosch P, Hartmann M, Mühlschlegel F, Frosch M. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. Mol Biochem Parasitol 1994; 64:171–5.
28. Chemale G, Haag K, Ferreira H, Zaha A. *Echinococcus granulosus* Antigen B is encoded by a gene family. Mol Biochem Parasitol 2001; 116:233-37.
29. Arend A, Zaha A, Ayala F, Haag K. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. Exp Parasitol 2004; 108: 76-80.
30. Haag KL, Ayala FJ, Kamenetzky L. Livestock trade history, geography, and parasite strains: the mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. J Parasitol 2004; 90: 234-9.
31. Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM, Angel SO, Zaha A, Guarnera EA, Rosenzvit MC. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. Parasitology 2005; 131: 805-16.
32. Muzulin PM, Kamenetzky L, Gutiérrez AM, Guarnera EA, Rosenzvit MC. *Echinococcus granulosus* Antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. Exp Parasitol 2008; 118:156-64.
33. Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, Blair D, McManus DP. The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(8):e784.

34. Kamenetzky L. Análisis de variabilidad estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. [Tesis Doctoral]. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; Universidad de Buenos Aires; 2007.
35. Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, Yamasaki H, Lightowlers MW, Craig PS, Ito A. *Echinococcus multiloculari*s: developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. Exp Parasitol 2006; 113(2): 75-82.
36. Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM, Zaha A. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding proteins. Biochim Biophys Acta 2005; 1747: 189-94.
37. Obal G, Ramos AL, Silva V, Lima A, Batthyany C, Bessio MI *et al*. Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(5): e1642.
38. Lee EG, Kim SH, Bae YA, Chung JY, Suh M, Na BK *et al*. A hydrophobic ligand-binding protein of the *Taenia solium* metacestode mediates uptake of the host lipid: implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis. Proteomics 2007; 7: 4016-30.
39. Siracusano A, Rigano R, Ortona E, Profumo E, Margutti P, Buttari B, *et al.* Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. Exp Parasitol 2008; 19: 483-89.
40. Kennedy MW, Garside LH, Goodrick LE, McDermott L, Brass A, Price NC, *et al*. The Ov20 protein of the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. A structurally novel class of small helix-rich retinol-binding proteins. J Biol Chem 1997; 272: 29442-8.
41. Basavaraju S, Zhan B, Kennedy MW, Liu Y, Hawdon J, Hotez PJ. Ac-FAR-1, a 20 kDa fatty acid- and retinol-binding protein secreted by adult *Ancylostoma caninum* hookworms: gene transcription pattern, ligand binding properties and structural characterization. Mol Biochem Parasitol 2003; 126(1): 63-71.
42. Burbelo PD, Leahy HP, Iadarola MJ, Nutman TB. A four-antigen mixture for rapid assessment of *Onchocerca volvulus* infection. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3 (5): e438.
43. Bradley JE, Nirmalan N, Klager SL, Faulkner H, Kennedy MW. River blindness: a role for parasite retinoid-binding proteins in the generation of pathology? Trends Parasitol 2001; 17(10): 471-75.
44. Fairfax KC, Vermeire JJ, Harrison LM, Bungiro RD, Grant W, Husain SZ, *et al*. Characterisation of a fatty acid and retinol binding protein orthologue from the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. Int J Parasitol 2009; 39(14): 1561-71.
45. Rea MFJ, Borda CE, Rosa JR, Mosqueda LA, Benitez OD. 1998. Parasitismo Intestinal en una Zona Rural, San Luis del Palmar - Corrientes –Argentina. Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina – UNNE Santa Fe 1432 - (3400) Corrientes - Argentina.
46. Menghi CI, Iuvaro FR, Dellacasa MA, Gatta CL. Survey of intestinal parasites among an aboriginal community in Salta. Medicina (B. Aires), 2007; 67(6 Pt 2): 705-8.
47. Daub J, Loukas A, Pritchard DI, Blaxter M. A survey of genes expressed in adults of the human hookworm, *Necator americanus*. Parasitology 2000; 120 (Pt 2): 171-84.
48. Rey-Burusco MF, Ibañez-Shimabukuro M, Cooper A, Kennedy MW, Córsico B and Smith BO. 1H, 13C and 15N chemical shift assignments of Na-FAR-1, a helix-rich fatty acid and retinol binding protein of the parasitic nematode *Necator americanus*. Biomolecular NMR assignments 2012, en prensa.
49. Gabrielsen M, Rey-Burusco MF, Griffiths K, Roe AJ, Cooper A, Smith BO *et al*. Two crystal forms of a helix-rich fatty acid- and retinol-binding protein, Na-FAR-1, from the parasitic nematode *Necator americanus*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2012; 68(Pt 7): 835-8.
50. Jordanova R, Grovest MR, Kostova E, Woltersdorf C, Liebau E, Tucker P. Fatty acid- and retinoid-binding proteins have distinct binding pockets for the two types of cargo. J Biol Chem 2009; 284: 35818-26.
51. Prior A, Jones JT, Blok VC, Beauchamp J, McDermott L, Cooper A *et al*. A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. Biochem J 2001; 356 (Pt 2):387-94
52. Garofalo A, Rowlinson MC, Amambua NA, Hughes JM, Kelly SM, Price NC *et al.* The FAR protein family of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Differential lipid binding properties, structural characteristics, and developmental regulation. J Biol Chem 2003; 278(10): 8065-74.
53. McDermott L, Kennedy MW, McManus DP, Bradley JE, Cooper A, Storch J. How helminth lipid-binding proteins offload their ligands to membranes: differential mechanisms of fatty acid transfer by the ABA-1 polyprotein allergen and Ov-FAR-1 proteins of nematodes and Sj-FABPc of schistosomes. Biochemistry 2002; 41(21): 6706-13.
54. Kennedy MW, Brass A, McCruden AB, Price NC, Kelly SM, Cooper A. The ABA-1 allergen of the parasitic nematode *Ascaris suum*: fatty acid and retinoid binding function and structural characterization. Biochemistry 1995; 34: 6700-10.
55. Kennedy MW. The polyprotein lipid binding proteins of nematodes. Biochim Biophys Acta 2000; 1476: 149-64.
56. Moore J, McDermott L, Price NC, Kelly SM, Cooper A, Kennedy MW. Sequence-divergent units of the ABA-1 polyprotein array of the nematode *Ascaris suum* have similar fatty-acid- and retinol-binding properties but different binding-site environments. Biochem J 1999; 340: 337-43.
57. Meenan NA, Ball G, Bromek K, Uhrín D, Cooper A, Kennedy MW *et al.* Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of Ascaris reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(4): e1040.
58. Hotez P. Enlarging the "Audacious Goal": elimination of the world's high prevalence neglected tropical diseases. Vaccine 2011; 29 Suppl 4:D104-10.
59. Regnier M. Neglected tropical diseases: Developing drugs for NTDs. Wellcome Trust Blog, 2012. Available from: http://wellcometrust.wordpress.com/2012/01/24/neglected-tropical-diseases-developing-drugs/ (Fecha de acceso 24 de enero de 2012).

Aceptado para su publicación el 26 de noviembre de 2012