

Grupo de malaria

José M. Bautista (IP), Antonio Puyet (IP), Amalia Díez, Patricia Marín e Isabel G. Azcárate



Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre

En nuestro laboratorio tenemos un interés principal de investigación sobre *Plasmodium* spp. Este interés viene dado en cuanto a su papel biológico como agente patógeno causante de la malaria humana y como objeto de investigación aplicada para tratar de hallar medios para combatir esta enfermedad. Estos intereses han venido también confluyendo desde perspectivas asociadas a enfermedades hereditarias humanas (déficit de G6PD o de PKLR) que se relacionan con tolerancia a la malaria, y por tanto pueden aportar claves en cuanto a las debilidades del parásito. Adicionalmente, en este contexto no hemos olvidado el desarrollo y adquisición de tecnología con fines aplicados que nos está permitiendo contestar en estos momentos a cuestiones científicas relevantes, al tiempo que nos aporta soporte tecnológico a nuestro grupo, a su proyección y al entorno. Esta trayectoria también ha sido posible gracias a la firme voluntad de formar un equipo de investigación estable en el que los miembros senior del grupo pudiesen compartir responsabilidades, sumar iniciativas e integrar esfuerzos.

Entre los objetivos recientes, hemos trabajado en desentrañar mecanismos moleculares de la tolerancia a la malaria por polimorfismos humanos, como el déficit de G6PD y otros (Mendez *et al.* 2011 y 2012; McDonagh *et al.* 2012 y 2013) tratando de conectarlos con el esclarecimiento de mecanismos esenciales de la biología de *P. falciparum* con el fin de identificar dianas terapéuticas. Así mismo hemos proporcionado varias moléculas nuevas con potencial farmacológico (Azcárate *et al.* 2013; Hoen *et al.* 2013; Moneriz *et al.* 2011a, b y c; Novoa *et al.* 2014; Zimmerman *et al.* 2013) y con algunas de estas moléculas hemos sido pioneros en demostrar, en modelos animales, que la inmunidad a la malaria se puede modular por tratamientos terapéuticos debido al mecanismo diferencial de inhibir el crecimiento del parásito de forma que se

facilite su exposición al sistema inmune del hospedador (Azcárate *et al.* 2013; González *et al.* 2010). Esto ha dado lugar a profundizar en esta línea y desarrollar sistemas de rastreo inmunológico mediante inmunómica y definir nuevos modelos animales de respuesta a la malaria (Azcárate *et al.* 2014, 2015; Kamali *et al.* 2012). Para ello, hemos incorporado también una batería de análisis relacionados con la inmunología con base en la citometría de flujo, citoquinas y cultivos específicos de células del sistema inmune. Por otra parte, cuando ha sido necesario hemos desarrollado metodologías básicas que permitiesen capacitarnos para avanzar ante dificultades tecnológicas, como fue en el año 2009 el pionero cultivo sincrónico a altas densidades de *P. falciparum* (Radfar *et al.* 2009) que está permitiendo realizar estudios de proteómica e, inmunómica complejos (Bautista *et al.* 2014; Mendez *et al.* 2011 y 2012; Moles *et al.* 2015; Radfar *et al.* 2008) e inmunizaciones experimentales (Kamali *et al.* 2015) que sin un material biológico abundante y adecuado no sería posible.

Así mismo, tal como anticipábamos anteriormente, hemos puesto un gran énfasis en el descubrimiento de potenciales moléculas antimaláricas, no solamente mediante amplio rastreo con herramientas nuevas (Moneriz *et al.* 2009) sino incluyendo la identificación de nuevas dianas (Moles *et al.* 2015; Moneriz *et al.* 2011c; Rodríguez de la Vega M, *et al.* 2007 y 2013), el descubrimiento de nuevos antígenos inmunodominantes (Kamali *et al.* 2012.) y las terapias avanzadas de modulación de la respuesta inmune (Kamali *et al.* 2015; Azcárate *et al.* 2017), ya que contamos con modelos animales de malaria experimental que nos permiten abordar de forma directa estudios preclínicos utilizando un análisis en profundidad de la información genómica y

epigenómica de la respuesta inmune frente a malaria.

Finalmente, aparte de los avances realizados mencionados, merece la pena destacar que en nuestro grupo ha contribuido también con las siguientes aportaciones:

- Desarrollo de sistemas de cuantificación de expresión génica optimizados para *Plasmodium falciparum* (Bustamante *et al.* 2004).
- Estudios de genética reversa del enzima bifuncional glucosa-6-fosfato deshidrogenasa/6-fosfogluco lactonasa de *Plasmodium falciparum* (Crooke *et al.* 2006).
- Descripción y caracterización de una nueva subfamilia de carboxipeptidasas (Rodríguez de la Vega M, *et al.* 2007 y 2013).
- Mecanismos del desarrollo de malaria cerebral en modelos experimentales de ratón (Linares *et al.* 2011a, 2013a y b).
- Desarrollo de modelos animales de respuesta inmunológica heterogénea frente a la infección por *Plasmodium* semejante a la que se produce en la población humana (Azcárate *et al.* 2014, 2015).
- Descripción de casos clínicos de especial relevancia por infección con *Plasmodium* y *Babesia* (Arsuaga *et al.* 2016; Linares *et al.* 2011b)

Es así que, partiendo de la formación científica adquirida por los miembros senior del grupo, se ha mantenido una continuidad de actividades científicas y tecnológicas en nuestro laboratorio durante más de 25 años, tratando de contribuir al conocimiento científico en esta área y dotarle de utilidad social. Adicionalmente, esta investigación ha tratado de satisfacer de forma realista y aplicada las necesidades de la enseñanza actual de nuestros estudiantes universitarios (grado, máster y doctorado) en un contexto académico y profesional competitivo.

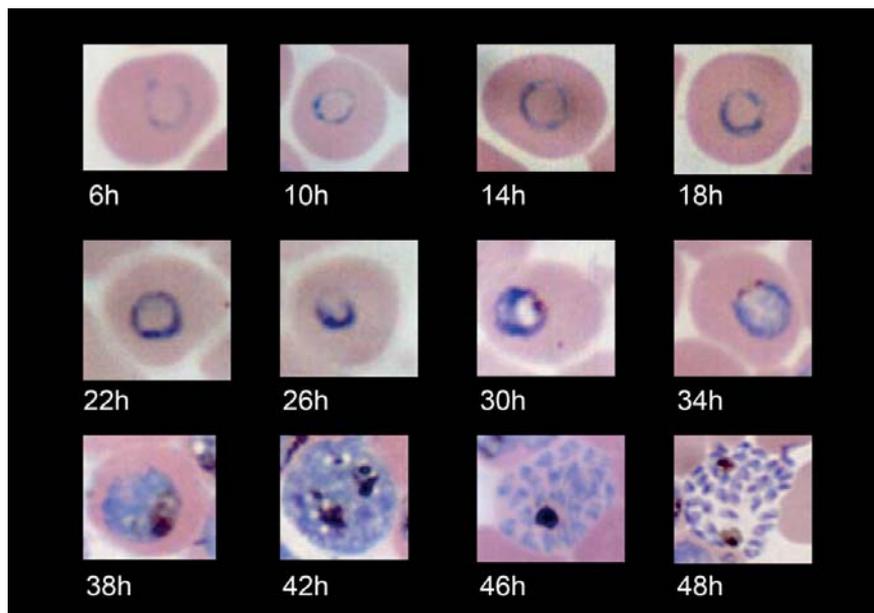


Figura 1. Etapas de desarrollo intraeritrocitario de *Plasmodium falciparum* en cultivo (Tomado de referencia 16). *P. falciparum* muestra varias etapas de desarrollo asexual en el huésped humano. En todas estas etapas, las mismas estructuras del parásito se tiñen del mismo color independientemente del colorante de Giemsa o Wright usado. Así:

- La cromatina es generalmente de forma redondeada y teñida de rojo oscuro.
- El citoplasma se presenta en diferentes formas, desde una forma de anillo hasta una forma irregular, pero siempre se tiñe de azul.

En el cuadro se muestran las etapas de desarrollo intraeritrocitario de *P. falciparum* cada 4 h después de la invasión usando nuestro protocolo de cultivo continuo se pueden ver a continuación (tinción de Wright). La etapa del anillo se observa entre las 6 y las 22 h, la etapa del trofozoito se observa entre las 22 y las 38 h, la etapa de esquizonte se observa entre las 38 y 48 h; y los merozoitos se observan a las 48 h, justo antes de la siguiente invasión.

REFERENCIAS CITADAS

Arzuaga M, et al. (2016) First Report of Babesia microti-Caused Babesiosis in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16(10):677-679.

Azcarate IG, et al. (2013) Insights into the preclinical treatment of blood-stage malaria by the antibiotic borrelidin. *Br J Pharmacol* 169(3):645-658.

Azcarate IG, et al. (2014) Differential immune response associated to malaria outcome is detectable in peripheral blood following Plasmodium yoelii infection in mice. *PLoS One* 9(1):e85664.

Azcarate IG, et al. (2015) Early and late B cell immune responses in lethal and self-cured rodent malaria. *Immunobiology* 220(5):684-691.

Azcarate IG, et al. (2017) Iron supplementation in mouse expands cellular innate defences in spleen and defers lethal malaria infection. *Biochim Biophys Acta*.

Bautista JM, Marin-Garcia P, Diez A, Azcarate IG, & Puyet A (2014) Malaria proteomics: insights into the parasite-host interactions in the pathogenic space. *J Proteomics* 97:107-125.

Bustamante LY, Crooke A, Martinez J, Diez A, & Bautista JM (2004) Dual-function stem molecular beacons to assess mRNA expression in AT-rich transcripts of Plasmodium falciparum. *Biotechniques* 36(3):488-492, 494.

Crooke A, Diez A, Mason PJ, & Bautista JM (2006) Transient silencing of Plasmodium falciparum bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. *FEBS J* 273(7):1537-1546.

Gonzalez EG, et al. (2010) Population proteomics of the European Hake (Merluccius merluccius). *J Proteome Res* 9(12):6392-6404.

Hoer R, et al. (2013) Selective inhibition of an apicoplast aminoacyl-tRNA synthetase from Plasmodium falciparum. *ChemBiochem* 14(4):499-509.

Kamali AN, et al. (2012) Plasmodium yoelii blood-stage antigens newly identified by immunoaffinity using purified IgG antibodies from malaria-resistant mice. *Immunobiology* 217(8):823-830.

Kamali AN, et al. (2015) Experimental Immunization Based on Plasmodium Antigens Isolated by Antibody Affinity. *J Immunol Res* 2015:723946.

Linares M, et al. (2011a) Proteomic approaches to identifying carbonylated proteins in brain tissue. *J Proteome Res* 10(4):1719-1727.

Linares M, et al. (2011b) Malaria hidden in a patient with diffuse large-B-cell lymphoma and sickle-cell trait. *J Clin Microbiol* 49(12):4401-4404.

Linares M, et al. (2013a) Brain-derived neurotrophic factor and the course of experimental cerebral malaria. *Brain Res* 1490:210-224.

Linares M, et al. (2013b) Glutathione peroxidase contributes with heme oxygenase-1 to redox balance in mouse brain during the course of cerebral malaria. *Biochim Biophys Acta* 1832(12):2009-2018.

McDonagh EM, et al. (2012) PharmGKB summary: very important pharmacogene information for G6PD. *Pharmacogenet Genomics* 22(3):219-228.

McDonagh EM, Bautista JM, Youngster I, Altman RB, & Klein TE (2013) PharmGKB summary: methylene blue pathway. *Pharmacogenet Genomics* 23(9):498-508.

Mendez D, Linares M, Diez A, Puyet A, & Bautista JM (2011) Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon Plasmodium falciparum invasion are differentially carbonylated in G6PD A- deficiency. *Free Radic Biol Med* 50(10):1305-1313.

Mendez D, et al. (2012) Differential carbonylation of cytoskeletal proteins in blood group O erythrocytes: potential role in protection against severe malaria. *Infect Genet Evol* 12(8):1780-1787.

Moles E, et al. (2015) Possible roles of amyloids in malaria pathophysiology. *Future Sci OA* 1(2):FS043.

Moneriz C, Marin-Garcia P, Bautista JM, Diez A, & Puyet A (2009) Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia Plasmodium infected erythrocytes. *Malar J* 8:279.

Moneriz C, et al. (2011a) Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of Plasmodium falciparum intraerythrocytic stages. *Malar J* 10:82.

Moneriz C, Marin-Garcia P, Bautista JM, Diez A, & Puyet A (2011b) Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal Plasmodium yoelii-infected mice. *Malar J* 10:103.

Moneriz C, Mestres J, Bautista JM, Diez A, & Puyet A (2011c) Multi-targeted activity of maslinic acid as an antimalarial natural compound. *FEBS J* 278(16):2951-2961.

Novoa EM, et al. (2014) Analogs of natural aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors clear malaria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(51):E5508-5517.

Radfar A, Diez A, & Bautista JM (2008) Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant Plasmodium falciparum. *Free Radic Biol Med* 44(12):2034-2042.

Radfar A, et al. (2009) Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels. *Nat Protoc* 4(12):1899-1915.

Rodriguez de la Vega Otazo M, Lorenzo J, Tort O, Aviles FX, & Bautista JM (2013) Functional segregation and emerging role of cilia-related cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *FASEB J* 27(2):424-431.

Rodriguez de la Vega M, et al. (2007) Nna1-like proteins are active metallo-carboxypeptidases of a new and diverse M14 subfamily. *FASEB J* 21(3):851-865.

Zimmerman T, et al. (2013) Antiplasmodial activity and mechanism of action of RSM-932A, a promising synergistic inhibitor of Plasmodium falciparum choline kinase. *Antimicrob Agents Chemother* 57(12):5878-5888.