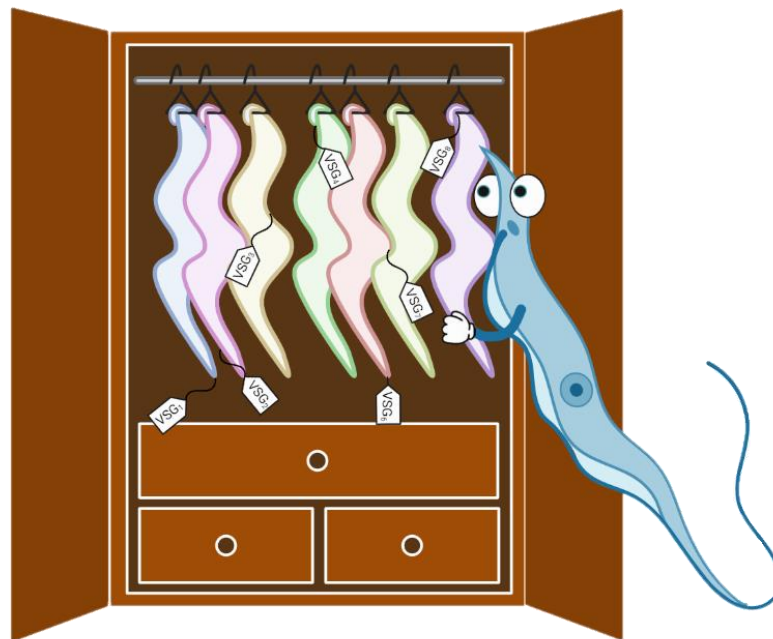

TRYPANOSOMA BRUCEI

Y OTROS TRIPANOSOMAS AFRICANOS



Autores: Paula Casasano Mateos, Violeta Gallego Rodríguez, Irene González Garnacho, Andrea González Gómez, Javier Pérez García, Clara Plaza Alonso y Ana Romo Gallo.



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
JMRR-UAM © 2022

UAM

Universidad Autónoma
de Madrid

ÍNDICE

1. Introducción	2
2. Patogenia y tratamiento	5
3. Ciclo de vida	9
3.1. La movilidad social y su relevancia en el ciclo de vida	10
4. Reordenamientos de DNA y expresión de VSG	13
4.1. Mecanismos de variación antigénica	15
4.2. Modelo de la conversión génica de los genes VSG	17
5. Activación e inactivación de los sitios de expresión	18
5.1. Promotor	18
5.2. Estructura de la cromatina	19
5.3. Implicación de un nuevo nucleótido	20
5.4. Transcripción	21
5.5. Un modelo para el control del ES	21
6. Genes asociados a los sitios de expresión de los genes VSG	23
6.1. Receptores inusuales	25
6.2. Vacunas	27
7. El factor lítico del suero humano	27
7.1. El receptor en el parásito para la entrada del factor lítico	32
7.2. Evolución de la resistencia a <i>T. brucei</i> en los primates	36
7.3. Utilización del factor lítico para combatir la parasitosis	37
8. Bibliografía	38

1. INTRODUCCIÓN

La primera descripción de *Trypanosoma brucei* en humanos fue realizada por el médico italiano Aldo Castellani en 1903, quien observó su presencia en la sangre y fluido cerebrospinal de un paciente.

Los tripanosomas africanos son parásitos protozoos responsables de grandes plagas como son la enfermedad del sueño en humanos (causada por *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*) y la enfermedad de Nagana en ganado vacuno, ovejas, caballos, camellos, cerdos, antílopes, etc (causada por *T. brucei brucei*). *T. congolense* y *T. vivax* son también patógenos de ganado vacuno, pero no infectan a humanos.

T. brucei gambiense se encuentra en África occidental y central, en tanto que *T. brucei rhodesiense* se extiende por África oriental; ambas zonas quedan separadas, aproximadamente, por el meridiano 30º E que pasa por los Grandes Lagos (Fig. 1). Para *T. brucei gambiense*, el hombre es el principal hospedador y reservorio de la infección; esta subespecie produce más del 90% de los casos de tripanosomiasis africana en humanos. En las infecciones por *T. brucei rhodesiense* los reservorios son diversos mamíferos silvestres (antílopes, hienas, leones y otros), siendo el hombre un hospedador accidental que sólo es afectado ocasionalmente; el ganado doméstico también es parasitado. Sin embargo, en los animales silvestres, estas especies rara vez producen enfermedad, aunque si actúan como reservorios.

La enfermedad es endémica en una vasta región de África (Fig. 1), definida por el ámbito de la mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.), el hospedador intermediario que transporta el tripanosoma de un hospedador mamífero a otro.

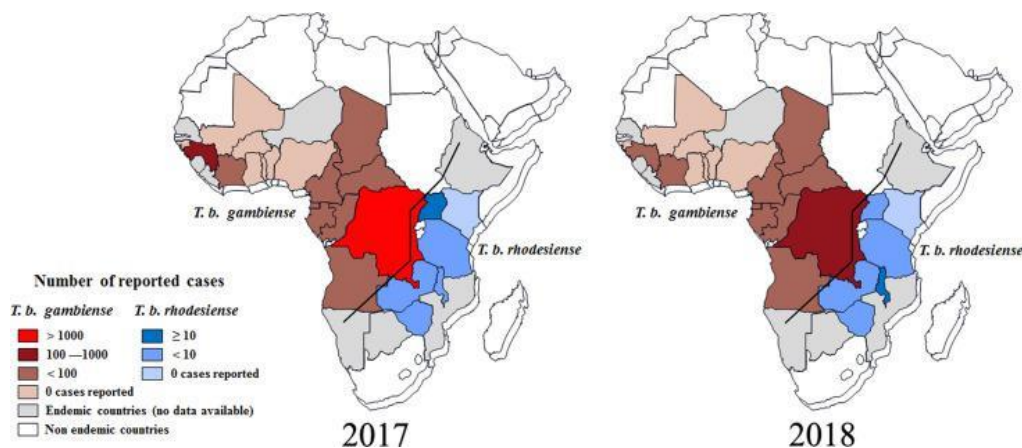


Figura 1. Distribución geográfica de las tripanosomiasis humanas en el periodo 2017-2018 en sus países endémicos. **Figura extraída de Gao et al., (2020).**

La enfermedad ocurre en 36 países del África subsahariana. Unos 60 millones de personas corren el riesgo de contraer la enfermedad. Su prevalencia ha sufrido grandes variaciones a lo largo del siglo XX. Así, a principios de siglo hubo una gran epidemia que produjo la muerte de unas 800.000 personas, y luego se dieron otras epidemias importantes en el periodo 1920-40. En los años 60, en los que se aplicaron importantes medidas de control del vector y de vigilancia sobre la población, la enfermedad fue casi erradicada. Sin embargo, tras la independencia de estos países y los conflictos civiles se produjo un repunte de la incidencia que alcanzó su máximo a finales de los años 1990s. En los últimos

años, tras la adopción de medidas de control del vector, el número de casos se ha reducido de forma considerable (**Fig. 2**). Así, en 2017, se reportaron solo 1446 casos (98% debidos a *T. b. gambiense*), y la OMS es optimista en cuanto a su eliminación total (prevista inicialmente para 2020). Sin embargo, todavía sigue siendo una enfermedad importante en África central, donde tiene una incidencia importante en las comunidades rurales. Actualmente, el 86% de los casos de tripanosomiasis africana afectan a personas de la República Popular del Congo. También se producen un número relativamente alto de casos en turistas que viajan a visitar los grandes parques y que desarrollan la enfermedad ya en su país de origen (a estos se les denomina casos exportados de la enfermedad del sueño).

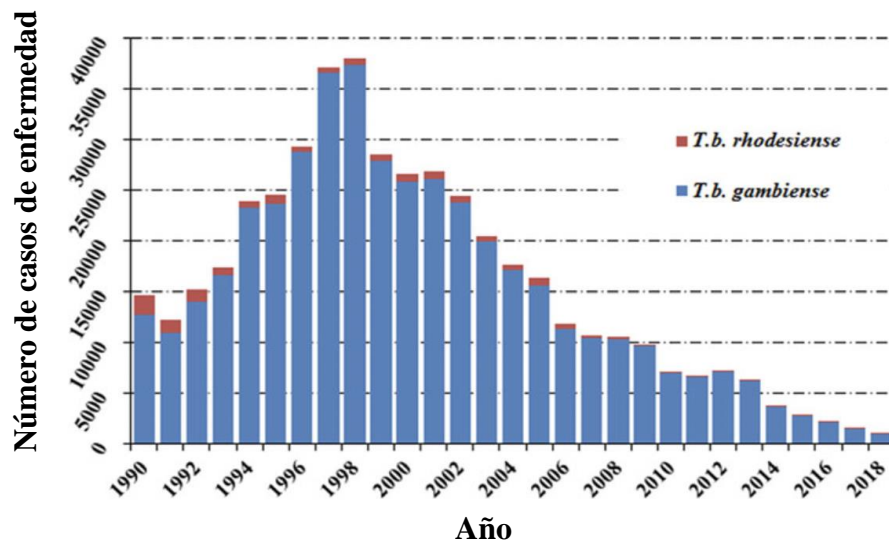


Figura 2. Número total de casos reportados de tripanosomiasis africanas en humanos en países endémicos desde 1990 hasta 2018. **Figura extraída de Gao et al., (2020).**

Además de afectar directamente a los seres humanos, también tiene efectos indirectos debido al hecho de que los animales domésticos sean susceptibles a la tripanosomiasis. Así, entre el tripanosoma y la mosca tsé-tsé hacen inhabitables para la cría de ganado vacuno unos diez millones de kilómetros cuadrados de África (**Fig. 1**). Al tener escaso o nulo acceso a la carne y a los productos lácteos, la mayor parte de la población está mal nutrida y es proclive a contraer otras enfermedades.

La infección por *T. brucei* es un ejemplo que ilustra perfectamente la lucha abierta que se establece entre los mecanismos de supervivencia de un patógeno y los mecanismos inmunitarios del hospedador, y de cómo estos han debido evolucionar. El sistema inmunitario de los mamíferos está diseñado para ganar esta lucha, pues tiene una capacidad de producir $\sim 10^{10}$ idiotipos distintos de anticuerpos. Sin embargo, este parásito es capaz de cambiar los antígenos de superficie de una forma más rápida que los nuevos anticuerpos sean creados y de producir un número, al menos comparable, de variantes antigénicas. La **figura 3** ilustra esta competición entre la respuesta inmunitaria humoral y la variabilidad antigénica del parásito.

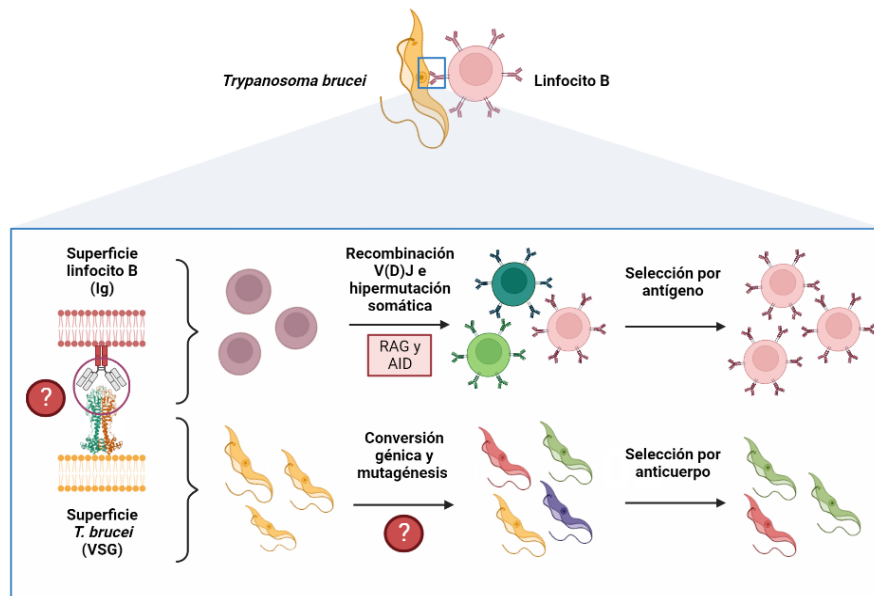


Figura 3. Mecanismo de variabilidad antigénica de la glicoproteína de superficie variante (VSG) mediante el que *T. brucei* escapa de la respuesta inmune humoral. RAG: gen activador de la recombinación; AID: citidina-desaminasa inducida por activación; símbolo “?”: mecanismos poco conocidos. **Figura propia basada en Aresta-Branco et al. (2019). Imagen de la proteína VSG obtenida de la base de datos PDB.**

Varias especies de tripanosomas africanos evaden el sistema inmunitario del hospedador mediante una variación antigénica de su proteína mayoritaria de superficie: la glicoproteína variable de superficie (VSG). Las formas metacíclicas y sanguíneas de *T. brucei* están completamente cubiertas por un abrigo denso y homogéneo de VSG, que impiden que los anticuerpos accedan a antígenos invariantes subyacentes. El abrigo de VSG sobre la superficie del tripanosoma forma una monocapa fuertemente empaquetada, hay unas 10^7 moléculas de VSG por célula (**Fig. 4**), suponiendo aproximadamente el 20% del total de proteínas del parásito.

Las secuencias de las VSG se componen normalmente de entre 400 y 500 aminoácidos y muestran un elevado grado de polimorfismo en la secuencia primaria. Sin embargo, la estructura tridimensional resulta muy conservada, lo que explica que moléculas antigénicamente diferentes puedan ensamblarse en ordenamientos o abrigos funcionalmente idénticos (**Fig. 4**). Las secuencias primarias muestran su mayor conservación en el extremo carboxilo por donde las VSGs se anclan a la membrana del parásito, a través de una estructura de glicosilfosfatidilinositol (GPI). De hecho, fue el estudio de *T. brucei* el que llevó a la identificación de este tipo de estructuras en el anclaje de proteínas a membrana. Posteriormente, esta estructura también se encontró en células de mamíferos y de otros organismos.

Individualmente, cada tripanosoma expresa una única VSG. En el curso de la infección, al expandirse el número de parásitos, aparecen subpoblaciones que han pasado a expresar VSGs diferentes y, por tanto, son capaces de evadir el impacto inmediato de la respuesta de anticuerpos frente a la VSG parental. Estas subpoblaciones son subsiguientemente reconocidas por el sistema inmunitario, pero la continuada generación de nuevas VSGs previene la erradicación de la infección. Como resultado de este proceso, las infecciones muestran ondas características de parasitemia, cada una consiste de tripanosomas antigénicamente distintos no encontrados previamente por el sistema inmunitario.

La frecuencia con la que los nuevos abrigos de VSG aparecen va desde 10^{-2} hasta 10^{-7} por división. Las líneas de tripanosomas no adaptadas (“pleomórficas”) cambian con una frecuencia de 10^{-2} por célula y por generación, en contra al rango mostrado por líneas monomórficas (adaptadas en el laboratorio) que es de 10^{-4} a 10^{-7} . La enorme diferencia en la tasa de cambio entre los diferentes tipos de líneas debe tener una causa funcional, la posibilidad más sencilla es que las líneas pleomórficas tienen un mecanismo dedicado a la variación antigénica que está reducido en las líneas monomórficas o incluso ausente. La ausencia se explica por el hecho de que la tasa de cambio en algunas líneas monomórficas es similar a la tasa de mutación normal.

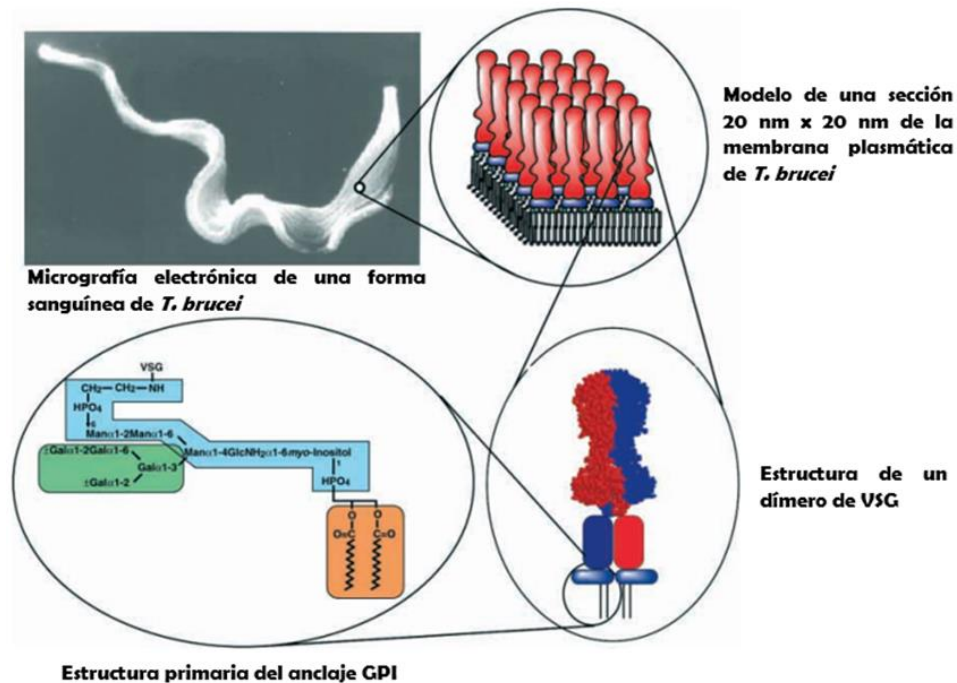


Figura 4. Representación del abrigo de VSG sobre la superficie del tripanosoma africano y de la estructura de esta proteína. **Figura modificada a partir de Ferguson (1999).**

2. PATOGENIA Y TRATAMIENTO

Los tripanosomas africanos se encuentran entre los patógenos de humanos más virulentos y mortales, con unas tasas de mortalidad próximas al 100% en las infecciones no tratadas.

En los hospedadores vertebrados los tripanosomas viven en la sangre, los nódulos linfáticos y bazo, y en el fluido cerebroespinal. No invaden o viven dentro de las células, pero pueden localizarse en los espacios de tejido conectivo dentro de varios órganos y en los espacios del tejido reticular del bazo y nódulos linfáticos.

En el desarrollo de la infección hacia la enfermedad se distinguen dos etapas (**Fig. 5**). En la etapa primera, que comienza con la inoculación del parásito, los tripanosomas proliferan en el sitio de infección, lo que se manifiesta en una inflamación local. En la mitad de los casos se produce una ulceración que se conoce como “chancro tripanosomal”, que se desarrolla 5-15 días después de la picadura de la mosca. Pasadas 3-4 semanas, el chancro se cura. En el entretanto, los parásitos se han

expandido a los nódulos linfáticos y desde allí al torrente sanguíneo. Esta fase se caracteriza por un malestar general, dolor de cabeza y fiebre.

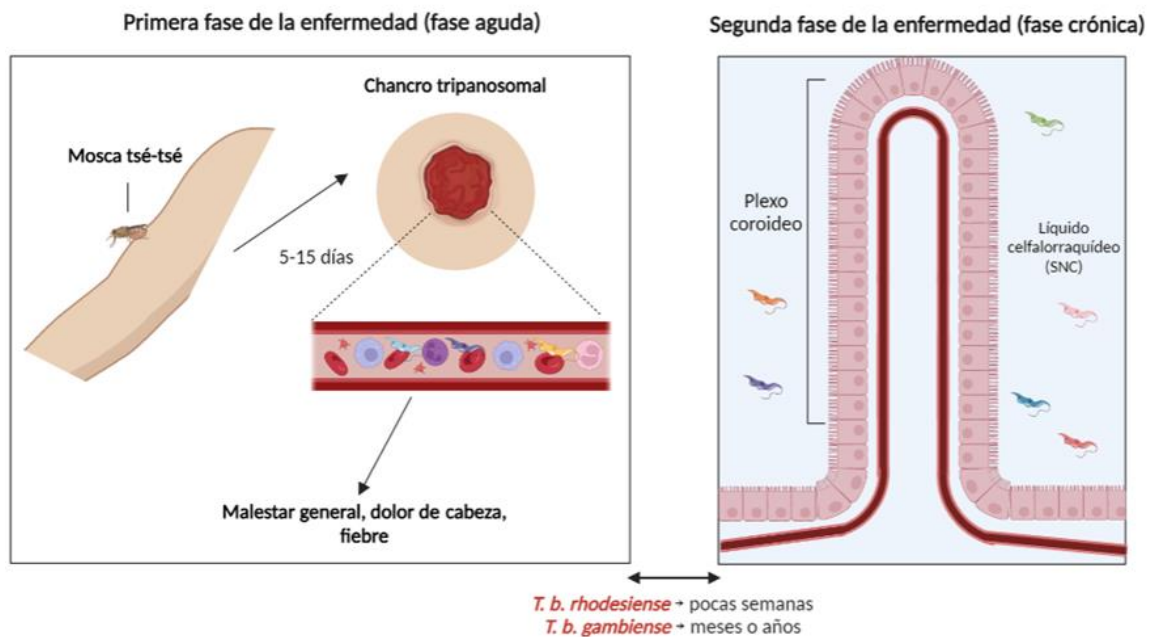


Figura 5. Representación gráfica de las dos fases de la infección producida por *T. brucei* (fase aguda y fase crónica o enfermedad del sueño). **Figura propia.**

La segunda etapa de la enfermedad comienza cuando los parásitos invaden órganos internos, incluido el sistema nervioso central (SNC). Esto sucede tras unas pocas semanas después de la infección con *T. b. rhodesiense*, pero tras un periodo más largo, de varios meses o años, en el caso de la infección con *T. b. gambiense*. Cómo y por qué los parásitos invaden el SNC no es conocido, aunque la puerta de entrada es probablemente el plexo coroides. El neurotropismo mostrado por estos parásitos puede verse como una forma de evasión inmunitaria; también explica la existencia de recidivas, dado que la mayoría de los fármacos empleados frente a estos parásitos son ineficaces para combatirlos en el cerebro, ya que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica.

Así, cuando los tripanosomas invaden el SNC, se inicia la fase crónica de la infección, conocida como enfermedad del sueño. El parásito puede acceder a muchas regiones del SNC, pudiendo producir múltiples alteraciones en el funcionamiento del sistema nervioso. Se produce una apatía progresiva, un entorpecimiento mental que va acompañado de problemas con la coordinación de los movimientos. A continuación, se observan temblores en las manos, que frecuentemente conducen a la aparición de convulsiones y al desarrollo de parálisis. La tendencia a dormirse aumenta, el paciente se duerme incluso mientras come o está de pie. El paciente finalmente entra en coma previo a morir. La muerte se produce por cualquiera de entre las múltiples posibles causas, mala nutrición, neumonía, fallo cardíaco u otras infecciones parasitarias. La enfermedad causada por ambas subespecies va a ser mortal si no es tratada.

El mecanismo de la patogénesis no es muy claro. Las evidencias actuales sugieren que la patogénesis puede ser causada, en parte, por la variabilidad antigénica de los tripanosomas y a las reacciones inmunitarias del hospedador. Dados los cambios repetidos de los antígenos de superficie de los

parásitos y el hecho de que estos antígenos de superficie están siendo liberados en la sangre casi constantemente, el sistema inmunitario del hospedador resulta muy estimulado y se producen grandes cantidades de inmunoglobulinas.

Además, las VSGs también estimulan la proliferación policlonal de linfocitos B, principalmente clones productores de IgM. En algunos casos, los niveles de IgM son hasta 14 veces mayores a los normales. Esta inmensa producción de inmunoglobulinas, sólo parcialmente dirigida frente a los antígenos de tripanosomas, junto a la liberación de fragmentos de VSG en la sangre, contribuye a la inmunopatología de la enfermedad. Por ejemplo, se observa la producción de anticuerpos frente a componentes del SNC (mielina y otras proteínas de los neurofilamentos).

Se ha visto que algunos de los antígenos de los tripanosomas pueden absorberse a la superficie de algunas células hospedadoras, y la unión de anticuerpos específicos al antígeno absorbido, junto con el complemento, conduce a la lisis de las células del hospedador.

El paso de los parásitos a través de la barrera hematoencefálica y la invasión del SNC constituye un punto importante a determinar, pues esto va a condicionar el tratamiento a administrar al paciente. Así, los fármacos suramina (**Fig. 6C**) y pentamidina (**Fig. 6A**) son administrados durante las fases iniciales de la enfermedad, pues sólo son efectivos durante la fase hematolinfática de la infección ya que estas drogas no atraviesan la barrera hematoencefálica. La pentamidina es una diamidina que se une al surco menor del DNA (a regiones ricas en AT), impidiendo su replicación y transcripción en el kinetoplasto y/o núcleo del tripanosoma, y es el fármaco de elección para el tratamiento de las fases iniciales de la infección con *T. b. gambiense*, pero existen dudas sobre su eficacia frente a *T. b. rhodesiense*. La suramina es el tripanocida más antiguo que todavía se emplea en clínica, y actúa inhibiendo a varias enzimas de *T. brucei*. Es usada como primera opción para el tratamiento de *T. b. rhodesiense*, pero generalmente se evita usar en África central y occidental contra la infección de *T. b. gambiense* donde la infección con *Onchocerca* es muy común, y dada la alta eficacia del fármaco también frente a este parásito existe un alto riesgo de producir fuertes reacciones alérgicas en los pacientes debido a la liberación de grandes cantidades de antígeno derivados de la muerte de este gusano.

La aprobación en 2018 de un nuevo fármaco, el fexinidazol (**Fig. 6E**), ha supuesto un gran avance para el tratamiento de las infecciones en pacientes con afectación crónica (presencia de parásitos en el SNC) ya que los tratamientos anteriores tenían asociada una gran toxicidad.

Así, la OMS propone el empleo de pentamidina durante la primera fase de la enfermedad (cuando el parásito no ha accedido al SNC). Cuando el número de linfocitos en el líquido cefalorraquídeo es mayor de 5 células por μl o se observan parásitos, se recomienda el uso de fexinidazol de forma oral, una vez al día, durante 10 días. Si bien, recomiendan que debe tomarse junto a una comida adecuada para favorecer su absorción y disminuir los efectos secundarios (náuseas y vómitos). Cuando el número de linfocitos por μl en líquido cefalorraquídeo supera los 100, entonces se recomienda un tratamiento combinado de nifurtimox (**Fig. 6F**) (administrado de forma oral, tres veces al día, durante 10 días) y eflornitina (**Fig. 6D**) (administrada de forma intravenosa, dos veces al día, durante una semana).

La eflornitina (un inhibidor suicida de la ornitina descarboxilasa, enzima clave en la producción de poliaminas), sólo o en combinación con nifurtimox (triplanocida nitro-heterocíclico que genera

radicales libres como superóxido en los tripanosomas), está siendo utilizada para el tratamiento de la fase segunda de la enfermedad causada por *T. b. gambiense* pero no frente a *T. b. rhodesiense*, pues esta subespecie es mucho menos susceptible al fármaco. Se piensa que esta mayor tolerancia de *T. b. rhodesiense* al fármaco es debida a que el tiempo de vida media de la enzima ornitina descarboxilasa es menor en esta especie (4,3 horas), mientras que en el caso de *T. b. gambiense* este tiempo es bastante mayor (18 horas), por lo que la inhibición irreversible de esta enzima por eflornitina asegura que el parásito esté privado de poliaminas por un largo periodo de tiempo (los tripanosomas africanos carecen de transportadores de poliamina, por lo que no pueden obtenerlas de otra manera). La terapia combinada de eflornitina y nifurtimox (NECT) presenta ventajas con respecto a la terapia basada en eflornitina, como una protección frente a resistencia, administración más corta y reducción de los efectos adversos en un 50%.

La donación de forma gratuita a la OMS de eflornitina, melarsoprol (único fármaco aprobado para el tratamiento de la segunda fase de la enfermedad causada por *T. b. rhodesiense*) y pentamidina por Sanofi-aventis de Francia y suramina y nifurtimox por Bayer Leverkusen de Alemania, empresas productoras, está resultando decisiva para la importante disminución de esta enfermedad observada en los últimos años.

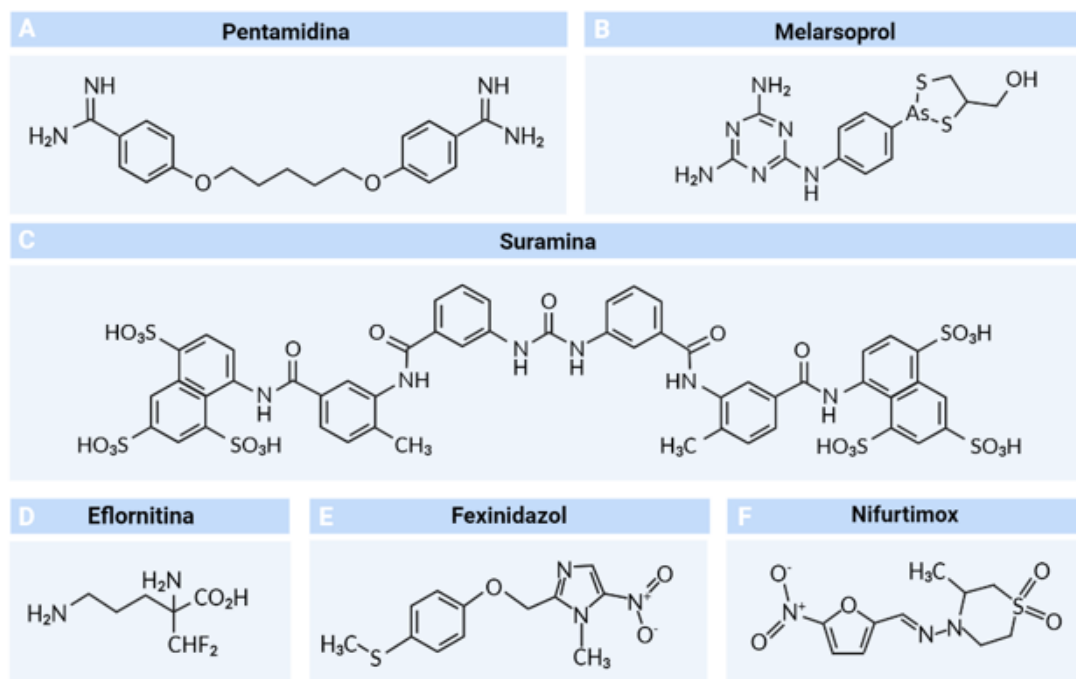


Figura 6. Fármacos utilizados en terapia frente a la tripanosomiasis humana: (A) Pentamidina; (B) Melarsoprol; (C) Suramina; (D) Eflornitina; (E) Fexinidazol; (F) Nifurtimox. **Figura modificada a partir de Barret et al. (2012).**

3. CICLO DE VIDA

T. brucei alterna su ciclo de vida entre vertebrados e invertebrados, siendo, respectivamente, hospedadores y vectores de dicho parásito. Por esta razón, se pueden diferenciar distintos estados o formas de tripanosoma, ya que este se va adaptando a los distintos ambientes que se encuentra durante su ciclo de vida (**Fig. 7**). Así, se diferencian 2 estados fundamentales, los **epimastigotes** (cuerpo basal anterior al núcleo) y los **tripomastigotes** (cuerpo basal posterior al núcleo). A su vez, la forma tripomastigote se diferencia en 4 subtipos: **procíclico**, **metacíclico**, “**slender**” o proliferativo y “**stumpy**” o no proliferativo.

T. brucei, al igual que otras especies de los tripanosomas africanos, son transmitidos por distintas especies de la mosca tse-tsé (vector), que pertenecen al género *Glossina*. Ambos sexos son hematófagos, es decir, se alimentan de sangre de mamíferos, proceso durante el cual, la mosca puede adquirir el parásito o transmitirlo.

Durante su alimentación, las moscas pueden adquirir el parásito al ingerir sangre de un mamífero infectado, que contiene la forma de tripomastigote *stumpy* (forma robusta que resiste cambios de pH, temperatura y ambiente proteolítico del intestino de la mosca). Esta forma, se diferencia a la forma de procíclico en el intestino posterior de la mosca tse-tsé, formas que se multiplican por fisión binaria. Los tripanosomas procíclicos no expresan genes VSG; en cambio producen una abundante proteína invariante de superficie, la proteína repetitiva ácida de procíclicos (PARP o prociclina). A continuación, abandonan el intestino y se convierten en epimastigotes, que migran a las glándulas salivares de la mosca tse-tsé, donde se diferencian en tripanosomas metacíclicos, forma que puede ser transmitida a los mamíferos.

Los tripanosomas metacíclicos producen un repertorio limitado de alrededor de 14 abrigos VSG diferentes que los protege de la lisis por factores del suero del hospedador y los preadapta a vivir en el hospedador mamífero, a los que son transmitidos cuando la mosca tse-tsé se alimenta de nuevo. La mosca permanece infectada de por vida (unos 3 meses), y va a hacer tomas de sangre cada tres días.

Aproximadamente, una semana después de la infección del hospedador mamífero, el tripanosoma metacíclico se diferencian en tripomastigotes *slender*, una forma proliferativa (se divide por fisión binaria) para aumentar la parasitemia, que inicia la expresión del repertorio de los genes VSG de la forma sanguínea. Las moléculas de VSG forman una gruesa cubierta (~15 nm) que protege al parásito de la lisis mediada por complemento al tiempo que protege a las proteínas conservadas subyacentes del reconocimiento por componentes del sistema inmunitario adquirido.

La variación antigénica de las VSG expuestas en membrana es el principal mecanismo de evasión inmunitaria, pero como un factor que también contribuye a esta evasión está la alta velocidad de reciclaje de la cubierta de superficie, lo que facilita la retirada de los complejos VSG-anticuerpo. Los complejos anticuerpo-VSG son internalizados mediante endocitosis mediada por clatrina en el bolsillo flagelar, en los endosomas los anticuerpos son degradados y en cambio las VSG son recicladas de forma eficiente a la superficie celular. Así, mientras la variación antigénica permite una supervivencia en el tiempo de la población, pero no de todos los individuos, la retirada de las inmunoglobulinas unidas a la superficie es un factor importante que contribuye a la supervivencia de todos los parásitos.

Algunos de estos tripomastigotes sanguíneos proliferativos se diferencian a la forma no proliferativa o *stumpy*, que se trata de un estado de transmisión pre-adaptado a la supervivencia en los vectores, completando el ciclo.

Durante todas las fases de su ciclo de vida, estos tripanosomas se desarrollan de forma extracelular.

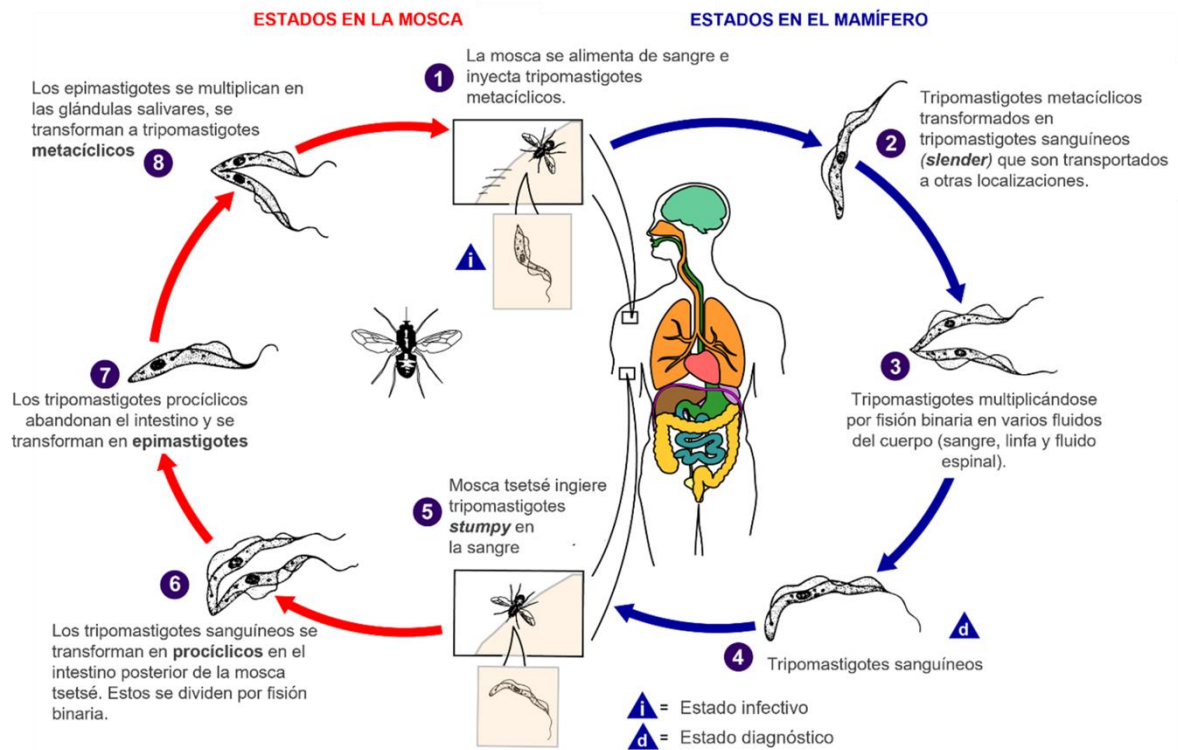


Figura 7. Ciclo de vida de *T. brucei*, ilustrando los diferentes estados dentro del vector (mosca tsetse) y hospedador (mamífero, mostrado en este ejemplo como humano). **Figura extraída de la Centers for Disease Control and Prevention Image Library.**

3.1. La movilidad social y su relevancia en el ciclo de vida

Posiblemente la parte más compleja del ciclo de vida de *T. brucei* tenga lugar en el tracto digestivo de la mosca tse-tsé, en particular la migración del parásito hasta las glándulas salivares (**Fig. 8**), desde donde pasará a hospedadores mamíferos cuando la mosca se alimente. Incluso en las condiciones optimizadas del laboratorio, cuando las moscas ingieren sangre con el parásito, menos del 20% de estos completan el ciclo y son capaces de transmitirse; en la naturaleza, se piensa que estos números son considerablemente menores. Esto es debido a las numerosas “barreras” que debe atravesar el parásito. En primer lugar, tras la ingestión de sangre, los tripomastigotes sanguíneos *stumpy* alcanzan el intestino medio, donde se diferencian en las formas *procíclicas* tempranas. En muchas moscas, el parásito no progresa más allá en su desarrollo. Esto es debido a que los tripanosomas deben atravesar la matriz peritrófica, una estructura quitinosa que actúa de barrera física entre la ingesta y el epitelio del intestino. No se sabe si los parásitos la atraviesan o la bordean hasta alcanzar el espacio

ectoperitrófico, donde los parásitos se observan a los seis días postinfección. En este momento la mayoría de los parásitos son formas procíclicas tardías (epimastigotes).

Para completar el ciclo, los parásitos deben llegar al intestino anterior, alcanzar el lumen del proventrículo y entonces invadir las glándulas salivares (**Fig. 8**). Esta migración es un cuello de botella en el ciclo del parásito, ya que pocas células son capaces de alcanzar las glándulas. En las glándulas salivares, el parásito se diferencia a las formas metacíclicas, que están preadaptadas para la transmisión al hospedador mamífero.

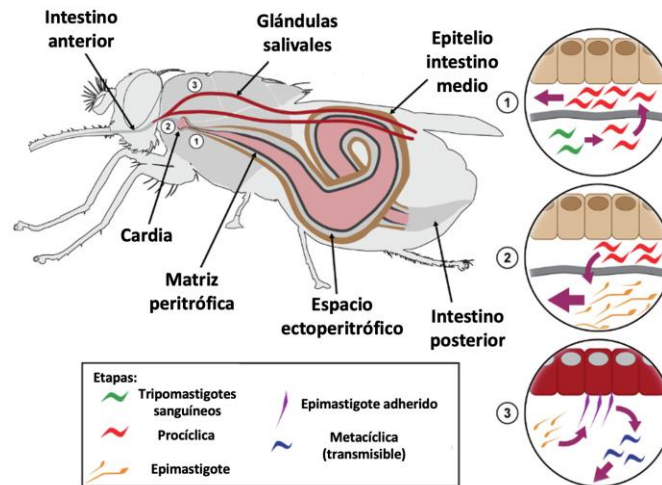


Figura 8. Migración y etapas de *T. brucei* en la Mosca Tsetse. (1) Los tripomastigotes sanguíneos alcanzan el lumen del intestino medio diferenciándose a las formas procíclicas y llegando al espacio ectoperitrófico. (2) Pueden atravesar la matriz peritrófica y migrar al intestino anterior en la forma epimastigote. (3) Alcanzan las glándulas salivares diferenciándose a las formas metacíclicas (transmisibles). **Figura modificada a partir de Aksoy et al. (2019).**

En el insecto vector, la cubierta de VSG de las formas sanguíneas es reemplazada por dos proteínas ancladas a la membrana por estructuras GPI, que se denominan prociclinas EP y GPEET (cuyos nombres responden a la existencia de repeticiones de los dos o los cinco aminoácidos incluidos en su nombre). Las formas procíclicas tempranas, que se desarrollan en la mosca durante la primera semana de infección, expresan altas cantidades de prociclina GPEET y poca EP, mientras que las formas procíclicas tardías, que son las que se encuentran en el espacio ectoperitrófico, expresan altos niveles de EP y nada de GPEET. La progresión de la forma procíclica temprana a tardía es irreversible en la mosca.

Ambas migraciones, una para colonizar el intestino medio y otra para invadir las glándulas salivares, son esenciales para que el ciclo de vida de *T. brucei* progrese, de forma que es un proceso coordinado. En el 2010 se publicó el curioso comportamiento observado en un cultivo de formas procíclicas cuando se cultivaban sobre superficies semisólidas, estas formas se desplazaban en grupo sobre placas de agar, y a este comportamiento se le denominó motilidad social (SoMo, *social motility*), mecanismo que es compartido con un número cada vez mayor de microorganismos, en los que se viene observando la capacidad de formar estructuras multicelulares. Esta capacidad se puede manifestar como una agregación de individuos en comunidades o incluso a través del movimiento coordinado de la población. Ejemplos de estas interacciones son la movilidad en grupo, el ‘quorum sensing’ y la formación de biofilms.

En la **figura 9** se ilustra cómo se manifiesta el fenómeno SoMo cuando formas procíclicas son colocadas sobre una placa de medio semisólido y son fotografiadas a diferentes intervalos de tiempo. Lo primero que se observa es la formación de pequeñas colonias que empiezan a moverse sobre la superficie. Los parásitos que integran la colonia forman proyecciones radiales que crecen a una velocidad de un cm por día, lo que equivale a un desplazamiento de 500 veces la longitud del parásito. Se ha estimado que estas proyecciones se forman cuando la población supera el millón y medio. Las proyecciones se extienden de forma recta con cierta curvatura en el sentido de las agujas del reloj. Cuando dos de estas proyecciones (corrientes de parásitos) se aproximan, estas cambian de dirección para evitar el contacto, lo que sugiere que detectan algún ‘repelente’ que les hace cambiar de dirección. Se postula que la señal que coordina el movimiento del grupo podría ser un factor difusible o directamente el contacto célula a célula.

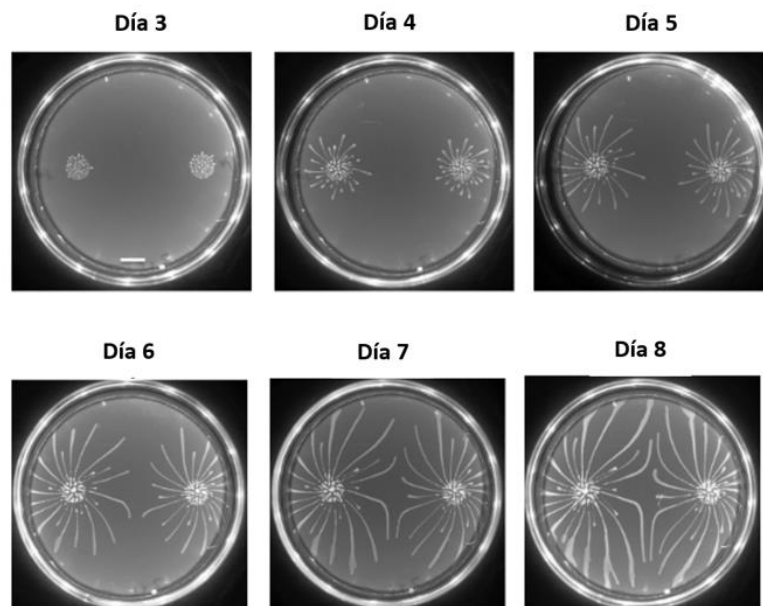


Figura 9. La motilidad social (SoMo, *social motility*) de *T. brucei* en una superficie semisólida a lo largo del tiempo. **Figura modificada a partir de Imhof & Roditi (2015).**

Como se ha comentado, en la mosca tse-tsé los parásitos deben realizar dos migraciones, por lo que se postula que el fenómeno SoMo podría estar reflejando alguno de estos eventos. En concreto, se piensa que podría estar relacionado con el evento de colonización del intestino de la mosca, basado en las siguientes observaciones. Primero, solo las formas procíclicas tempranas son capaces de migrar sobre placas. Segundo, la tinción de la población con anticuerpos anti-GPEET y anti-EP muestran que las proyecciones son positivas para GPEET, mientras que las que permanecen en el lugar inicial son negativas para GPEET, y, por tanto, son formas procíclicas tardías (**Fig. 10**). Se sabe, sin embargo, que ni GPEET ni EP son precisas para que tenga lugar el fenómeno SoMo. Actualmente se está realizando una intensa investigación para la identificación de las moléculas del parásito que son responsables de este mecanismo.

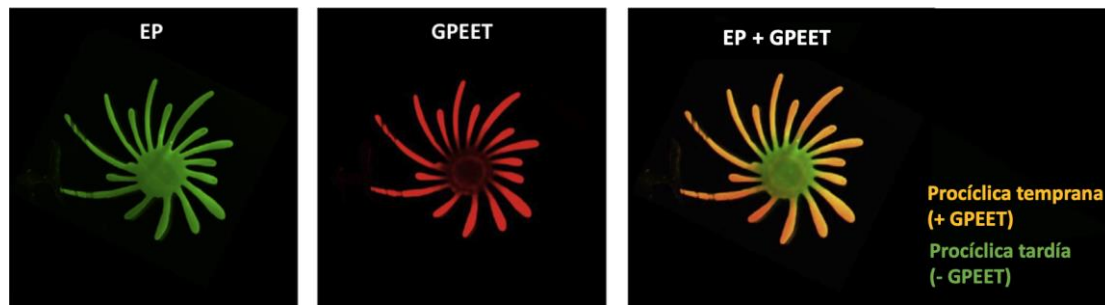


Figura 10. GPEET permite diferenciar Trypanosomas sedentarios o en migración. Las formas procíclicas tardías (- GPEET) se acumulan en la parte central, mientras que las formas procíclicas tempranas (+ GPEET) son capaces de migrar. **Figura modificada a partir de Imhof & Roditi (2015).**

4. REORDENAMIENTOS DE DNA Y EXPRESIÓN DE VSG

La mayoría de los estudios se han realizado en la subespecie *T. b. brucei* por su facilidad para ser cultivada en el laboratorio y porque no sobrevive en la sangre humana.

El genoma de *T. brucei* es diploide y contiene 11 pares de cromosomas grandes (1-6 Mb; donde se encuentran la mayoría de los genes de este parásito) y un centenar de minicromosomas (50-100 Kb) y 1 a 5 cromosomas intermedios (200-500 Kb) de función y ploidía desconocidos.

En cambio, los sitios de VSG metacíclicas, que se expresan en los tripanosomas metacíclicos, tienen sólo VSG teloméricos (**Fig. 11**). Los sitios de expresión de las VSG metacíclicas se activan en el momento de la infección del hospedador, pero rápidamente resultan silenciados cuando los tripanosomas cambian a expresar un sitio de expresión de VSG propia de la forma sanguínea.

El resto de los genes VSG se encuentran distribuidos por el genoma. La secuenciación del genoma de *T. brucei* ha permitido estimar que existen entre 1250 y 1500 genes VSG, lo que supone que hasta un 30% del genoma está compuesto por genes VSG o fragmentos de los mismos. La gran mayoría se encuentran en ordenamientos en tándem situados en regiones subteloméricas. Otro grupo importante de genes VSG silenciosos (~100-200) está presente en los telómeros de los minicromosomas. Los minicromosomas están constituidos por largas agrupaciones de una secuencia repetida de 177-pb y genes VSG en sus telómeros (**Fig. 11**). Las características de estos minicromosomas sugieren un papel importante en la variación de VSGs.

Una característica destacable de la organización de los genes VSG es que se localizan en los telómeros o en regiones subteloméricas. Los telómeros son áreas particularmente recombinogénicas de los genomas. Además, las regiones teloméricas en este tripanosoma se localizan en la periferia nuclear en forma de heterocromatina. Esto convierte a los extremos de los cromosomas en lugares apropiados para situar genes sobre los que se necesita generar variabilidad, tal es el caso de familias génicas implicadas en variación antigénica o en adaptación al hospedador.

Para ser transcritos en el estadio de tripomastigote sanguíneo, los genes VSG necesitan localizarse en ciertas regiones teloméricas, que se conocen como sitios de expresión (ES, *expression site*). Existen alrededor de 20 ES potenciales, aunque sólo uno es activo en un momento dado. Los sitios ES están

formados por largas unidades de transcripción policistrónica (**Fig. 11**), en las que se encuentran además del gen VSG otros genes llamados ESAGs (*Expression-site-associated genes*). Los sitios potenciales ES se encuentran en los telómeros de los cromosomas grandes y de algunos cromosomas intermedios.

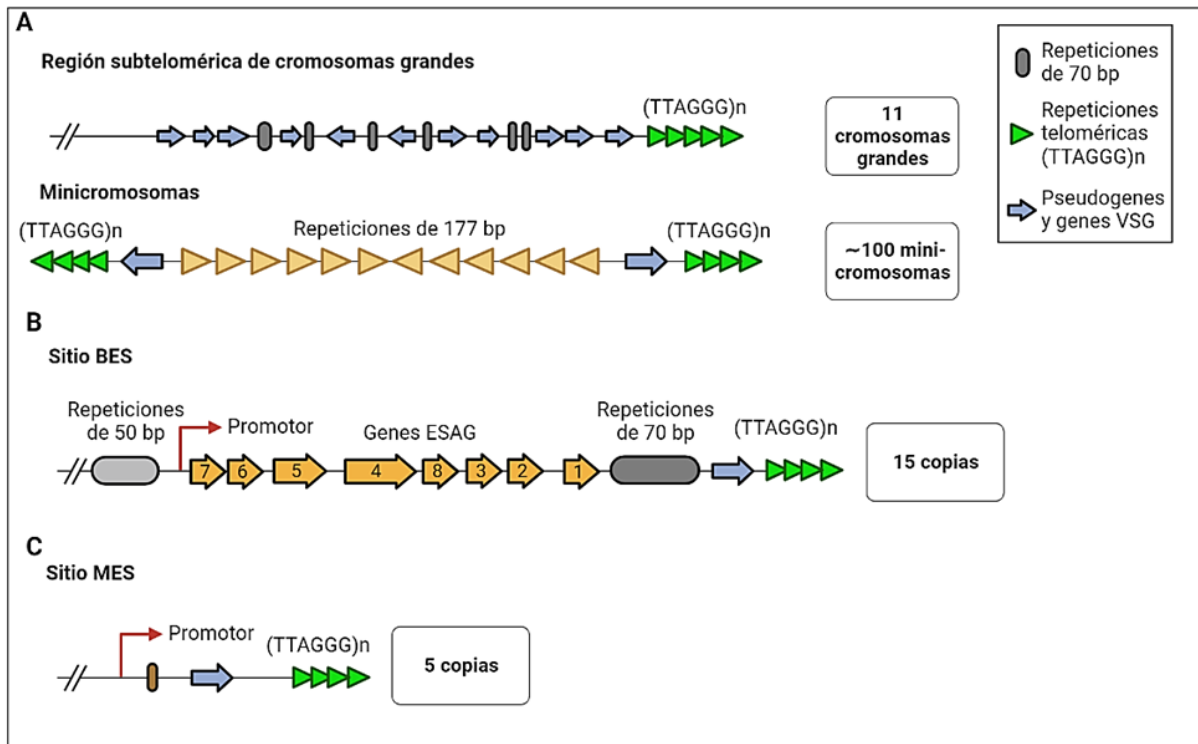


Figura 11. Organización genómica y localización de los genes VSG en *T. brucei*. (A) Organización de genes VSG en regiones subteloáméricas de cromosomas grandes y en micromosomas. (B) Componentes genómicos de un locus BES. (C) Componentes genómicos de un locus MES. **Figura propia basada en Cestari & Stuart (2018).**

Teniendo en cuenta esta organización de los genes VSG y dado que sólo un sitio ES es activo y sólo un gen VSG es transcrito, los tripanosomas tienen dos posibles mecanismos para cambiar el gen VSG expresado y generar la variabilidad antigénica. Así, bien pueden cambiar el sitio ES o reemplazar el gen VSG presente en el sitio ES; ambos mecanismos han sido observados (**Figura 12**).

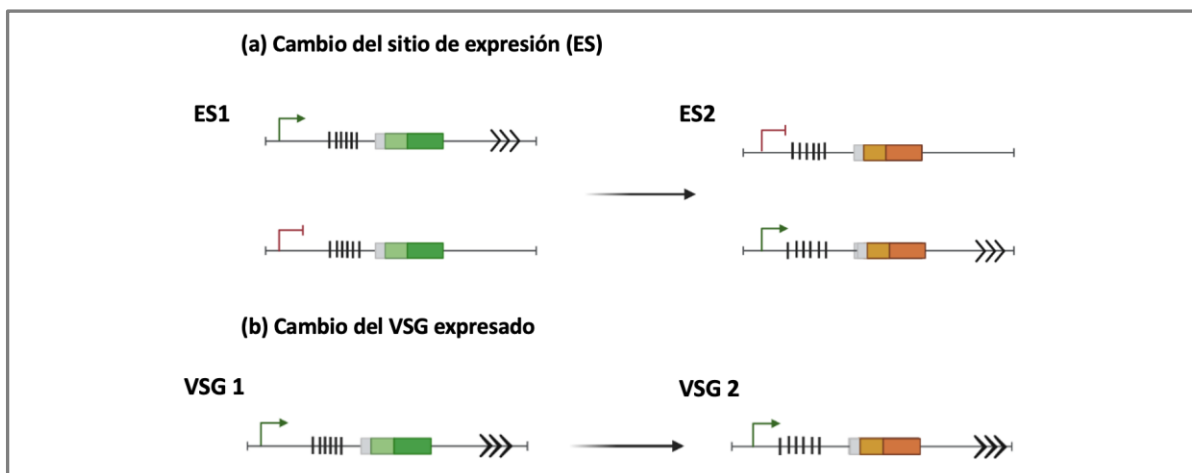


Figura 12. Mecanismos de variabilidad antigénica en *T. brucei*. (A) Representación esquemática del cambio del sitio de expresión. (B) Representación esquemática del cambio del VSG expresado. **Figura propia.**

4.1. Mecanismos de variación antigénica

El cambio antigénico puede ocurrir por uno de los siguientes dos mecanismos generales:

- 1) Un gen VSG silencioso se transloca a un sitio de expresión de VSG transcripcionalmente activo, lo que conduce a la expresión de un nuevo abrigo de VSG (**Fig. 13A**). Esta es la forma de cambio más frecuente.
- 2) En el segundo mecanismo la expresión diferencial se debe a un cambio en el control transcripcional de los sitios de expresión (**Fig. 13B**).

Varios tipos de reordenamientos de DNA pueden mediar el reemplazamiento del gen VSG que reside en el sitio de expresión telomérico activo por una nueva secuencia codificante de VSG (**Fig. 13**):

- a) La activación del gen VSG muy frecuentemente implica una transposición duplicativa (a través de un mecanismo de conversión génica) de un gen VSG silencioso desde una posición interna en el cromosoma a un sitio de expresión de gen VSG transcripcionalmente activo, generando una copia unida a expresión (ELC) del gen VSG silente. El ELC que estaba siendo expresado se pierde y posiblemente es destruido en este proceso.

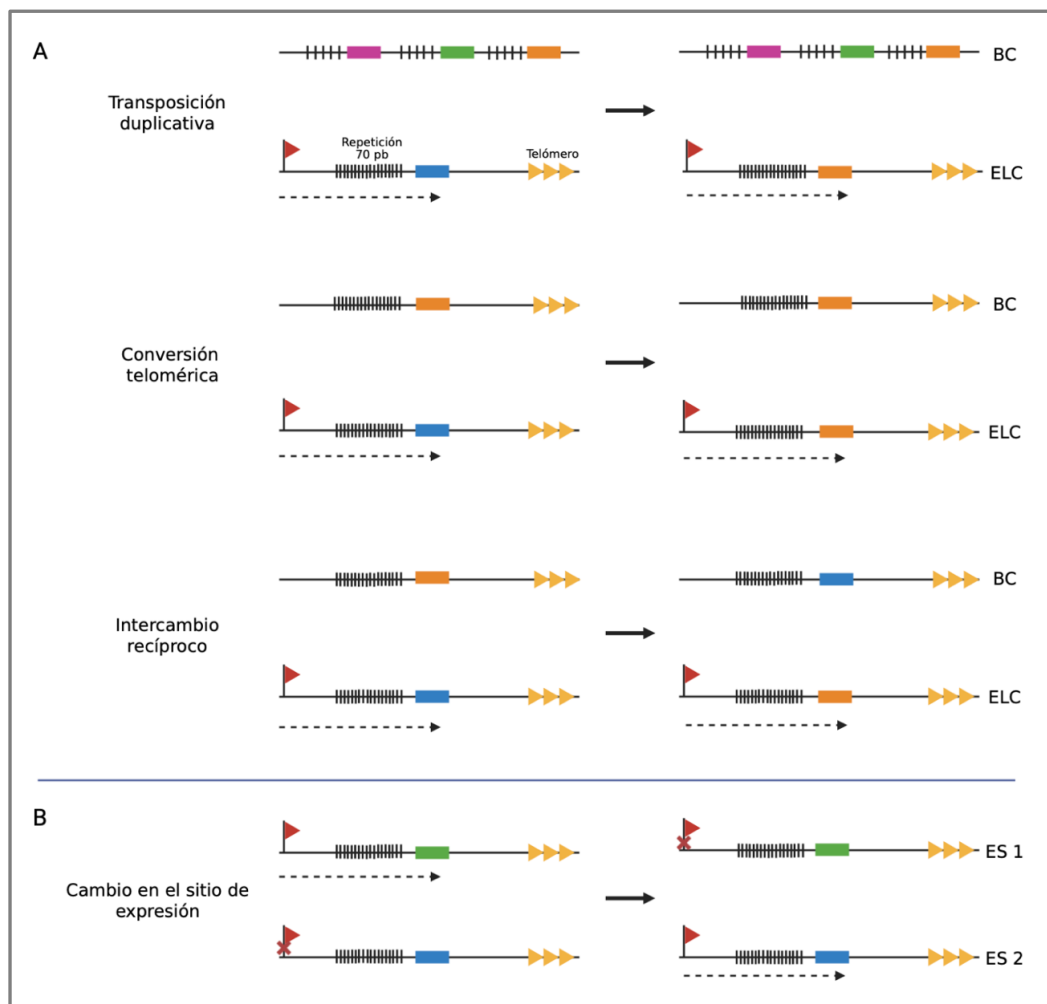


Figura 13. Mecanismos de variación antigénica. **Figura propia basada en Van der Ploeg et al. (1992).**

Este proceso parece valerse de la existencia de ordenaciones de secuencias repetidas de 70 pb, localizadas 1-2 kb por encima del codón de iniciación ATG de gen VSG y por secuencias conservadas presentes en los extremos 3' de los genes VSG (**Fig. 14**). El proceso se explica por una conversión génica unidireccional.

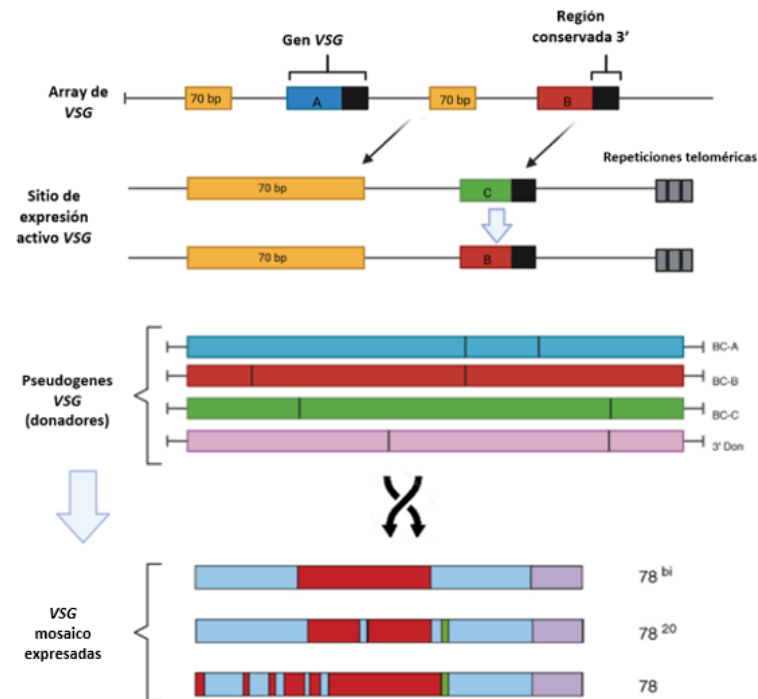


Figura 14. Cambio de VSG mediado por conversión génica unidireccional. Los nombres a la derecha de los pseudogenes VSG (donadores) y de los VSG mosaico expresados fueron dados por el autor. **Figura propia basada en Taylor & Rudenko (2006).**

La secuenciación del genoma de *T. brucei* ha puesto de manifiesto que la mayoría de los genes VSGs son pseudogenes. Así, durante la infección crónica, muchos de los genes que contribuyen a la variabilidad antigénica tienen que recombinar parcialmente con la VSG residente en el sitio de expresión activo para reconstruir genes funcionales (**Fig. 13**). En este sentido, genes VSG quiméricos se deben estar generando continuamente en los sitios de expresión.

- b) Otro mecanismo por el que los genes VSG silenciosos pueden ser colocados en el sitio de expresión transcripcionalmente activo es la transposición duplicativa de un gen VSG telomérico silente al telómero del sitio de expresión, en un proceso llamado conversión de telómeros (**Fig. 13**).
- c) También se puede producir un intercambio recíproco no duplicativo de los telómeros del tripanosoma (**Fig. 13**), en el que a través de una recombinación homóloga a nivel de las secuencias repetidas de 70-pb, un gen VSG silencioso presente en un telómero es intercambiado por el gen VSG presente en un ES, con lo que el VSG silencioso es ahora el activo transcripcionalmente.

Estos diversos mecanismos de cambio antigénico no parecen estar programados "per se", más bien, parecen ocurrir al azar, y la fuerza selectiva puede ser el requerimiento de un abrigo VSG funcional que evita que el tripanosoma sea rápidamente lisado.

4.2. Modelo de la conversión génica de los genes VSG

El modelo propuesto, de conversión génica, es un modelo teórico que se basa en mecanismos observados en otros eucariotas como levaduras.

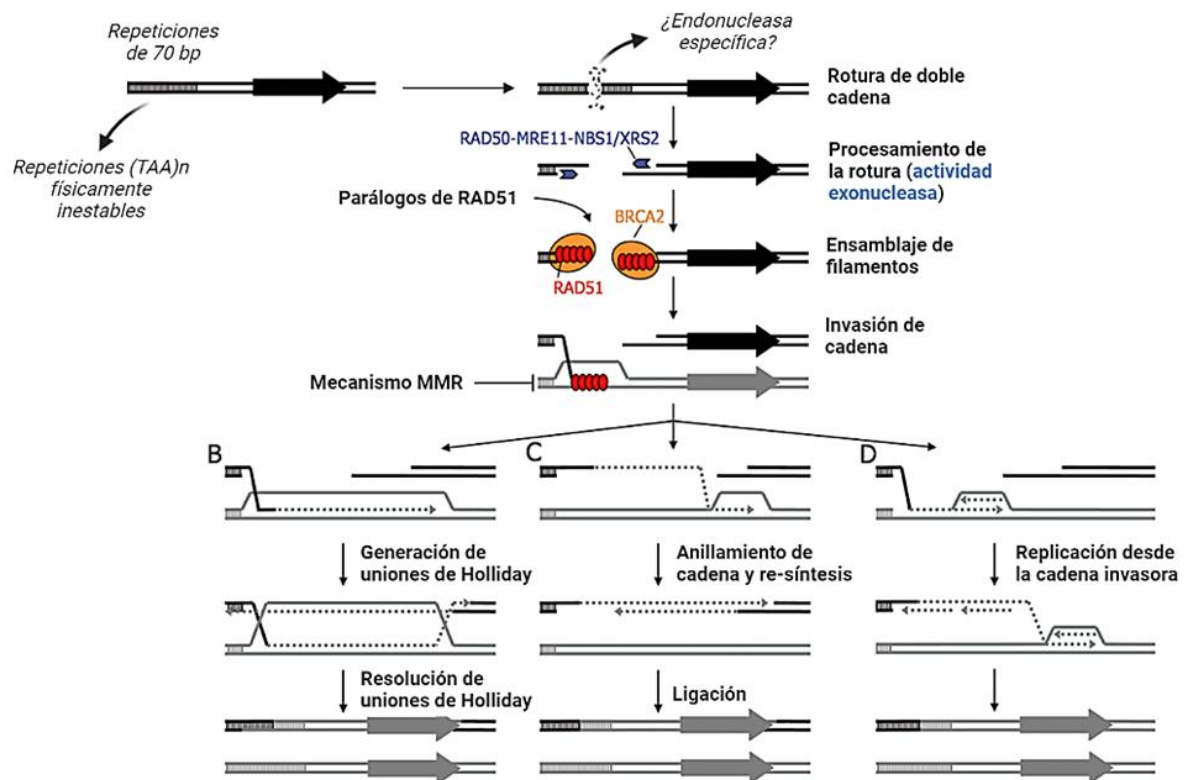


Figura 15. Modelos de recombinación para explicar la conversión génica de los genes VSG. **Figura modificada a partir de Morrison et al. (2009).**

En la **figura 15** se ilustra el mecanismo propuesto para explicar la conversión génica de los genes VSG. Se distinguen las siguientes etapas:

1. Se introduce un corte de las dos hebras en la organización en tándem de las secuencias repetidas de 70 pb en los sitios de expresión de las formas sanguíneas (B-ESs). Estas repeticiones de 70-pb presentan el motivo (TAA)_n, que es una secuencia de DNA físicamente inestable, lo que facilita la aparición de roturas. La molécula de DNA que sufre la rotura se convierte en la secuencia recipiente. Es posible que esta rotura sea producida por una endonucleasa específica.
2. Se produce una degradación exonucleásica 5'-3' sobre la secuencia del tándem de repeticiones de 70 pb, generando extremos 3' protuberantes, por parte de las proteínas MRE11-RAD50-XRS2/NBS1.
3. La cadena 3' protuberante es sustrato para RAD51 que forma un filamento nucleoproteico. RAD51 es el homólogo eucariota a la proteína RecA bacteriana. Así, RAD51 cataliza la invasión dependiente de homología de la cadena 3' protuberante en un DNA dúplex intacto, que contiene un gen VSG silencioso. El mecanismo MMR ("Mismatch repair") cuida que la recombinación ocurra entre secuencias suficientemente homólogas. La región 3' protuberante actuaría de iniciador para

la síntesis de la cadena utilizando como molde el DNA silencioso. Se han planteado tres posibles mecanismos para completar el proceso de conversión, cuando la conversión ocurre sobre VSG teloméricas puede no ser necesario que la cadena 3' protuberante vuelva a aparearse con la cadena complementaria en el sitio donde se produjo la doble rotura de la cadena. En el caso de conversión génica sobre genes internos esta etapa debe ocurrir necesariamente.

4. El proceso se termina con la ligación de los productos.

El gen VSG previamente situado en el sitio B-ES es deletado como consecuencia del proceso, y el gen silente resulta duplicado.

5. ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN DE LOS SITIOS DE EXPRESIÓN

El proceso por el que se producen cambios de apagado o encendido en los sitios ES alternativos sigue siendo un misterio. Y lo que resulta muy llamativo es que parece existir un control muy grande en cuanto que sólo un ES es activo en un momento dado.

Experimentalmente, se puede forzar a que un tripanosoma cambie el ES a través de la inserción de un gen de resistencia a un antibiótico en un sitio ES silencioso y, posteriormente, crecer ese parásito en presencia de dicho antibiótico. En estas condiciones, el ES que estaba activo deja de transcribir y se comienza a transcribir el ES que tiene el gen de resistencia. Sin embargo, cuando se colocan dos genes de resistencia en dos ES diferentes y se ponen los parásitos en la presencia de los dos antibióticos, no se obtienen líneas estables que expresen simultáneamente ambos genes de resistencia. Estos experimentos indicarían la existencia de un fino mecanismo de control sobre los ES, que se encarga de que sólo un sitio sea activo.

Un hecho destacable es que no se producen reordenamientos de DNA, al menos desde la región promotora hasta el extremo 3' del gen VSG, por lo que se ha sugerido la existencia de una regulación epigenética. En los siguientes apartados se discuten una serie de características asociadas al estado de activación/silenciamiento de los ES.

5.1. Promotor

Actualmente se han caracterizado varios promotores de estos ES y se ha encontrado que todos ellos son muy similares. Es un hecho curioso que la transcripción de los genes tanto de las VSGs como de las prociclinas es dirigida por la RNA polimerasa I, teniendo estos genes los promotores adecuados. Es el único caso conocido en el que la RNAPol I está encargada de transcribir genes codificantes de proteínas. También, como ocurre en la mayoría de eucariotas, la RNAPol I es la encargada de transcribir los genes rDNA.

Además, los promotores analizados, independientemente de que provinieran de ES activos o inactivos, introducidos en tripanosomas sanguíneos formando parte de construcciones extracromosomales, son capaces de dirigir la transcripción génica de genes reporteros, lo que demuestra que son funcionalmente activos. Además, estos experimentos indican que dos de estos promotores pueden estar activos a la vez en una célula. Estas construcciones también funcionan en

las formas procíclicas, en las que los genes VSG no son expresados, indicando que la maquinaria transcripcional está operativa también en estas células.

A pesar de estas similitudes entre los diferentes promotores, datos recientes han demostrado que existe una regulación muy importante a nivel del promotor de los ES. La evidencia más directa se obtuvo por medio del análisis de CITFA, que se identificó como un factor esencial para el inicio de la transcripción basal y general por medio de la RNAPolII en tripanosoma. Estos estudios demostraron que existe una limitación al acceso de CITFA en los promotores de ES silenciosos; y que se asegura su ocupación máxima en los promotores de ES activos.

Por lo tanto, la expresión monoalélica de ES implica un mecanismo de regulación de la transcripción en el promotor de ES.

5.2. Estructura de la cromatina

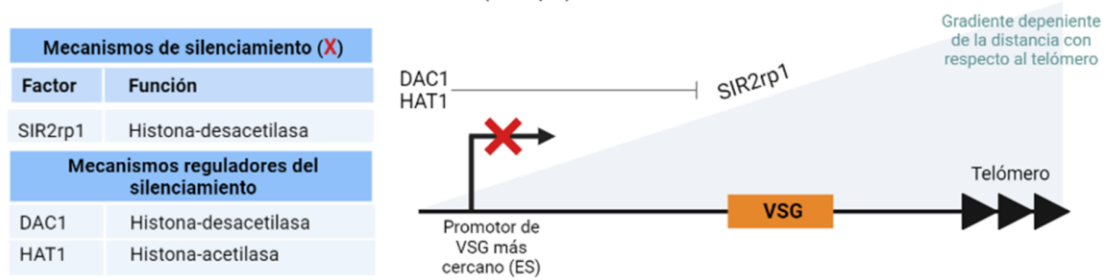
Estudios con DNasa I indican que la cromatina asociada al gen VSG expresado en el telómero del ES se encuentra en una conformación “más abierta” que la cromatina de los genes VSG en ES silenciosos. Sin embargo, en el otro extremo de los ES, en las proximidades de los promotores, no existen diferencias de sensibilidades entre los estados activo e inactivo, lo que indica que la estructura de la cromatina es similar en ambas situaciones. Por lo tanto, parece existir alteraciones de la cromatina en las proximidades de los telómeros cuando el ES es activado.

En los últimos años se están acumulando datos que relacionan el fenómeno del silenciamiento telomérico con la estructura de la cromatina (**Fig. 16**). Así, se ha visto que las chaperonas de cromatina, CAF-1 y ASF1, se requieren para la herencia del estado silencioso. Además, se han implicado a varios remodeladores de la cromatina como responsables de estabilizar a los nucleosomas en los sitios silenciosos. Entre estos se encuentran: ISWI, una desacetilasa de histonas, DAC3 y una metiltransferasa de histonas (H3K76), DOT1B.

Otros experimentos adicionales que han permitido profundizar más en el fenómeno del silenciamiento telomérico fueron aquellos en los que se llevó a cabo la expresión inducida de un transgén VSG. Esto condujo a una atenuación a corto plazo del VSG activo en ese momento (presente en el telómero). Curiosamente, un experimento donde se valoraba este silenciamiento de la ES activa con el paso del tiempo, mostró que el silenciamiento se extendía desde el telómero hacia el promotor de la ES.

Es decir, el silenciamiento de ES estaría dirigido por el telómero y se propaga gradualmente desde este al promotor.

Silenciamiento telomérico de corto alcance (~5 kpb)



Silenciamiento telomérico de largo alcance (~50 kpb)

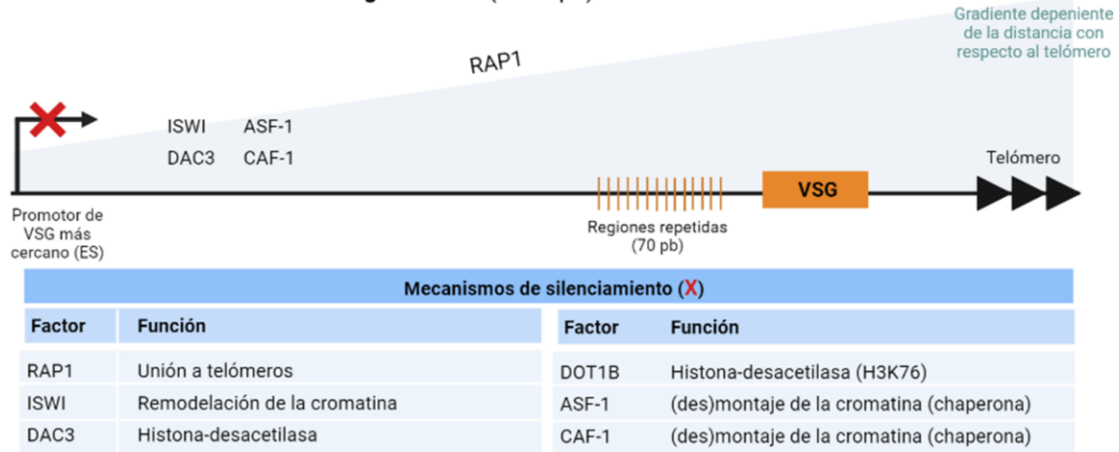


Figura 16. Factores implicados en el silenciamiento de los sitios de expresión telomérica y VSG en *T. brucei*, tanto de corto como de largo alcance (su función se recoge en las tablas). Son únicamente SIR2rp1 y RAP1 los factores cuyo efecto disminuye a medida que la distancia hasta el telómero aumenta (*representado como gradiente azul*). Los factores DAC1 y HAT1 no están implicados en el silenciamiento, sino en el bloqueo de la expansión de SIR2rp1. **Figura modificada a partir de Horn & McCulloch (2010).**

5.3. Implicación de un nuevo nucleótido

Se había observado que el DNA telomérico de los genes VSG era resistente a la digestión con endonucleasas de restricción cuando no estaba siendo transcrito. Y que cuando se producía la activación de un ES se observaba la restauración de la capacidad de ser digerido por las enzimas de restricción.

Posteriormente se comprobó que estos efectos son debidos a la presencia de un nuevo nucleótido, llamado la base J, que es β -D-glucosil-hidroximetil-uracilo. La base J se forma a partir de una modificación de la timina, que consiste en una hidroxilación seguida de la transferencia de una glucosa. Los investigadores han localizado este nucleótido modificado sólo en el DNA telomérico de las formas sanguíneas. La restricción de J a las copias teloméricas silenciosas de los genes VSG y el gradiente de modificación desde el telómero hacia el interior del cromosoma podría ser explicado por la existencia de un enzima que reconoce las repeticiones teloméricas y comienza a deslizarse desde éstas al interior del cromosoma. La ausencia de la base J en los genes VSG teloméricos que son transcritos se explicaría por una competición entre transcripción y modificación del DNA en los sitios de expresión.

Si esta modificación influye o produce la inactivación transcripcional no es conocido. No obstante, la distribución de este nucleótido podría explicar los cambios reversibles de la estructura de la cromatina en las regiones teloméricas, según su estado de activación. Así, el nucleótido modificado puede estar implicado en la construcción de una forma silenciada de la cromatina.

No obstante, la ausencia de este nucleótido en las formas procíclicas, donde los ESs están reprimidos, sugiere la implicación de diferentes niveles de control en el silenciamiento de los sitios de expresión de VSG.

5.4. Transcripción

Aunque sólo un gen VSG es transcrito en un tripanosoma, este hecho no es resultado de un estricto control al nivel de la iniciación de la transcripción de los promotores ES. Así, datos experimentales indican que varios ES son transcritos parcialmente en una misma célula. Por ejemplo, se estima que alrededor del 20% de los transcritos *ESAG6* y *ESAG7*, los más cercanos al promotor, se originan a partir de ES no activos. Por lo tanto, los ES silenciosos parece que contribuyen mucho más al pool de cDNAs próximos al promotor que al pool de cDNAs alejados del promotor de manera general. Estas observaciones indican que la transcripción se inicia en la mayoría de los ES, pero que existe una disminución progresiva (una atenuación *downstream*) de la elongación transcripcional en todos los casos menos en el ES que contiene el gen VSG activo transcripcionalmente.

Un experimento llamativo que se llevó a cabo para demostrar esto, fue la introducción del gen de la neomicina fosfotransferasa (NEO) a 1 kb *downstream* del promotor de un ES inactivo. Este confirió al parásito resistencia a una baja concentración del fármaco G418 (1 µg/ml), mientras que el mismo gen, cuando se insertó en el posición idéntica de un ES activo, la resistencia aumentó del orden de 100 veces más.

5.5. Un modelo para el control del ES

En la **figura 17** se muestra un modelo hipotético de regulación de los sitios ES. Según este modelo, todos los promotores ES reclutan la maquinaria básica de transcripción, que iniciará la transcripción, pero la actividad plena de un sitio activo depende de que se produzca el reclutamiento selectivo de la “factoría de RNA” (entre la que podemos contar con la actividad de CITFA), necesaria para la elongación del RNA, procesamiento y exportación nuclear. Así, el que sólo un sitio sea activo podría ser una consecuencia de que los componentes de esta factoría se encontrarán en la célula en cantidades limitantes. Esta hipótesis ha recibido apoyo experimental tras la identificación de un cuerpo nuclear que contiene RNA polimerasa I y en el que el sitio de expresión activo se encuentra secuestrado (**Fig. 18**). Evidencias citológicas de la existencia de esta estructura se muestran en la **figura 19**.

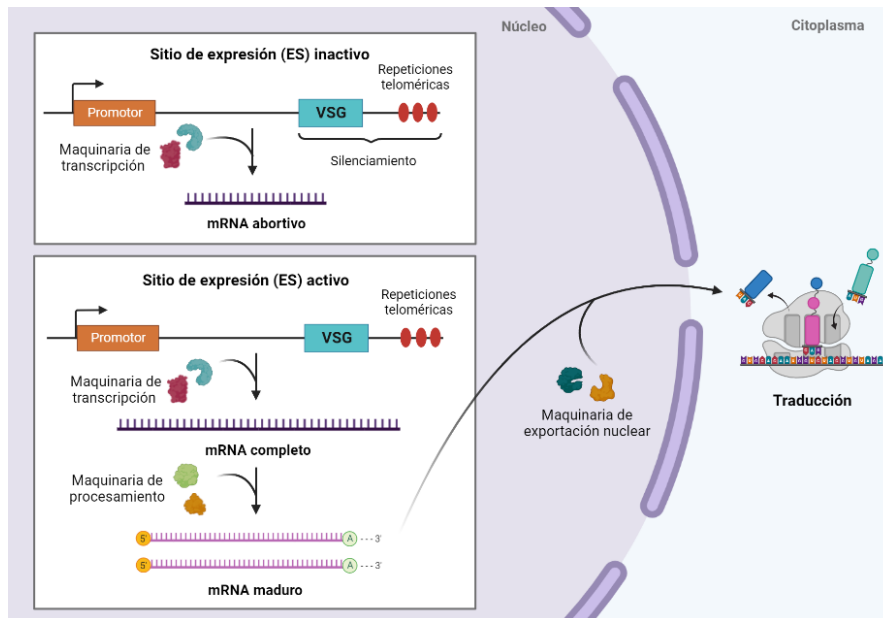


Figura 17. Esquema comparativo de la regulación de sitios de expresión (ES) inactivos y activos en la forma sanguínea de *T. brucei*. **Figura propia.**

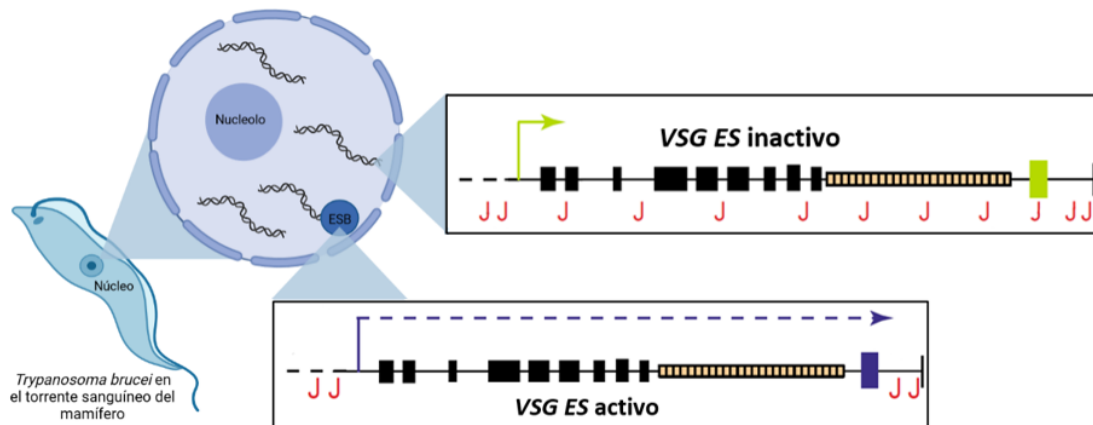


Figura 18. Identificación de cuerpo nuclear donde colocaliza la RNA polimerasa I y el VSG ES activo. El cuerpo nuclear identificado se denominó 'expression site body' (ESB). El sitio de expresión activo de la glicoproteína variable de superficie se denomina VSG ES (variable surface glycoprotein (VSG) expression sites (ES)). J es la base nucleotídica modificada (indicada en rojo). **Figura propia basada en McCulloch (2004).**

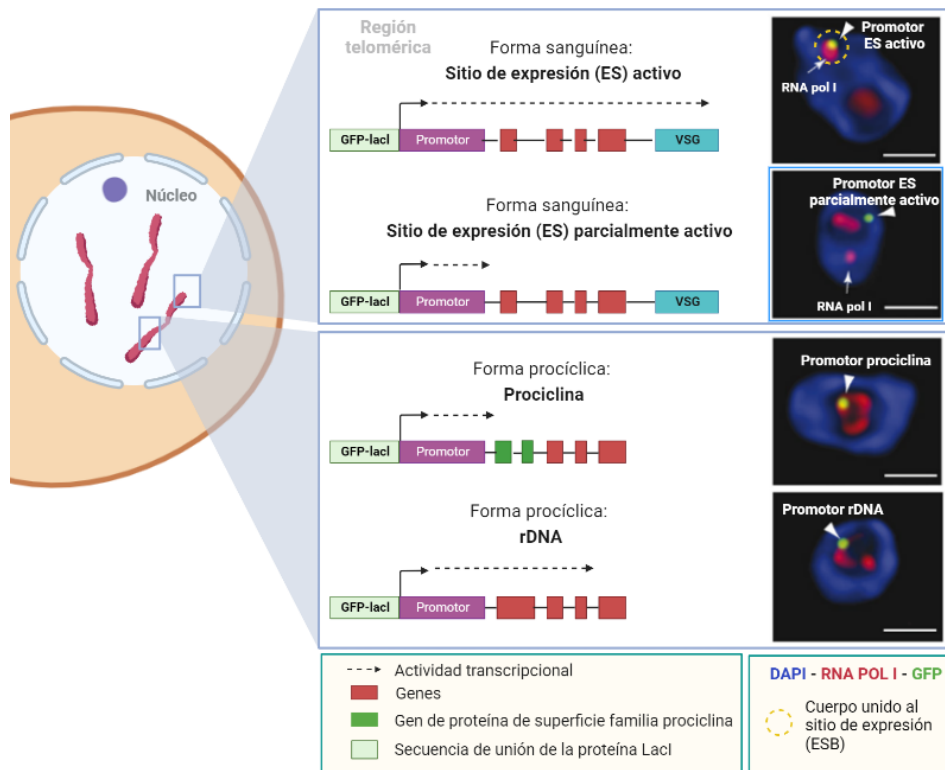


Figura 19. Análisis de inmunofluorescencia de la localización nuclear de la RNA polimerasa I y de varios promotores genéticos mediante GFP-LacI en distintas etapas del ciclo de vida de *T. brucei*. **Figura propia basada en Navarro et al. (2007).**

Teniendo en cuenta estos datos, se ha propuesto un modelo en el que la transcripción de ES estaría regulada por dos fuerzas opuestas: el silenciamiento epigenético, dirigido por los telómeros, que actúa sobre los ES silenciosos; y la regulación de la transcripción por medio del reclutamiento de la maquinaria de la RNA polimerasa I y dirigida por el promotor de ES.

No obstante, todavía quedan muchos misterios por resolver en el mecanismo responsable de este estricto control monoalélico de la expresión de las VSGs. Por otro lado, también queda por resolver cómo funciona la expresión excluyente de los genes VSG y prociclina. Así, se ha visto que los factores que activan la producción de mRNAs de prociclina concomitantemente inhiben la transcripción del gen VSG localizado en el sitio activo, y lo contrario ocurre con otros factores.

6. GENES ASOCIADOS A LOS SITIOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES VSG

Los sitios de expresión teloméricos de los genes VSG son unidades de transcripción policistrónica, que codifican para más de siete genes asociados al sitio de expresión (ESAGs) además del gen VSG.

El promotor del sitio de expresión del gen VSG, que controla su transcripción policistrónica, se localiza alrededor de 45-55 kb por encima del gen VSG (**Fig. 20**).

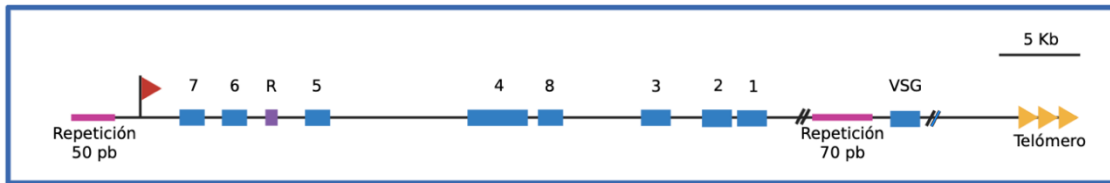


Figura 20. Mapa del sitio de expresión de un gen VSG, localizado cerca de un telómero, en *Trypanosoma brucei*. **Figura propia basada en Van der Ploeg et al. (1992).**

El procesamiento del pre-mRNA policistrónico es posible gracias al *trans-splicing*, por el que dos exones no contiguos, un mini-exón no traducido de 39-nt que presenta una estructura "cap" en el extremo 5' y el exón principal, son unidos para formar el mRNA funcional (**Fig. 21**).

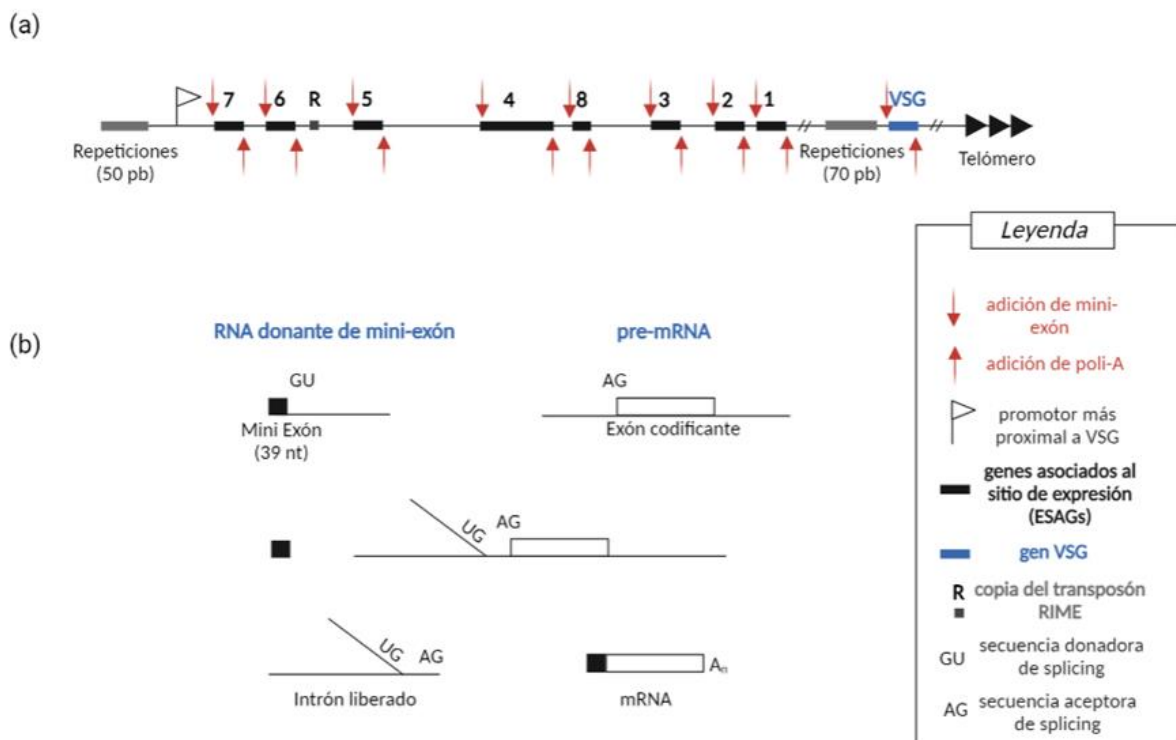


Figura 21. Maduración del sitio de expresión policistrónico del pre-mRNA por *trans-splicing* y poliadenilación. (a) Mapa físico del sitio de expresión del gen VSG en *T. brucei*. (b) Representación esquemática del mecanismo de *trans-splicing* entre el RNA donante de mini-exón y el pre-mRNA. **Figura propia basada en Van der Ploeg et al. (1992).**

Los ESAGs en estas unidades de transcripción policistrónica son genes invariantes que son específicos de sitios de expresión particulares. Los ESAGs homólogos presentes en diferentes sitios de expresión pueden diferir significativamente en sus secuencias de aminoácidos.

Hasta ahora, sólo se ha podido asignar función a algunos de estos genes. Así los productos de los genes ESAG6/7 constituyen el receptor de la transferrina, y los genes ESAG4 codifican para una adenilato ciclasa transmembrana.

6.1. Receptores inusuales

Un asunto que viene intrigando a los investigadores que trabajan en la variación antigénica es sobre la habilidad de los tripanosomas para combinar la variabilidad antigénica con la toma de macromoléculas del hospedador. Por ejemplo, los tripanosomas toman eficientemente transferrina y lipoproteínas de baja densidad (LDL) del hospedador en un proceso que tiene las características de una endocitosis mediada por receptor.

¿Cómo el tripanosoma se las ingenia para unir específicamente macromoléculas del hospedador sin ser golpeado por los anticuerpos que el hospedador genera?

Parte de la respuesta se encuentra en que los receptores están ocultos debido a su localización en una invaginación de la superficie, denominada el bolsillo flagelar. Aquí es donde ocurre la endocitosis de las macromoléculas del hospedador y donde se localiza el receptor de la transferrina. Aunque los anticuerpos pueden alcanzar este sitio, aquí son menos efectivos en la muerte del parásito, dado que ahí no pueden acceder células como los macrófagos y que podrían matar al parásito a través de la unión por el receptor Fc.

Sin embargo, la acumulación gradual de anticuerpos frente a los receptores de transferrina o de LDL en infecciones crónicas debería eventualmente causar problemas al tripanosoma. Los anticuerpos pueden estorbar al receptor o inducir la lisis mediada por complemento.

Un posible escape de estos anticuerpos se sugiere del descubrimiento reciente de que el receptor de transferrina de *T. brucei* está codificado por ESAGs (**Fig. 20**) y que el tripanosoma puede cambiar la composición del receptor mediante el cambio a otro sitio de expresión de gen VSG. La proteína de unión a transferrina, presente en el bolsillo flagelar de los tripanosomas, tiene una estructura inusual: consiste de una subunidad codificada por ESAG 6 que es anclada a membrana por GPI, y una subunidad codificada por ESAG 7 sin anclaje a membrana, pero mantenida en su lugar por su asociación con la proteína ESAG 6. Estos dos genes son transcritos en un mRNA policistrónico junto con la proteína VSG a partir del promotor de un ES activo. Sin embargo, al estar situados cercanos al promotor del ES (**Fig. 22**), hay una pequeña transcripción detectable desde ES inactivos. Aproximadamente, el 20% del mRNA de ESAG 6 procede de estos sitios de expresión. Esta posición cercana al promotor dota al parásito de una flexibilidad en la regulación de ambos genes, proporcionándole una ventaja competitiva en situaciones de escasa captación de transferrina, como puede ser el cambio a otro hospedador por medio del insecto vector. Las proteínas de estos genes comparten una homología significativa, teniendo un 20% de identidad y un 60% de homología. Sus secuencias son muy semejantes en el dominio N-terminal, donde contienen los sitios de unión de ligando, y difieren principalmente en el C-terminal, donde la proteína ESAG 6 contiene el sitio de anclaje por GPI (**Fig. 22**).

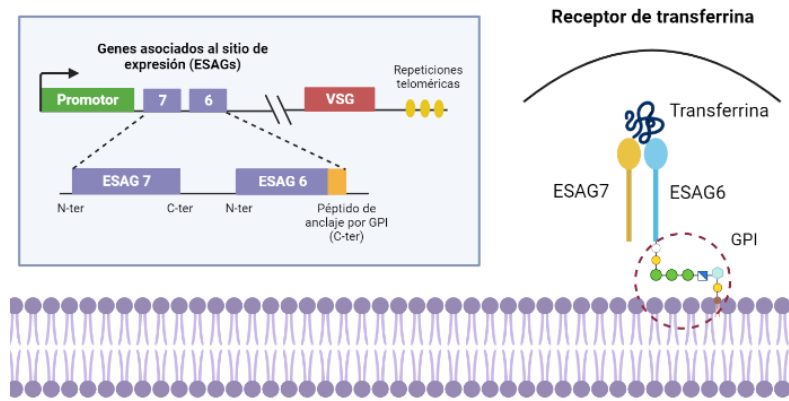


Figura 22. Representación esquemática del receptor de transferrina de *T. brucei* y las secuencias génicas ESAG 6 y 7 en el sitio de expresión. **Figura propia.**

El bolsillo flagelar también está implicado en el proceso de retirada de inmunoglobulinas de la superficie del parásito, por un mecanismo de endocitosis, que en estos parásitos es muy activa (**Fig. 23**). La endocitosis es tan activa que se recicla aproximadamente 0,2 mm³ de membrana por minuto. Mediante este proceso las inmunoglobulinas (Ig) unidas de forma específica a las VSGs son internalizadas, separadas de las VSGs y degradadas, mientras que las VSGs son recicladas. Los complejos VSG-Ig son endocitados en vesículas que contienen RABSA.d

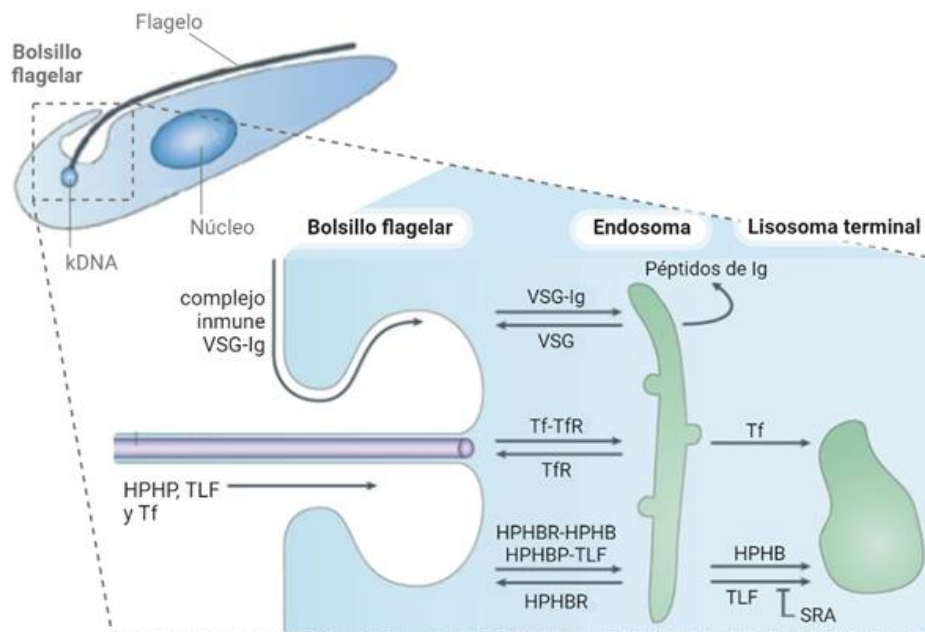


Figura 23. Sistema endosomal de *T. brucei* simplificado, en el tráfico durante la adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune. Las siglas corresponden a: inmunoglobulina (Ig); complejo haptoglobina-hemoglobina (HPHB), factor lítico tripanosomal (TLF); y transferrina (Tf); con sus correspondientes receptores (HPHBPR y TfR). **Figura modificada a partir de Field & Carrington (2009).**

6.2. Vacunas

Obviamente, el abrigo de superficie de los tripanosomas no es un buen candidato para la intervención inmune, dado el gran repertorio de moléculas del abrigo.

Sin embargo, las proteínas minoritarias requeridas para captar moléculas del exterior pudieran ser mejores candidatos. Aunque estas proteínas minoritarias son pobremente antigénicas en las infecciones crónicas naturales, podría ser posible presentarlas de una forma más activa al sistema inmunitario del hospedador, lo que favoreciera la producción de anticuerpos protectores.

De esta forma, el bolsillo flagelar, donde el tripanosoma lleva a cabo sus transacciones con el hospedador, puede convertirse en el talón de Aquiles por donde se pueda atrapar a este parásito tan resbaladizo.

En diversos estudios, se ha observado que una vacunación basada en linfocitos T podría ser útil para inclinar la balanza a favor del hospedador durante la infección por *T. brucei*. Este parásito ha desarrollado múltiples herramientas por las que evadir la respuesta humoral llevada a cabo por los linfocitos B. Entre estas herramientas, se encuentra el hecho de que las regiones más conservadas de la proteína VSG, presentes en el dominio C-terminal de esta, son de difícil acceso para los anticuerpos. Conseguir dirigir la respuesta inmunitaria hacia esas regiones podría ser crucial para acabar con el parásito, ya que son de gran importancia para la estructura de esta proteína.

Se ha determinado en ratones que, al generar una respuesta inmunitaria de manera experimental contra la proteína VSG, se generan linfocitos T que no solo reconocen las regiones hipervariables y más expuestas de esta proteína, sino que también pueden reconocer las regiones invariables. Sin embargo, durante una infección por tripanosoma, no se generan linfocitos T de memoria contra dichas regiones. Se plantea que esto podría deberse a un mecanismo de evasión del parásito consistente en bloquear la presentación a través del MHC II de péptidos pertenecientes a estas regiones. Esto lleva a hipotetizar que una vacuna eficaz podría ser aquella que induzca una respuesta T contra dichos epítomos, previa a la infección por *T. brucei*. De esta manera, dichos linfocitos T podrían activar también a los linfocitos B contra las regiones más invariables de la proteína VSG, generando una memoria celular que permitiera una respuesta inmunitaria contra el parásito.

7. EL FACTOR LÍTICO DEL SUERO HUMANO

T. b. brucei infecta a un amplio rango de mamíferos, pero es incapaz de infectar humanos porque esta subespecie es lisada por el suero normal humano (SNH). Este hecho fue puesto de manifiesto por Laveran y Mesnil en 1912. La resistencia al SNH es la principal característica que distingue a *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* de *T. b. brucei*, pues morfológicamente son idénticos; las dos primeras subespecies producen infecciones fatales en humanos, si no son tratadas. Análisis genéticos han mostrado que *T. b. brucei* and *T. b. rhodesiense* son virtualmente indistinguibles, lo que sugiere que la separación de ambas subespecies ha ocurrido muy recientemente. Sin embargo, mientras que *T. b. brucei* no sobrevive en el suero humano, *T. b. rhodesiense* es muy infeccioso para humanos donde produce una patología que evoluciona rápidamente y que va a resultar fatal si no es tratada.

El gen responsable de la resistencia al SNH en *T. b. rhodesiense* fue identificado a través de una búsqueda de cDNAs presentes en clones resistentes y ausentes en clones sensibles de esta subespecie. Así, se pudo identificar un mRNA que era expresado específicamente en los clones resistentes. Cuando se secuenció, se vio que codificaba para una proteína semejante a VSG, que se le denominó proteína SRA (*Serum Resistance Associated protein*).

Posteriormente, se encontró que este gen SRA se encontraba asociado a un determinado ES, que se denominó R-ES, ocupando una posición de "ESAG". Además, se vio que los clones resistentes tienen este sitio ES activo mientras que los sensibles lo tienen inactivo (**Fig. 24**).

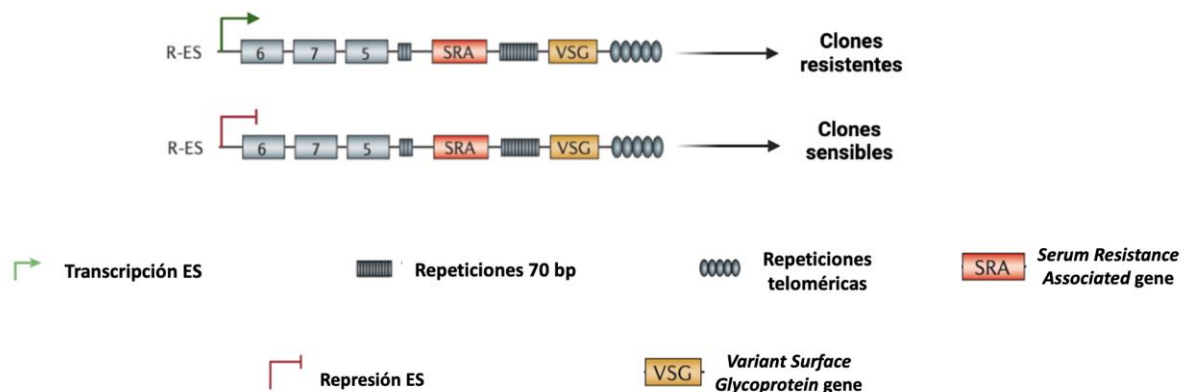


Figura 24. Mecanismos de resistencia al suero humano en *T. brucei rhodesiense*. Organización de R-ES con el gen SRA, que confiere resistencia a la lisis por el suero humano. **Figura modificada a partir de Pays et al. (2006).**

La implicación de SRA en resistencia al SNH fue demostrada cuando este gen fue utilizado para transfectar a *T. b. brucei*. Así, se encontró que un *T. b. brucei* transgénico, expresando constitutivamente SRA, es totalmente resistente al SNH. De manera anecdótica, este resultado fue reforzado por la infección accidental de una persona con la cepa *T. b. brucei*-SRA, demostrando así que el gen SRA por sí mismo es suficiente para conferir resistencia al suero humano.

Estos estudios demostraron que SRA es la proteína que permite a *T. b. rhodesiense* infectar a humanos. Sin embargo, el gen SRA no está presente en *T. b. gambiense*, lo que indica que otro gen es el responsable de la resistencia en esta subespecie (ver más adelante).

Debido a su naturaleza defectiva, la proteína SRA no es exportada a la superficie como ocurre con las VSGs sino que termina en el compartimento endosomal tardío, donde se fusionan los lisosomas.

En el proceso de identificación del factor tripanolítico, Mary Rifkin en 1978 encontró que éste estaba asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *high density lipoproteins*). Las HDLs son partículas esféricas que están compuestas por un núcleo lipídico hidrofóbico (formado por triglicéridos y ésteres de colesterol) que está rodeado por una capa hidrofílica (compuesta por fosfolípidos, colesterol y varias proteínas, conocidas globalmente como apolipoproteínas). En términos de proteínas, el principal componente de las partículas HDL es la apolipoproteína A1 (ApoA1), que captura y solubiliza colesterol libre. Estas partículas transportan moléculas insolubles en agua a distintos sitios del cuerpo,

siendo su principal función el devolver colesterol al hígado. El mayor contenido en proteínas de las partículas HDL hace que estas sean más densas que otras partículas lipoproteicas, por ejemplo, las partículas LDL (*low-density lipoprotein*) (Fig. 25).

Posteriormente, se puso de manifiesto que para que estas partículas HDL desarrollaran el proceso lítico debían ser internalizadas por el tripanosoma mediante una endocitosis mediada por receptor.

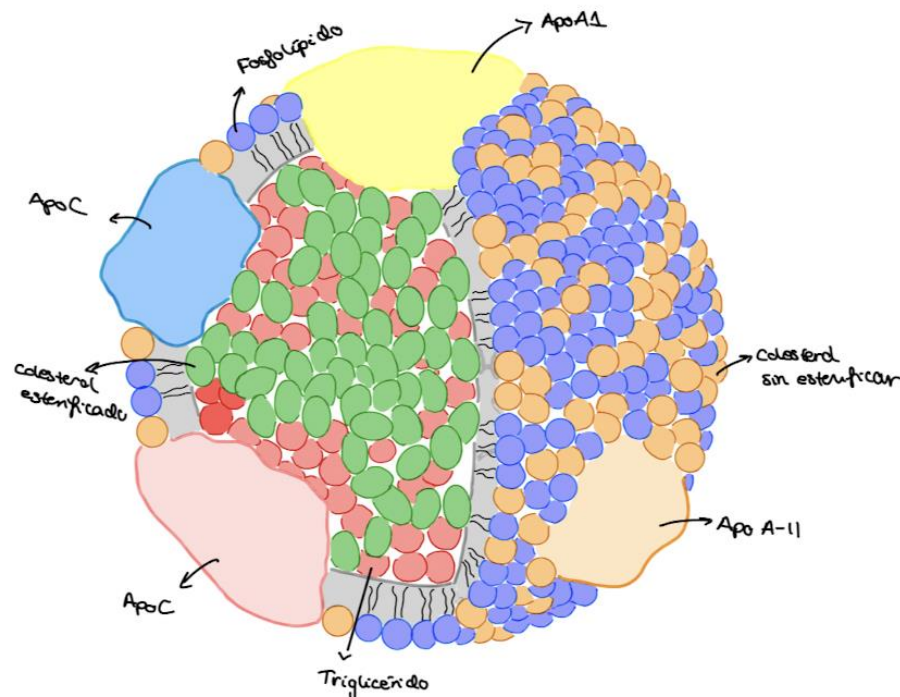


Figura 25. Estructura de una *High Density Lipoprotein* (HDL). En la imagen se señalan sus distintas partes, incluyendo las apolipoproteínas (Apo). **Figura propia basada en una imagen de *The Medical Biochemistry page* (<https://themedicalbiochemistrypage.org>).**

A continuación, se emprendió una búsqueda sistemática para intentar identificar al factor lítico entre los componentes de estas partículas HDL. Finalmente, mediante el empleo de columnas de afinidad a SRA, en el 2003 se identificó dicho factor que resultó ser la apolipoproteína L-1 (ApoL-1). Esta proteína parece encontrarse sólo en algunos primates y en humanos. A pesar de su relación evolutiva estrecha con los humanos, los chimpancés son susceptibles a la infección por tripanosomas como consecuencia de haber perdido el gen APOL1. Se ha visto que la adición de esta proteína (nativa o recombinante) a suero bovino fetal es suficiente para que se produzca la lisis de los tripanosomas sensibles al SNH.

ApoL1 es una proteína aparecida recientemente, en términos evolutivos, que pertenece a una familia de proteínas de función desconocida. Estas proteínas presentan características estructurales similares a las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl2. Pero sólo ApoL1 es secretada, y se debe a la presencia de un péptido señal N-terminal.

El papel fisiológico de ApoL-1 en humanos no ha sido establecido. Sin embargo, existe una asociación entre la sobreproducción de la proteína en el cerebro y la esquizofrenia. También algunos haplotipos se han asociado con el desarrollo de enfermedades renales crónicas. Al no conocerse la función de esta proteína, no había pistas sobre cómo podría desarrollar su efecto tripanolítico.

La primera pista vino de la observación de cierta similitud estructural entre la región N-terminal de ApoL-1 con el dominio de formación de poros de las colicinas (toxinas bacterianas que matan bacterias competidoras mediante la formación de poros iónicos en la membrana interna). Este dato llevó a realizar experimentos que demostraron la capacidad de ApoL-1 para generar poros iónicos en membranas. Este dominio formador de poros se encuentra adyacente a un dominio de asociación a membrana dependiente de pH, que predice su asociación a las partículas HDL sólo a pH neutro (indicando que la ApoL-1 estaría unida a las HDLs en la sangre, pero que se liberaría al pH de los endosomas tras la fusión a los lisosomas). Ambos dominios se requieren para que el efecto tripanolítico tenga lugar. En cambio, el dominio α -hélice C-terminal de la ApoL-1, que interacciona con SRA, es dispensable para su efecto tóxico.

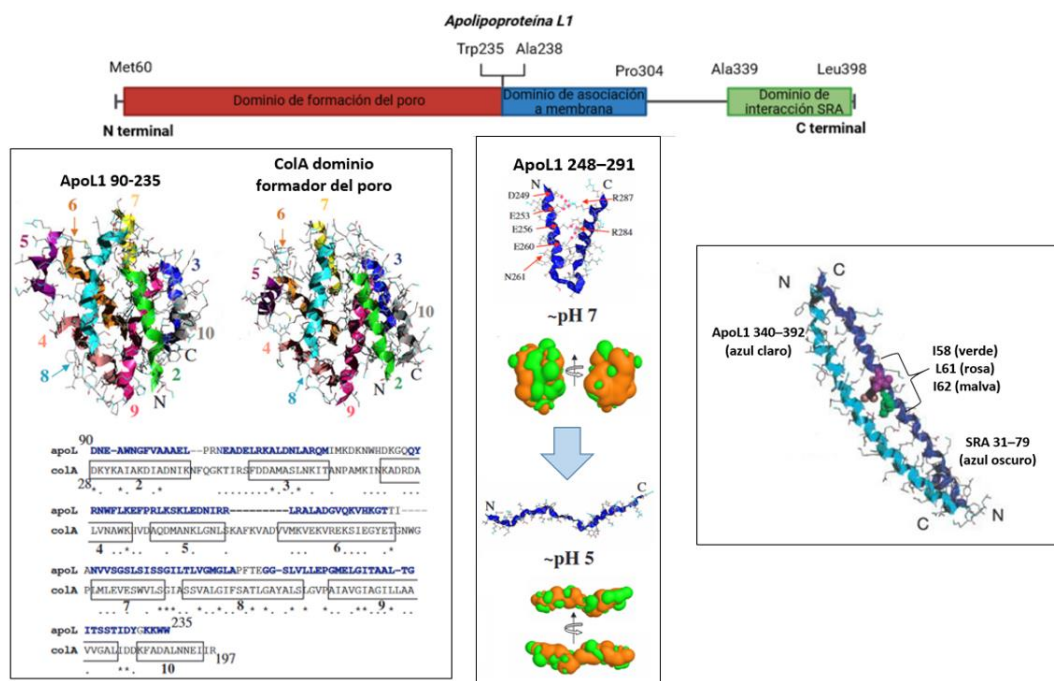


Figura 26. Modelos estructurales de los tres dominios de la apolipoproteína L1 (ApoL1). En el primer dominio, tanto ApoL1 como ColA presentan números que se corresponden con secuencias similares entre ambas (mostradas en el alineamiento de secuencia). **Figura propia basada en Pays et al. (2006) y Pérez-Morga et al. (2005).**

Teniendo en cuenta estas características, se piensa que ApoL-1 a pH bajo sufre un cambio conformacional que ocasiona su disociación de las partículas HDL y su subsiguiente inserción en la membrana liso-endosomal, donde va a formar poros.

En los tripanosomas, la proteína ApoL-1 recombinante es capaz de mimetizar completamente los efectos líticos del suero humano normal, causando una despolarización de la membrana lisosomal, seguido de un continuo crecimiento del lisosoma hasta que se produce la lisis del parásito (**Fig. 27**). El crecimiento, o hinchazón, de los lisosomas es producido por el influjo de iones Cl^- desde el citoplasma, donde la concentración de este anión es alta (106 mM). Este movimiento del ión va a reducir la concentración intracelular de Cl^- , lo que va a activar los canales de Cl^- de la membrana plasmática. Por otro lado, el movimiento de Cl^- va a ir acompañado de un influjo de agua a este compartimento, llevando a un continuo crecimiento. En un momento determinado, su tamaño va a ser tan grande que va a producir la lisis del parásito. En la **figura 28** se muestra el modelo propuesto para explicar el

mecanismo por el que SRA bloquearía el efecto lítico de la ApoL-1. La ApoL-1 unida a HDL es tomada por el parásito por endocitosis en el bolsillo flagelar, llegando a los lisosomas. El pH ácido de este compartimento dispara la actividad lítica de ApoL-1. En *T. b. rhodesiense* resistente, SRA neutraliza esta actividad mediante una interacción física con la hélice C-terminal de la toxina, impidiendo su acción y posiblemente promoviendo su degradación proteolítica.

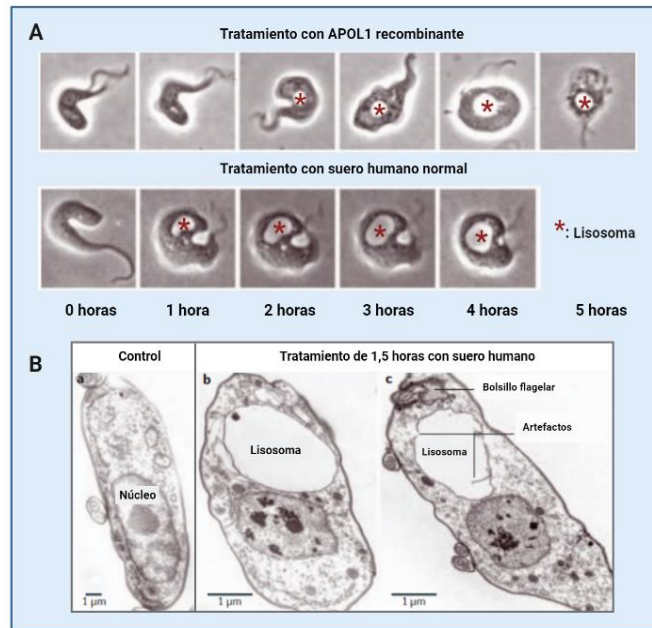


Figura 27. Micrografías que muestran la expansión del lisosoma de *T. brucei* tras distintos tratamientos con apolipoproteína L1 (APOL1) recombinante o suero normal humano. **Figura modificada a partir de Pays et al. (2006).**

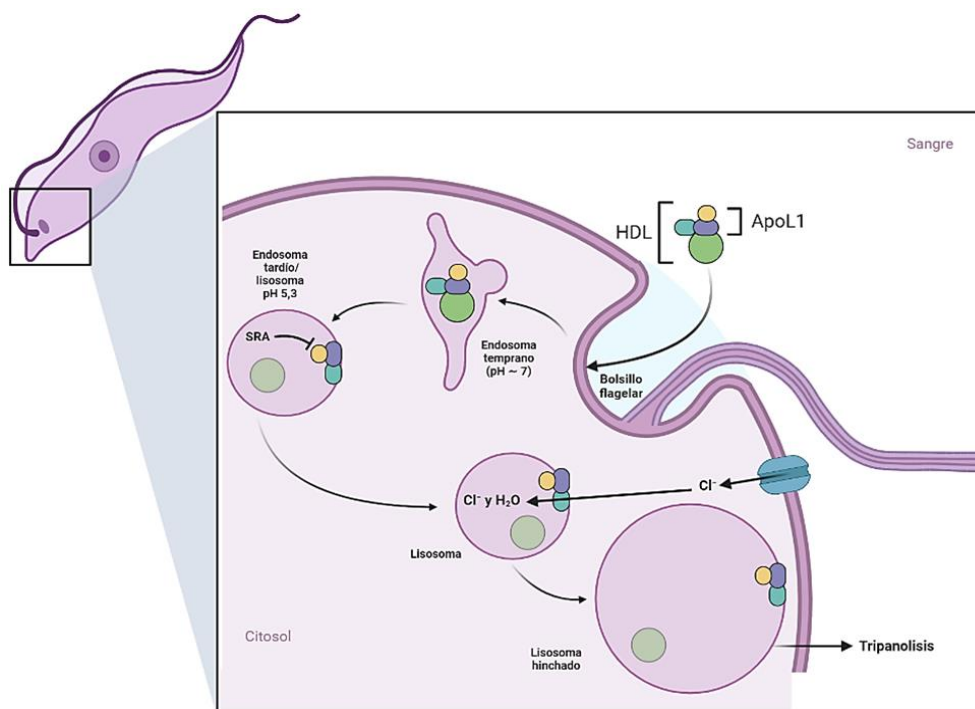


Figura 28. Mecanismo de tripanolisis por ApoL1 e inhibición por SRA. En la proteína ApoL1 se representa el dominio formador del poro (azul), de dirección a la membrana (morado) y de interacción con SRA (amarillo).

ApoL1 se encuentra asociado a partículas HDL (verde), que median la interacción con el receptor e inducción de endocitosis. **Figura propia.**

7.1. El receptor en el parásito para la entrada del factor lítico.

La **ApoL-1** se une a una subserie de partículas HDL (denominadas **HDL3**) que contienen otra proteína específica de humanos, la proteína relacionada con haptoglobina (**Hpr**), que deriva de la duplicación reciente del gen de la haptoglobina (**Hp**). Ambas moléculas (Hp y Hpr) interaccionan con la hemoglobina (**Hb**). Durante un tiempo se pensó que la proteína Hpr era el factor lítico, dado que anticuerpos anti-Hpr inhibían la lisis de los tripanosomas mediada por suero, aunque ahora se sabe que sólo es un ligando que permite la entrada del factor lítico ApoL-1.

Más recientemente se ha identificado un segundo factor lítico (TLF, *trypanosome lytic factor*), denominado **TLF2**. Está formando parte de un complejo, pobre en lípidos, que contiene IgMs naturales como principal componente, además de APOA1 y otras proteínas, entre ellas Hpr y ApoL-1 (**Fig. 29**). Ahora, el otro factor lítico, las partículas lipoproteicas HDL3 han pasado a denominarse **TLF1**.

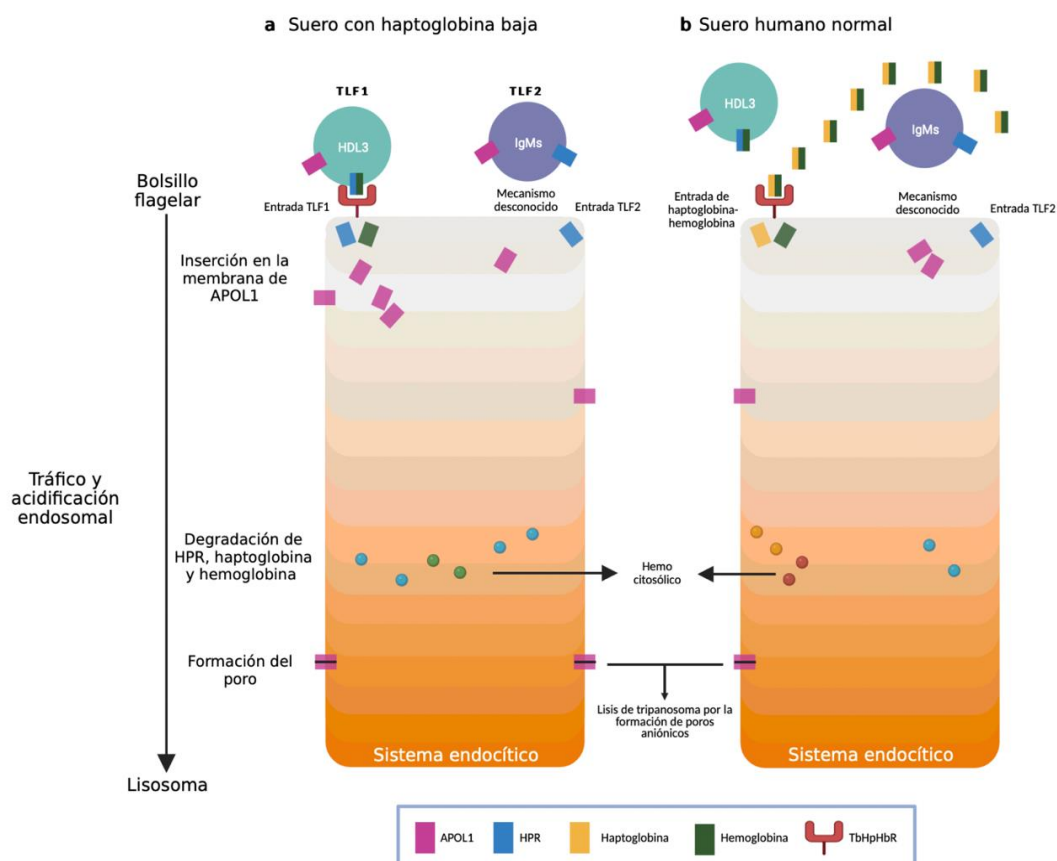


Figura 29. Modelos para la incorporación y tráfico intracelular de TLF1 y TLF2 en *Trypanosoma brucei brucei*. **Figura propia basada en Pays et al. (2014).**

T. brucei posee un receptor de superficie específico para el complejo haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb), como una forma de capturar grupos hemo de hemoproteínas. El receptor recibe el nombre de **TbHpHbR**, y es una glicoproteína anclada a la membrana a través de GPI y localizada en el bolsillo flagelar de las formas sanguíneas.

T. brucei no puede sintetizar el grupo hemo, lo que explica la necesidad de este receptor de membrana. Para competir con el eficiente sistema de recuperación de **Hp-Hb** que existe en monocitos y macrófagos (**receptor CD163**), el receptor de los tripanosomas posee una afinidad comparable a la de CD163. Además, contrario a CD163, TbHpHbR también reconoce al complejo **Hpr-Hb**. Este hecho se podría explicar por la evolución del receptor del parásito hacia una forma capaz de captar moléculas de Hb fuera de la competencia con el receptor CD163. Mientras que esto es beneficioso para el parásito cuando está en presencia de suero no humano, la existencia de TbHpHbR se convierte en un inconveniente cuando el parásito está en suero humano, dada la presencia de Hpr en las partículas HDL que contienen ApoL-1 (**Fig. 30**). Una vez internalizadas las partículas HDL, éstas se van a disociar en los endosomas acidificados y la ApoL-1 se insertará en la membrana lisosomal, donde formará poros, provocando un flujo de iones que desencadena la **lisis celular** al provocar un hinchamiento osmótico que podría dañar la membrana plasmática. Sólo aquellos clones de *T. b. rhodesiense* que expresan la proteína SRA son capaces de neutralizar el efecto tripanolítico de ApoL-1.

En este sentido, resulta curiosa la interacción que se produce entre el parásito y el hospedador (**Fig. 30**). En el medio extracelular, *T. brucei* es agredido, entre otros factores, por la producción de **radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno**, que son producidos por los macrófagos en respuesta a la infección. La entrada mediada por receptor de Hb es la única forma que tiene el parásito de adquirir grupos hemo, que serán incorporados en hemoproteínas tales como los **citocromos P450 y b5**. Estos citocromos son fundamentales para que el parásito pueda resistir al estrés oxidativo al que le somete el hospedador. Sin embargo, el parásito debe **competir con el receptor CD163** del macrófago, quien también está especializado en la captura de complejos Hp-Hb. Los complejos Hb-Hp son retirados de la circulación muy rápidamente ($t_{1/2} \sim 5$ min) por endocitosis mediada por receptor a través de CD163 presente en monocitos/macrófagos. El receptor del parásito, **TbHpHbR**, además es capaz de capturar partículas que contienen el complejo **Hpr-Hb** (presente en partículas HDL3), algo que no hace CD163. Esta ventaja del receptor del parásito, sin embargo, se convierte en una trampa, pues la presencia de ApoL-1 en estas partículas va a producir la **lisis** de *T. b. brucei*, lo que protege a los humanos de la infección por este parásito. Sin embargo, *T. b. rhodesiense* sintetiza la molécula **SRA**, que bloquea el efecto de ApoL-1, lo que permite al parásito infectar a humanos y causar la enfermedad del sueño.

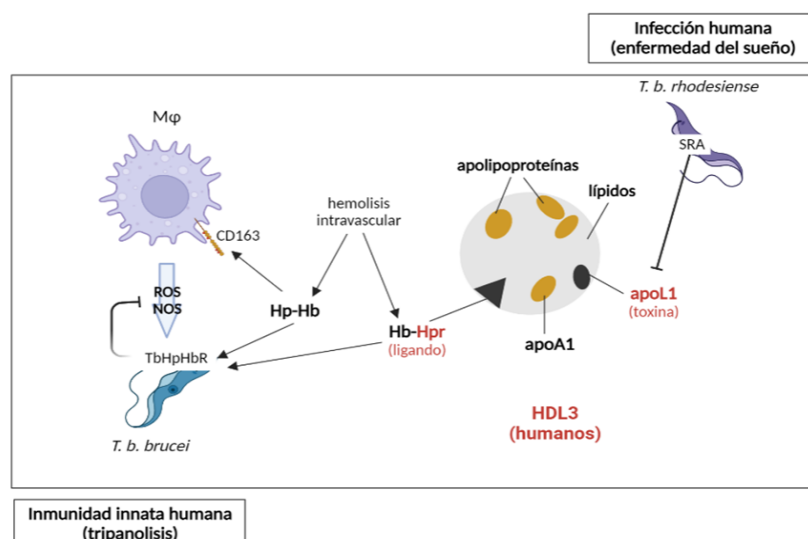


Figura 30. Diálogo molecular entre *T. brucei* y los hospedadores mamíferos. Abreviaturas: macrófagos (Mφ), especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS). **Figura propia basada en Pays et al. (2008).**

Recientemente **se ha puesto en cuestión la relevancia de TLF1 en la lisis** de los tripanosomas, por la razón de que la concentración sérica de haptoglobina excede en mucho la concentración de HPR. Se piensa que la vía de entrada de TLF1 resultaría competida con la interacción de haptoglobina-hemoglobina con el receptor TbHpHbR, que quedaría saturado. Por tanto, se piensa que en condiciones fisiológicas la lisis de los tripanosomas se debería fundamentalmente a la endocitosis de TLF2 por parte del parásito. Aunque el mecanismo de captación del TLF2 no se ha establecido, se postula que las IgMs, que tienen mucha afinidad por carbohidratos, facilitarían la interacción de TLF2 con las VSGs de la membrana, y en el proceso de reciclaje de éstas en el bolsillo flagelar, TLF2 accedería a la vía endocítica, donde ApoL1 realizaría su efecto lítico (**Fig. 30**).

Como curiosidad, cabe indicar que los **babuinos y otros primates** como son los mandriles y los mangabeyes **no son susceptibles a la infección** con *T. b. rhodesiense*. La razón parece encontrarse en que la proteína ApoL1 en estos monos presenta dos residuos de lisina en la región C-terminal (y que no se encuentran en el ortólogo de humanos) que serían los responsables de impedir la interacción entre la ApoL1 y SRA, y como resultado la ApoL1 va a destruir al parásito. Cuando la proteína ApoL1 de babuinos es expresada en ratón, los animales resultan protegidos de la infección con *T. b. rhodesiense*.

Otro hecho remarcable es la existencia de dos alelos APOL1 en la población africana, que son raros en otras poblaciones, denominados G1 y G2. Hasta hace unos años se pensaba que estos alelos se asociaban a resistencia a *T. b. rhodesiense*, pero en un estudio de 2017 se planteó un panorama más complejo. Según este estudio, el alelo G1 se asocia con infección asintomática de *T. b. gambiense*, pero no se observó protección frente a *T. b. rhodesiense*. En cuanto al alelo G2, se ha relacionado con protección frente a la infección por *T. b. rhodesiense*, pero con una mayor susceptibilidad a la enfermedad causada por *T. b. gambiense*. En definitiva, el **alelo G1 está asociado a una ventaja ante una infección por *T. b. gambiense***, y el **alelo G2 supone una ventaja frente a *T. b. rhodesiense*** (**Fig. 31**).

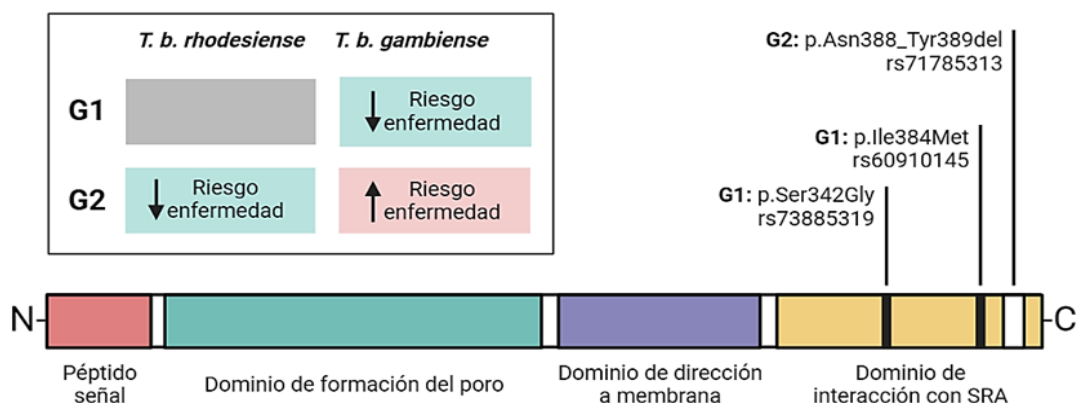


Figura 31. Alelos G1 y G2 para el gen APOL1 y su relación con el riesgo de enfermedad por infección con *T. b. rhodesiense* o *T. b. gambiense*. **Figura propia basada en Cooper et al. (2017).**

Sin embargo, la presencia de estos alelos en la población afroamericana se encuentra asociada a un **mayor riesgo de desarrollo de enfermedad renal**. Centrándonos en el alelo G2 (que protege frente a *T. b. rhodesiense*), probablemente produzca variantes ApoL1 que no se unen a la proteína SRA, y por tanto ejercen su efecto tripanolítico. Este sería un nuevo ejemplo de cómo una mutación que tiene

cierta desventaja funcional se termina fijando por selección natural en la población como consecuencia de su capacidad de evitar la infección por un patógeno.

A través de la búsqueda de variantes de VSG que pudieran ser responsables de la resistencia al suero de *T. b. gambiense* se llegó a la identificación de una proteína específica de este parásito que se ha bautizado como **TgsGP** (*T. b. gambiense-specific glycoprotein*). El gen TgSGP se encuentra en el telómero del cromosoma 2 y parece haberse generado durante un reordenamiento de DNA ocurrido en *T. b. gambiense*. La delección del gen TgSGP hace que el parásito sea sensible al suero humano, lo que demuestra que **este gen es responsable de la resistencia**.

El mecanismo de resistencia sería distinto al ejercido por SRA, dado que TgsGP no interacciona directamente con ApoL1. Se postula que TgsGP interacciona con la membrana endosomal confiriéndole **rigidez (Fig. 32)**. Esto impide el efecto tóxico de ApoL1 debido a que no permite su inserción en la membrana endosomal, o la ralentiza significativamente, **haciendo que ApoL1 sea degradado por las proteasas endosomales**.

Además, se ha encontrado que otros procesos moleculares también contribuyen a la resistencia de esta subespecie al suero. Se ha visto que existe una **menor entrada de ApoL1** a la vía endocítica como consecuencia de la inactivación de TbHpHbR como consecuencia de una mutación puntual.

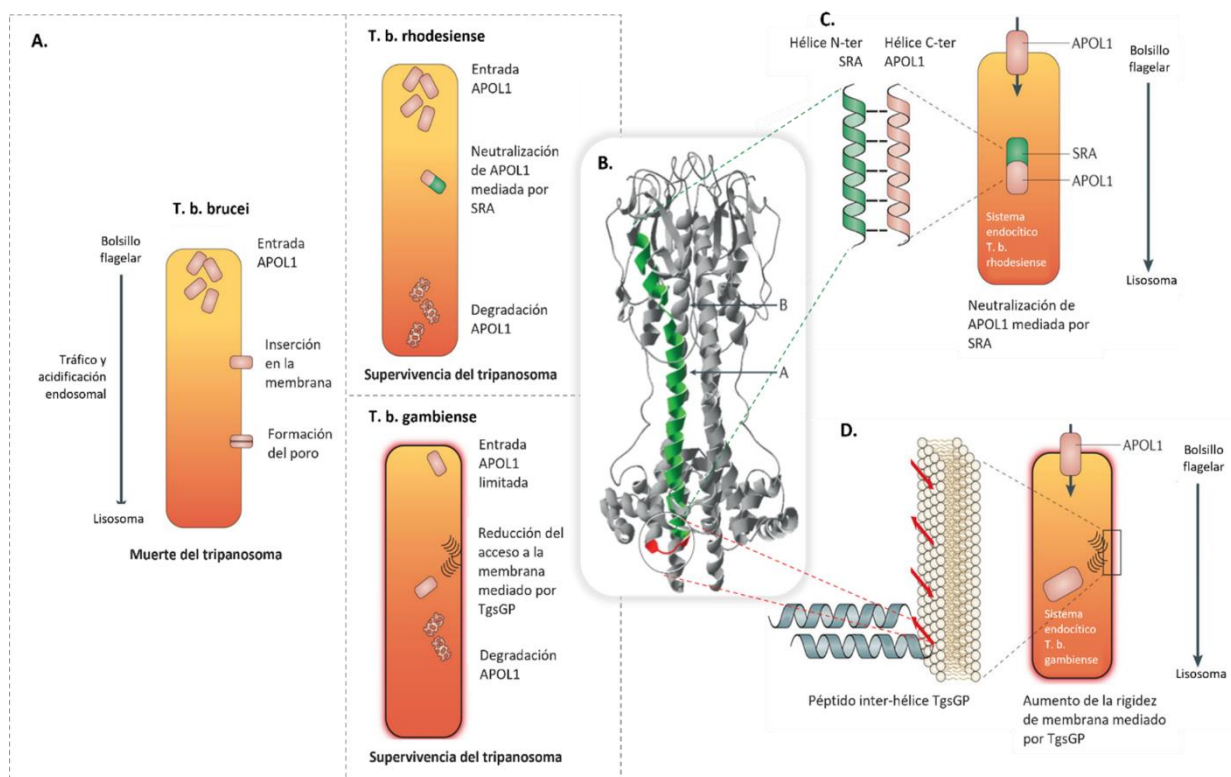


Figura 32. (A) Tráfico diferencial de APOL1 en las 3 subespecies de *T. brucei*. (B) Estructura del dominio aminoterminal de VSG, destacando las 2 hélices anfipáticas (verde y gris) y el péptido inter-hélice (rojo). (C) Neutralización de APOL1 en *T. b. rhodesiense* mediada por SRA en el sistema endocítico. (D) Neutralización de APOL1 en *T. b. gambiense* mediada por TgsGP en el sistema endocítico, que bloquea toxicidad. **Figura modificada a partir de Pays, et al. (2014).**

T. b. gambiense, de acuerdo a características patofisiológicas y genéticas, se clasifica en dos grupos. Los parásitos del **grupo 1** son más homogéneos genéticamente y todos son resistentes al suero

humano, mientras que los del **grupo 2** son genéticamente heterogéneos y presentan una expresión variable del fenotipo de resistencia al suero, que a menudo se pierde en ausencia de una presión de selección.

Ambos grupos de la subespecie *T. b. gambiense* carecen del gen SRA. Al menos, para el grupo 1, su resistencia a la lisis mediada por suero humano parece deberse a una **expresión reducida del gen TbhHbR** y a la **acumulación de mutaciones en la proteína** (Fig. 33). Ambos hechos, la existencia de un menor número de copias de este receptor en la superficie del parásito y una menor afinidad por su ligando, serían los responsables de una menor internalización de partículas HDL con Hpr/ApoL1, con lo que los parásitos evitan así ser lisados.

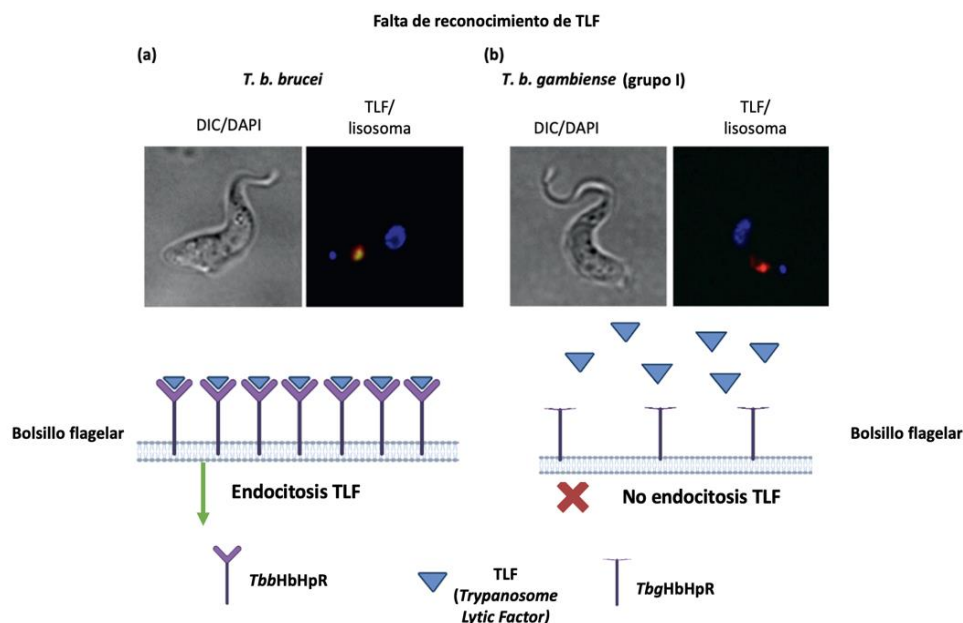


Figura 33. Inhibición de TLF por TbgHbHbR de *T. b. gambiense*. (A) Microscopía de fluorescencia mostrando la endocitosis de TLF en *T. b. brucei* y diagrama esquemático del proceso. (B) Microscopía de fluorescencia mostrando la no endocitosis de TLF en *T. b. gambiense* y diagrama esquemático del proceso. **Figura modificada a partir de Stephen et al. (2012).**

7.2. Evolución de la resistencia a *T. brucei* en los primates

La **figura 34** resume la competición evolutiva ocurrida entre *T. brucei* y los primates. Cuando la respuesta inmunitaria adaptativa se mostró insuficiente para neutralizar a unos parásitos con esta tremenda variabilidad antigénica, los humanos han desarrollado una resistencia frente a la mayoría de las especies de tripanosomas africanos a través de colocar a la proteína ApoL1 (aparecida en la línea de los primates) en las partículas TLF1 y TLF2. Estas partículas son capturadas con avidez por los parásitos, con la finalidad de captar nutrientes. Sin embargo, dos subespecies de *T. brucei* han evolucionado mecanismos que les permiten **resistir a la lisis** inducida por la proteína ApoL1. En *T. b. rhodesiense*, la proteína SRA le confirió resistencia. *T. b. gambiense*, por su lado, ha desarrollado otros mecanismos de resistencia como son la proteína TgsGP y unos receptores HbHbR con menor afinidad.

Por otro lado, la aparición de variantes de ApoL1 en babuinos y en algunas poblaciones de humanos puede interpretarse como una evolución adicional encaminada a **neutralizar el mecanismo de resistencia** asociado a la proteína SRA.

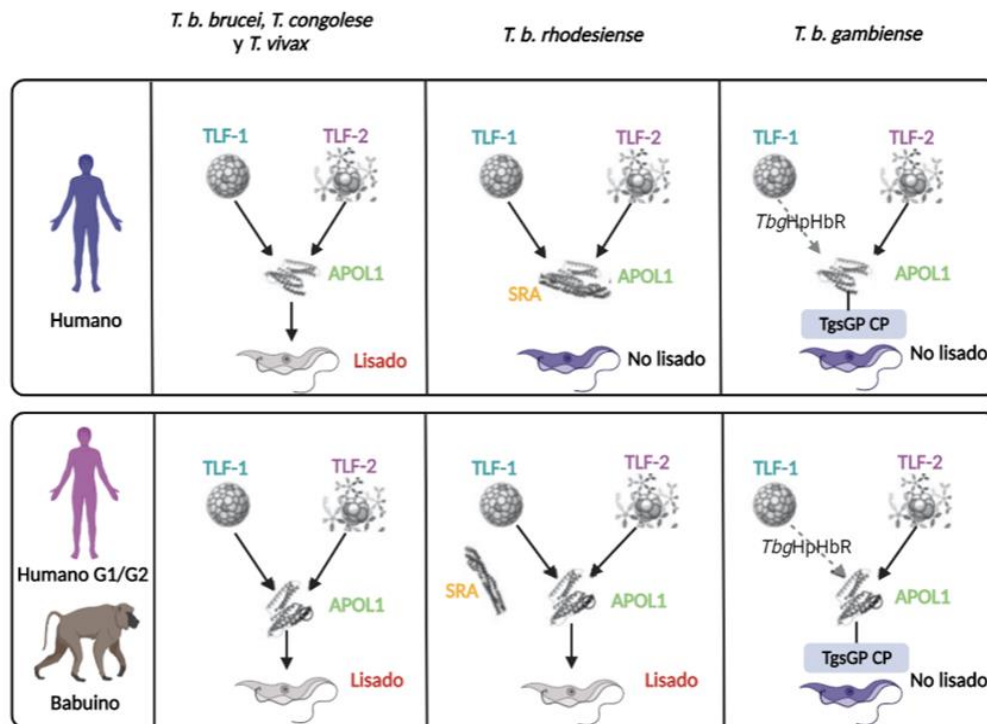


Figura 34. Resumen de la competición evolutiva (co-evolución) entre tripanosomas africanos y el huésped primate. Abreviaturas: factores tripanolíticos (TLF-1, TLF-2), glicoproteína específica de *T. b. gambiense* (TgsGP), cisteína proteasa (CP). G1 y G2 hacen referencia a haplotipos humanos. **Figura propia basada en Capewell et al. (2014).**

7.3. Utilización del factor lítico para combatir la parasitosis.

El conocimiento del mecanismo de acción de ApoL-1 ha levantado expectativas para poder desarrollar **métodos de control de la infección.**

Por un lado, se ha planteado la posibilidad de criar **ganado transgénico** para el gen ApoL-1, que sería resistente a la infección por *T. brucei*. Esto ya se ha mostrado eficaz de forma experimental en ratones.

Otra aproximación que se está siguiendo para solucionar el problema que la infección de tripanosoma supone para la cría de ganado vacuno es la de generar **vacas transgénicas que expresen la ApoL1 de babuinos.** Si se comprueba que la expresión de la proteína no induce ninguna patología en las vacas, permitiría expandir rebaños de estas vacas lo que además de permitir un más fácil acceso a los productos cárnicos y lácteos, sería también una forma de contribuir a bloquear la transmisión de estos tripanosomas a humanos.

Otro abordaje experimental ha consistido en hacer una **proteína de fusión** consistente en unir **ApoL-1** a la **región de unión de antígeno de un anticuerpo de camello** (que son monocatenarios) que va dirigido frente a una región conservada de las VSGs. La inyección de esta proteína de fusión a ratones resulta protectora frente a la infección por *T. brucei*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aksoy, S.** (2019). Tsetse peritrophic matrix influences for trypanosome transmission. *J of Insect Physiol* 118: 1-5.
- Aresta-Branco, F., Erben, E., Papavasiliou, F.N., and Stebbins, C.E.** (2019). Mechanistic Similarities between Antigenic Variation and Antibody Diversification during *Trypanosoma brucei* Infection. *Trends Parasitol* 35: 302–315.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J. and Krishna, S.** (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* 362: 1469-1480.
- Barrett, M.P. and Croft, S.L.** (2012). Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin* 104: 175-196.
- Barry, J.D.** (1997) The relative significance of mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes. *Parasitol Today* 13: 212-218.
- Borst, P. y Rudenko, G.** (1994) Antigenic variation in African trypanosomes. *Science* 264: 1872-1873.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F. and Burri, C.** (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375: 148-159.
- Buscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V. and Priotto, G.** (2017). Human African trypanosomiasis. *Lancet* 390: 2397-2409.
- Capewell, P., Cooper, A., Clucas, C., Weir, W., & Macleod, A.** (2015). A co-evolutionary arms race: Trypanosomes shaping the human genome, humans shaping the trypanosome genome. *Parasitology*, 142(S1): S108-S119.
- Cestari, I., and Stuart, K.** (2018). Transcriptional Regulation of Telomeric Expression Sites and Antigenic Variation in Trypanosomes. *Curr Genomics* 19: 119–132.
- Cooper, A., Ilboudo, H., Alibu, V. P., Ravel, S., Enyaru, J., Weir, W., Noyes, H., Capewell, P., Camara, M., Milet, J., Jamonneau, V., Camara, O., Matovu, E., Bucheton, B., & MacLeod, A.** (2017). *APOL1* renal risk variants have contrasting resistance and susceptibility associations with African trypanosomiasis. *Elife* 6: e25461.
- Deitsch, K.W., Moxon, E.R. and Wellems, T.E.** (1997) Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 281-293.
- Donelson, J. E.** (2003). Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop.* 85: 391-404.
- Donelson, J.E. y Turner, M.J.** (1985) Así cambia *Trypanosoma* su cubierta. *Investigación y Ciencia* 103: 14-22.

- Ferguson, M.** (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of Trypanosome Research. *J Cell Sci* 112: 2799-2809.
- Field, M.C. and Carrington, M.** (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 775-786.
- Gadelha, C., Holden, J.M., Allison, H.C. and Field, M.C.** (2011). Specializations in a successful parasite: what makes the bloodstream-form African trypanosome so deadly? *Mol Biochem Parasitol* 179: 51-58.
- Gao J-M, Qian Z-Y, Hide G, Lai D-H, Lun Z-R, Wu Z-D.** (2020). Human African trypanosomiasis: the current situation in endemic regions and the risks for non-endemic regions from imported cases. *Parasitology* 147(9): 922–931.
- Günzl, A., Kirkham, J. K., Nguyen, T. N., Badjatia, N., and Park, S. H.** (2015). Mono-allelic VSG expression by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*: Expression site control from both ends? *Gene*, 556(1), 68–73.
- Horn, D. and McCulloch, R.** (2010). Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 700-705.
- Imhof, S. and Roditi, I.** (2015). The Social Life of African Trypanosomes. *Trends Parasitol* 31: 490-498.
- Kariuki, CK., Stijlemans, B., Magez S.** (2019). The Trypanosomal Transferrin Receptor of *Trypanosoma Brucei*, *Trop. Med. Infect. Dis.*, 4(4): 126.
- Kennedy, P.G.E.** (2006) Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 36: 505-512.
- Lindner, A.K., Lejon, V., Chappuis, F., Seixas, J., Kazumba, L., Barrett, M.P., Mwamba, E., Erphas, O., Akl, E.A., Villanueva, G., et al.** (2020). New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. *Lancet Infect. Dis.* 20: e38–e46.
- Magez, S., Pinto Torres, J.E., Obishakin, E., Radwanska, M.** (2020) Infections With Extracellular Trypanosomes Require Control by Efficient Innate Immune Mechanisms and Can Result in the Destruction of the Mammalian Humoral Immune System. *Front. Immunol.* 11:382.
- McCulloch, R.** (2004). Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol.* 20: 117-121.
- Morrison, L.J., Marcello, L. and McCulloch, R.** (2009). Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cell. Microbiol.* 11: 1724-1734.
- Navarro, M., Peñate, X., and Landeira, D.** (2007). Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol.* 15: 263-270.

- Ooi, C.-P. and Bastin, P.** (2013) More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 71.
- P. De Koning, H.** (2020). The drugs of sleeping sickness: Their mechanisms of action and resistance, and a brief history. *Trop Med Infect.* 5 (1): 1-23.
- Pays, E.** (2005) Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol.* 21: 517-520.
- Pays, E., Vanhamme, L. and Berberof, M.** (1994) Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 25-52.
- Pays, E., Vanhamme, L. and Perez-Morga, D.** (2004). Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 369-374.
- Pays, E., and Vanhollenbeke, B.** (2008). Mutual self-defence: the trypanolytic factor story. *Microbes Infect.* 10: 985-989.
- Pays, E., Vanhollenbeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P. and Perez-Morga, D.** (2006) The trypanolytic factor of human serum. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 477-486.
- Pays, E., Vanhollenbeke, B., Uzureau, P., Lecordier, L., and Perez-Morga, D.** (2014). The molecular arms race between African trypanosomes and humans. *Nat Rev Microbiol* 12: 575-584.
- Pérez-Morga, D., Vanhollenbeke, B., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D. P., Lins, L., Homblé, F., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Poelvoorde, P., Jacquet, A., Brasseur, R., and Pays, E.** (2005). Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes. *Science*, 309(5733), 469–472.
- Stephens, N.A., Kieft, R., Macleod, A. and Hajduk, S.L.** (2012). Trypanosome resistance to human innate immunity: targeting Achilles' heel. *Trends Parasitol* 28: 539-545.
- Taylor, J.E., and Rudenko, G.** (2006). Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet.* 22: 614-620.
- Van der Ploeg, L.H.T., Gottesdiener, K. and Lee, M.G.-S.** (1992) Antigenic variation in African trypanosomes. *Trends Genet.* 8: 452-457.
- Van Leeuwen, F., Wijsman, E.R., Kieft, R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H. and Borst, P.** (1997) Localization of the modified base J in telomeric VSG gene expression sites of *Trypanosoma brucei*. *Genes & Development* 11: 3232-3241.
- Vanhollenbeke, B. and Pays, E.** (2010). The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Mol Microbiol* 76: 806-814.
- Vanhamme, L. and Pays, E.** (2004). The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness. *Int. J. Parasitol.* 34: 887-898.

Vanhamme, L., Pays, E., McCulloch, R. and Barry, J.D. (2001) An update on antigenic variation in African trypanosomes. *Trends Parasitol.* 17: 338-343.

En red:

<http://www.who.int/tdr/diseases/trypanosomiasis/> [Información sobre el ciclo de vida del parásito y la enfermedad que produce]

CDC-dpdx-trypanosomiasis, African (2019) Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention. Available at: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisafrican/> (Accessed: December 9, 2022).