microRNAs en *Echinococcus* spp.: identificación, análisis de expresión y futuras aplicaciones

microRNAs in *Echinococcus* spp.: identification, expression analysis and future applications

Marcela Cucher, Natalia Macchiaroli, Laura Kamenetzky, Laura Prada, Mara Rosenzvit.

Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM), UBA-CONICET, Paraguay 2155, Piso 13. CP 1121. Buenos Aires, Argentina. marcecucher@gmail.com

**Palabras Clave:**Echinococcus, microRNAs, hospedero intermediario

Los parásitos cestodes del género *Echinococcus* son los agentes etiológicos de la hidatidosis, una enfermedad zoonótica de distribución mundial y gran interés sanitario considerada desatendida por la OMS. Presentan un ciclo de vida indirecto en el que requieren dos hospederos para completarlo: un hospedero definitivo, representado generalmente por los cánidos y dentro del cual se desarrolla el estadío adulto del parásito y un hospedero intermediario, constituido normalmente por ungulados o roedores silvestres dependiendo de la especie infectante, dentro del cual se desarrolla el estadio larvario de quiste o metacestode. Por otro lado, el hombre puede actuar como hospedero intermediario accidental en el ciclo de la mayoría de las especies de *Echinococcus* spp. Los parásitos que componen este género presentan características biológicas variadas. Entre ellas se destacan en *E. multilocularis* el crecimiento de tipo metastásico dentro del hospedero intermediario el cual contrasta con el crecimiento unilocular de *E. granulosus* *sensu lato* (s.l.), y la capacidad de regeneración ilimitada tanto en los modelos experimentales *in vitro* como *in vivo*. Entre las distintas especies que componen *E. granulosus* s.l., se destacan la especificidad de hospedero intermediario por la cual cada especie desarrolla quistes fértiles (con protoescólices) con mayor frecuencia en determinados animales y el alto grado de plasticidad fenotípica del estadio de protoescólex. Esta última característica le permite al parásito desarrollarse en dirección estrobilar (adulto) cuando es ingerido por el hospedero definitivo o en dirección vesicular (quiste hidatídico) cuando se produce la ruptura de un quiste fértil (con protoescólices) dentro del hospedero intermediario.

Recientemente, se reportó la secuenciación y ensamblado de los genomas de *E. multilocularis* y *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) (genotipo G1) lo que permitió determinar en análisis preliminares que alrededor del 10-14% de los genomas de *Echinococcus* spp. codifican para proteínas. Sin embargo, todavía hay una gran proporción de los genomas que está comenzando a ser explorada y que muy probablemente incluye a ARNs regulatorios no codificantes, tales como los ARNs pequeños. Dentro de esta clase de ARNs no codificantes, los microRNAs (miRNAs) han sido identificados en numerosos organismos desde virus hasta eucariotas superiores y hoy en día su importancia como reguladores maestros de la expresión génica es ampliamente aceptada. Los miRNAs son ARNs no codificantes de ~22 nucleótidos de longitud que poseen la capacidad de regular la expresión de sus genes blanco, ya sea mediante la degradación de los ARN mensajeros o inhibiendo su traducción. Las evidencias de su rol en la regulación del desarrollo son múltiples y provienen de diversos organismos modelo.

Para indagar sobre los posibles mecanismos moleculares que regularían el desarrollo de *Echinococcus* spp. nos centramos en el estudio de la regulación génica mediada por miRNAs. En una primera etapa, analizamos si este mecanismo se encontraba presente en estos parásitos. Para ello, generamos una biblioteca de ARNs pequeños del estadio de protoescólex de *Echinococcus canadensis* (genotipo G7) los cuales fueron clasificados utilizando análisis bioinformáticos. Como resultado, confirmamos la presencia de miRNAs en este parásito, algunos de los cuales fueron validados mediante Northern blot. Asimismo, utilizando análisis *in silico* determinamos su presencia también en *E. multilocularis*. Algunos miRNAs presentaron un patrón de expresión diferencial de acuerdo al estadio analizado, como por ejemplo miR-125 el cual presenta un alto nivel de expresión en el estadio de protoescólex que disminuye a medida que el parásito se vesiculariza hacia el estadío de quiste. Este patrón de expresión diferencial sugiere un rol en el desarrollo del parásito.

En la segunda etapa de nuestro análisis realizamos secuenciación masiva de alto rendimiento de la fracción de ARNs pequeños para caracterizar los miRNomas de *E. multilocularis* y *E. canadensis* (genotipo G7) durante la infección del hospedero intermediario. De esta forma, validamos experimentalmente la presencia de miRNAs en *E. multilocularis* y ampliamos el repertorio de miRNAs del género *Echinococcus* de 26 a 42 secuencias. Tres de las mismas corresponderían a miRNAs específicos del género debido a que no presentan homólogos en otros organismos.

Cabe destacar que como resultado de ambos análisis se detectaron 2 miRNAs específicos de *E. granulosus* s.l.: miR-4990, el cual sólo se encuentra codificado en el genoma de referencia de *E. granulosus* s.s. y no presenta homólogos en otros organismos y miR-new-3, el cual se encuentra codificado en los genomas de *E. granulosus* s.s. y *E. multilocularis* pero sólo se detectó su expresión en las muestras de *E. canadensis* sugiriendo una expresión especie-específica.

Con respecto a los niveles de expresión de los miRNAs compartidos por ambas especies, se observaron perfiles similares para la mayoría de ellos durante la infección del hospedero intermediario, mientras que 12 miRNAs presentaron expresión diferencial. Entre los miRNAs sobreexpresados en *E. multilocularis* se encuentran bantam y dos miembros de la familia miR-2, los cuales cumplen roles antiapoptóticos en otros organismos y se condicen con la naturaleza altamente proliferativa de este parásito.

La expresión diferencial de miRNAs entre distintas especies de *Echinococcus* o distintos estadios del ciclo de vida sugiere roles importantes en el desarrollo de estos organismos. La detección de miRNAs altamente divergentes o ausentes en mamíferos podría ser utilizada en un futuro para la evaluación de nuevas herramientas de diagnóstico o tratamiento.

El estudio de las moléculas involucradas en la regulación del desarrollo de los parásitos no sólo aporta información relevante para el conocimiento de la biología básica de dichos organismos sino también para su aplicación en el mejoramiento de las técnicas diagnósticas y de tratamiento de las enfermedades que producen.

Bibliografía

Cucher M, Prada L, Mourglia-Ettlin G, Dematteis S, Camicia F, Asurmendi S, Rosenzvit M. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. Int J Parasitol 2011 Mar;41 (3-4):439-48.

Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. Nature 2013 Apr 4;496(7443):57-63.

Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. Nat Genet 2013 Oct;45(10):1168-75.