

Código de la propuesta: FCE_3_2016_1_125297

Convocatoria: Fondo Clemente Estable - 2016

Título del Proyecto (español)

Evolución de familias multigénicas codificantes para proteínas de secreción en el phylum Platyhelminthes.

Resumen publicable (español)

Los platelmintos parásitos presentan generalmente ciclos complejos, involucrando hospedadores variados, incluyendo humanos y especies ganaderas y por esto tienen gran impacto en salud humana y animal. Ejemplos de especies de este grupo son: *Echinococcus granulosus*, *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica*, entre otros. Estos organismos han sido estudiados profundamente en su biología, pero en términos relativos a su impacto faltaría mucho por hacer. Las aproximaciones genómicas y computaciones han jugado un rol fundamental para seguir la investigación a bajo costo. Actualmente existen genomas de varias especies que se encuentran disponibles y también hay información sobre el nivel de expresión de los genes. El estudio de los genomas ha confirmado que la duplicación es un mecanismo evolutivo poderoso, generador de materia prima para la adquisición de nuevas funciones en la célula. En muchos casos se ha probado que el propio aumento de copias en una familia de genes es el resultado de un proceso adaptativo. Los resultados preliminares sugieren un rol importante de la selección natural en la evolución de los ciclos complejos en muchos platelmintos y especialmente en algunas genes codificantes para proteínas de secreción exocrinas. Mediante una aproximación genómica comparativa y funcional, se propone identificar genes y familias involucrados en el proceso adaptativo en los diferentes estadios del ciclo de distintas especies a sus nichos específicos (incluyendo aspectos relacionados a sus hospedadores intermediarios y finales) y cuantificar el efecto de la selección natural operando a nivel de secuencias y sobre el proceso de duplicación en distintos linajes del phylum.

Palabras clave (Español): Cestoda, Trematoda, Parásitos, Candidatos vacunales, proteínas excretadas, péptidos antimicrobianos, Genómica Comparativa y Funcional

Título del Proyecto (inglés): Evolution of multigene families of secretory proteins coding genes in Platyhelminthes

Resumen publicable (inglés): Parasitic flatworms generally have complex cycles involving various hosts, including humans and livestock species and therefore have great impact on human and animal health. Examples of species of this group of relevance are: *Echinococcus granulosus*, *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*, among many others. These organisms have been studied in all aspects of their biology, but in relative terms of its impact there is still much to do. Genomic and computational approaches have played a key role in keeping investigation moving at low cost. Currently there are genomes of several species that are available and there is also information on the level of gene expression. The study of genomes confirmed that duplication is a powerful evolutionary mechanism, generating raw material for the acquisition of new functions in the cell. In many cases the increase of copies in a family of genes has proven to be the result of an adaptive process. Preliminary results suggest an important role of natural selection in the evolution of complex cycles in many flatworms and especially in some genes coding for proteins exocrine secretion. Through a comparative and functional genomic approach this proposal aims to identify genes and families involved in the adaptive process at different stages of the cycle of different species to their specific niches (including aspects related to intermediate and final hosts) and quantify the effect of selection natural operating at sequence level and at the process of duplication in different lineages of flatworms.

Palabras clave (inglés): Cestoda, Trematoda, Parasites, Vaccine candidates, excreted proteins, antimicrobial peptides, Comparative and Functional Genomics

DATOS GENERALES

Departamento: Montevideo

Duración: 36 meses

¿El proyecto que postula forma parte de su tesis de posgrado?: NO

Vinculación del proyecto con la tesis:

¿El responsable del proyecto es becario ANII o se encuentra postulando para una beca ANII?: NO

Esta propuesta está siendo postulada o en evaluación ante otra fuente de financiamiento: NO.

Área de Conocimiento: Ciencias Naturales y Exactas

Subárea de Conocimiento: Ciencias Biológicas

Disciplina: Bioquímica y Biología Molecular

Especialidad: Genómica Comparativa y Funcional

Sector/Núcleo de problemas y oportunidades: Salud Humana y Animal (incluye Farmacéutica)

Áreas tecnológicas a priorizar: Biotecnología

ORGANIZACIONES PARTICIPANTES

Institución: Universidad de la República/Facultad de Medicina - UDeLaR/Instituto De Higiene, Depto. Desarrollo Biotecnológico

Sector: Sector Educación Superior/Público

Rol: Institución Proponente

País de la institución: Uruguay

Institución: Universidad de la República/Facultad de Medicina - UDeLaR/Dpto. Genética

Sector: Sector Educación Superior/Público

Rol: Otras Instituciones Participantes

País de la institución: Uruguay

Institución: Universidad de la República/Facultad de Ciencias - UDeLaR/Sección Bioquímica

Sector: Sector Educación Superior/Público

Rol: Otras Instituciones Participantes

País de la institución: Uruguay

Responsable Técnico - Científico: Andrés IRIARTE ODINI

Documento: Cédula de Identidad: 33969601

Sexo: Masculino

País de Residencia:

País de la institución: Uruguay

Sector: Sector Educación Superior/Público

Institución: Universidad de la República/Facultad de Medicina - UDeLaR/Instituto De Higiene, Depto. Desarrollo Biotecnológico

Cargo actual: Profesor Adjunto

Carga horaria del trabajo (hs semanales): 30

Departamento: Montevideo

Ciudad: Montevideo

Código Postal: 11600

Dirección Laboral: Avda. Alfredo Navarro 3051

Teléfono: 24871288 **Email:** airiarteo@gmail.com

Meses de participación en el Proyecto: 36

Dedicación al Proyecto (hs semanales): 25

Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto: Responsable Científico del Proyecto. Estará a cargo de dirigir la ejecución del proyecto en términos académicos y financieros. Estará involucrado en todas las actividades del proyecto. Responsable del diseño experimental. Ejecutara los análisis bioinformáticos (análisis de genómica comparativa, filogenéticos, de evolución molecular y de datos transcriptómicos) o dirigirá a los estudiantes de grado y posgrado asociados al proyecto para realizar los mismos. Dirigirá la discusión de resultados con todos los investigadores asociados y asesores del proyecto. Coordinará las actividades de los mismos asociadas al proyecto y organizará seminarios (presenciales y semi-presenciales) para poner a punto al resto del equipo del proyecto. Redactará los manuscritos.

Consultor: Federico Guillermo HOFFMANN JAUGE

Documento: Cédula de Identidad: 17937016

Sexo: Masculino

País de Residencia:

País de la institución: Estados Unidos

Institución: Mississippi State University

Cargo actual: Assistant Professor

Carga horaria del trabajo (hs semanales): 40

PERSONAS INVOLUCRADAS

Ciudad: Starkville

Código Postal: MS 39759

Dirección Laboral: 32 Creelman St., Dorman 402

Teléfono: 6623252640 **Email:** federico.g.hoffmann@gmail.com

Meses de participación en el Proyecto: 36

Dedicación al Proyecto (hs semanales): 3

Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto: Asesor en análisis de Familias multigénicas y Genómica comparativa. (La carga horaria dedicada al proyecto es estimada y variable de acuerdo al momento de avance del mismo)

Investigador: Uriel KOZIOL ANTMANN

Documento: Cédula de Identidad: 33585744

Sexo: Masculino

País de Residencia:

País de la institución: Uruguay

Sector: Sector Educación Superior/Público

Institución: Universidad de la República/Facultad de Ciencias - UDeLaR/Sección Bioquímica

PERSONAS INVOLUCRADAS

Cargo actual: Asistente, Gr. 2

Carga horaria del trabajo (hs semanales): 40

Departamento: Montevideo

Ciudad: Montevideo

Código Postal: 11400

Dirección Laboral: Iguá 4225

Teléfono: 25258618 **Email:** ukoziol@gmail.com

Meses de participación en el Proyecto: 36

Dedicación al Proyecto (hs semanales): 5

Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto: Acceso al material biológico de Hymenolepis microstoma. Extracción de ARN de muestras biológicas para análisis transcriptómicos. Asesoramiento en el diseño experimental y discusión de resultados.

(La carga horaria dedicada al proyecto es estimada y variable de acuerdo al momento de avance del mismo).

Investigador: Estela CASTILLO PRESA

Documento: Cédula de Identidad: 31262011

Sexo: Femenino

País de Residencia:

País de la institución: Uruguay

Sector: Sector Educación Superior/Público

Institución: Universidad de la República/Facultad de Ciencias - UDeLaR/Sección Bioquímica

Cargo actual: Profesor Adjunto

Carga horaria del trabajo (hs semanales): 40

Departamento: Montevideo

Ciudad: Montevideo

Código Postal: 11400

Dirección Laboral: Iguá 4225

Teléfono: 25258618 **Email:** estelacasti@gmail.com

Meses de participación en el Proyecto: 36

Dedicación al Proyecto (hs semanales): 5

Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto: Asesoramiento en el diseño experimental. Discusión de resultados, especialmente roles de familias de genes identificadas. Redacción y corrección de manuscritos y otras comunicaciones.

(La carga horaria dedicada al proyecto es estimada y variable de acuerdo al momento de avance del mismo).

PERSONAS INVOLUCRADAS

Consultor: Francisco PEÑAGARICANO SOSA

Documento: Cédula de Identidad: 42943498

Sexo: Masculino

País de Residencia:

País de la institución: Estados Unidos

Institución: Department of Animal Sciences, University of Florida

Cargo actual: Assistant Professor

Carga horaria del trabajo (hs semanales): 40

Ciudad: Gainesville, Florida

Código Postal: 32611

Dirección Laboral: 2250 Shealy Drive

Teléfono: 3523921981 **Email:** fpenagaricano@ufl.edu

Meses de participación en el Proyecto: 36

Dedicación al Proyecto (hs semanales): 3

Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto: Asesor en diseño experimental y análisis estadístico de datos de transcriptómica (datos generados a partir de RNA-seq).

(La carga horaria dedicada al proyecto es estimada y variable de acuerdo al momento de avance del mismo).

Consultor: Anna Protasio

Documento: Cédula de Identidad: 29543479

Sexo: Femenino

País de Residencia:

País de la institución: Inglaterra

Institución: NCBS-inStem-Cambridge Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute, University of Cambridge, UK.

Cargo actual: Postdoctoral Fellow

Carga horaria del trabajo (hs semanales): 40

Ciudad: Cambridge

Código Postal: CB2 1QN, UK

Dirección Laboral: Tennis Court Road

Teléfono: 1223334088 **Email:** ap6@sanger.ac.uk

Meses de participación en el Proyecto: 36

Dedicación al Proyecto (hs semanales): 3

Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto: Asesor en la biología general y genómica de Schistosoma y helmintos en general. Acceso a datos curados de los genomas de helmintos libremente disponibles.

(La carga horaria dedicada al proyecto es estimada y variable de acuerdo al momento de avance del mismo). Se adjunta CV de Anna V. Protasio (ver en documentos adjuntos).

Investigador: José Francisco TORT ALMEIDA

Documento: Cédula de Identidad: 25427815

Sexo: Masculino

País de Residencia:

País de la institución: Uruguay

Sector: Sector Educación Superior/Público

Institución: Universidad de la República/Facultad de Medicina - UDeLaR/Dpto. Genética

Cargo actual: Prof. Agregado

Carga horaria del trabajo (hs semanales): 40

Departamento: Montevideo

Ciudad: Montevideo

PERSONAS INVOLUCRADAS

Código Postal: 11800

Dirección Laboral: Avenida General Flores 2125

Teléfono: 29243414 **Email:** jtort@fmed.edu.uy

Meses de participación en el Proyecto: 36

Dedicación al Proyecto (hs semanales): 5

Descripción de las tareas a desarrollar en el Proyecto: Acceso al material biológico de F. hepatica y diseño experimental. Discusión de resultados, redacción y corrección de manuscritos y otras comunicaciones. (La carga horaria dedicada el proyecto es estimada y variable de acuerdo al momento de avance del mismo).

Contenido Técnico

Antecedentes del Proyecto: Una familia génica la constituyen un grupo de genes que descienden de un ancestro común y que mantienen similitud de secuencia y un núcleo funcional conservado (Dayhoff, 1976). Este concepto aplica tanto a los genes que se encuentran dentro de un genoma como a aquellos que se encuentran en distintas especies. La comparación del contenido de las familias génicas entre especies permite ver cómo las presiones evolutivas moldean los procesos de adaptación y la diversidad biológica (Demuth y Hahn 2009; Rubin et al, 2000). La duplicación es un mecanismo evolutivo poderoso, permitiendo que los nuevos genes adquieran nuevas funciones, mientras que otros mantienen la función original (Ohno, 1970; Lynch y Conery, 2000). El propio aumento de copias se da en muchos casos como parte de un proceso adaptativo (Hoffmann et al, 2008; Demuth y Hahn, 2009). Las duplicaciones son un objeto común de la selección natural (Bailey y Eichler, 2006; Johnson et al, 2001; Garezarek et al, 2000; Ranson et al, 2002; McLysaght et al, 2003, Storz et al, 2008).

Los gusanos planos o platelmintos, phylum Platyhelminthes, son animales bilaterales, acelomados, sin órganos respiratorios o circulatorios especializados. En este phylum se encuentran comprendidas especies de vida libre y parásitas. La mayor parte forman parte de un grupo monofilético (Neodermata), incluyendo las clases Monogenea, Trematoda y Cestoda. El origen de los neodermados representa una de las transiciones más exitosas al parasitismo que se conoce, y resultó en una enorme radiación adaptativa. Los Cestodos y Trematodos son importantes agentes causantes de enfermedades en humanos, estimándose en millones el número de personas afectados por algunas de las enfermedades asociadas a estas especies (ej. schistosomiasis, fasciolosis o hidatidosis). Además tienen complejos ciclos de vida, con etapas maduras que viven como parásitos en el sistema digestivo o circulatorio de los peces o los vertebrados terrestres, y las etapas intermedias que infestan huéspedes secundarios. Por detalles en el ciclo de vida ver archivo adjunto pdf “Anexo I Ciclos” con los

imágenes sacadas del “Center for Disease Control and Prevention”.

La interacción con el hospedero de las distintas especies parásitas dentro de los platelmintos se da de forma característica, dependiendo de la especie, estadio, o región anatómica colonizada, entre otros aspectos. Tradicionalmente se ha visto a las proteínas de la superficie parasitaria y a las secretadas por este como los componentes “parasitarios” de la interfase con el huésped. Estos serían los blancos principales de los mecanismos de defensa del huésped, y a su vez jugadores clave en el proceso adaptativo del parásito, modulando la respuesta inmune del huésped y redirigiéndola en su beneficio. Se han descrito un importante número de proteínas de secreción que participan como inmunomoduladores, extendiendo directamente la vida del parásito, tanto en platelmintos como en otros parásitos (Schmid-Hempel 2009; Halaris et al. 2014; Monteiro et al. 2010, Nayak y Kishore 2013; Liu et al. 2009, Brindley et al. 2009, Buchmann y Lindenstrøm 2002, entre muchos otros). Entre las proteínas de secreción exocrinas podemos encontrar enzimas, toxinas, hormonas y péptidos antimicrobianos. Si bien existen excepciones, como característica general las proteínas de secreción son sintetizadas en el retículo endoplasmático (R.E.). La primera parte de la cadena, la región N terminal, contiene una secuencia señal de entre 6 o más aminoácidos hidrofóbicos, esta señal es reconocida por la partícula citosólica SRP. Esta asociación detiene la traducción y ayuda en el transporte del complejo de ARNm-ribosoma a un receptor de SRP que se encuentra en la membrana del R.E.. La secuencia señal es fundamental para la identificación bioinformática de las proteínas de secreción que siguen esta vía. Como se ha mencionado antes, existen varios estudios que evidencian el rol fundamental de estas proteínas en la interacción de los parásitos platelmintos con sus hospederos, en este sentido entender su modo de evolución y su función es entender en parte esta interacción, aquí puede estar la clave para su tratamiento. A continuación se detallan algunos ejemplos como paradigmas del rol de las familias multigénicas en estos procesos: las proteínas EgAgB, Eg95, SmVal o las Catepsinas.

En *Echinococcus granulosus* la forma adulta vive en el intestino de cánidos, pero las formas larvales que forman quistes en los tejidos de mamíferos son las

causantes de la enfermedad crónica, en efecto la larva es el agente causal de la hidatidosis. Una vez dentro del mamífero, la larva se establece y crece gradualmente en las vísceras, comúnmente en el hígado y los pulmones. Se forma entonces un quiste con una estructura muy específica, cuya capa externa es permeable a macromoléculas, las cuales son sintetizadas por las capas interiores. Una de estas moléculas producidas en mayor cantidad, es la EgAgB (Sánchez et al. 1991; Sánchez et al. 1993; Silva-Álvarez et al. 2015;), conocida simplemente como Antígeno B. Esta proteína es importante para el diagnóstico y presenta duplicaciones específicas en *Echinococcus*. Está probado que el hospedero desarrolla una fuerte respuesta de anticuerpos contra la proteína, lo que sugiere que este antígeno alcanza al hospedero (Ioppolo et al. 1996). Esta proteína forma parte de la familia de las proteínas de unión a ligandos hidrofóbicos o HLBP por sus siglas en inglés. Esta familia está presente en varios cestodes incluido especies del género *Taenia*, donde es un componente inmunodominante (Saghir et al. 2000; Lee et al. 2007). En una revisión reciente se propone que EgAgB, e incluso otros miembros de la familia, serían parte del proceso adaptativo de la especie al hospedero mamífero, jugando un rol metabólico, en el transporte de lípidos del hospedero al parásito, y como inmunomoduladores, activando o estimulando la diferenciación de células del sistema inmune innato (Riganò et al. 2001; Shepherd et al. 1991). El transporte de lípidos sería particularmente relevante si consideramos que la mayor parte de los Cestodos y los Trematodos presentan pérdida de genes de las vías de síntesis y degradación de ácidos grasos y otros lípidos, por lo que requieren obtener estos del hospedero (Zarowiecki y Berriman, 2014).

La proteína Eg95 fue identificada hace más de 20 años, es altamente inmunogénica y está involucrada en la invasión del huésped. Siete variantes similares existen en *E. granulosus*, al ser codificadas por varios genes en una familia multigénica (Chow et al. 2001; Gauci et al. 2002). Este antígeno es una proteína secretada con un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y un dominio tipo fibronectina III (Fn3) (Kyngdon et al. 2006), cuya expresión es estimulada durante de la activación oncosfera (Chow et al. 2004; Zhang et al. 2003), y se ha sugerido que estaría incluso involucrada en la adhesión celular (Bonay et al. 2002). La Eg95 en forma recombinante es la base de una vacuna efectiva para proteger contra la infección por *Echinococcus* en animales y esto ha impulsado el interés

en su investigación. Se han estudiado antígenos relacionados de *Taenia* (45W, 18K y 16K), que muestran una estructura y un patrón de expresión molecular similar a EG95 (Waterkeyn et al. 1997), demostrando niveles similares de protección contra la cisticercosis (la enfermedad causada por *Taenia solium*). La protección obtenida con los rangos de antígenos recombinantes va de 83% (Em95, los homólogos codificados en *Echinococcus multilocularis*) a 100% (Eg95; revisado en Lightowlers et al. 2003 y en Lightowlers 2006), y la respuesta inmune provocada efectivamente mata oncosferas in vitro (Woollard et al. 2000). Al momento de escribir este proyecto existe una única vacuna que sería efectiva contra la infección de *Echinococcus* tiene como blanco a los miembros de esta familia (revisado en Hewitson y Maizels 2014; Larrieu et al. 2013; Larrieu et al. 2015).

Hace varias décadas se estudia el secretoma de especies del género *Schistosoma*, se han utilizado una variedad de aproximaciones para identificar sus componentes principales y su rol en la interacción con el hospedero (ver por ejemplo Cass et al. 2007; Curwen et al. 2006; Guillou et al. 2007; Knudsen et al. 2005; Pérez-Sánchez et al. 2006). El estudio de los componentes del secretoma de las glándulas de la cabeza de la cercaria, el estado infectivo, ha permitido identificar proteínas involucradas en penetrar en la piel. Además, se han identificado chaperonas, como las HSPs (Heat shock proteins) y otras proteínas como posibles elementos inmunomoduladores o implicadas en la evasión del sistema inmune (ej. Sm16, SmVal “venom allergen-like proteins” y las isoformas de la proteasa elastasa cercarias) (Hansell et al. 2008; Curwen et al. 2006).

Finalmente otro ejemplo es el de la familia de las cistein-proteasas en trematodos, las que han sido descritas como antígenos importantes y producidos en abundancia fundamentalmente en el género *Fasciola*. Varios estudios muestran que las catepsinas L y B están amplificadas en estos parásitos y se expresan diferencialmente en el proceso de invasión (ver por ejemplo Cancela et al. 2008). Diversos estudios bioquímicos y funcionales mostraron que esta familia de proteasas cumple papeles esenciales en la invasión del huésped, en la inmuno-evasión, protección y en la nutrición parásito (Corvo et al. 2013, Cancela et al. 2008, Robinson et al. 2008, Lowther et al. 2009). El rol de estas proteasas secretadas sería importante en aspectos fundamentales de la vida del parásito, lo

que a su vez las transforman en objetivos principales para el desarrollo de nuevos tratamientos quimioterapéuticos. Al completarse el genoma de *F. hepatica* se confirmó la presencia de esta familia multigénica y su expresión diferencial a lo largo del ciclo (Cwiklisnki et al. 2015). Estudios en curso en el grupo de la Facultad de Medicina, Departamento de Genética dirigidos por el Dr. Tort muestran que la familia multigénica es aún mayor a lo que se creía, existiendo varias proteínas completas aparentemente funcionales para las que no existe evidencia de expresión en los estadios adultos e invasivos del hospedador mamífero (comunicación personal J. Tort). Se especula que estas podrían estar involucradas en la invasión del hospedero intermediario, proceso que aún no ha sido estudiado. La función biológica de otros inhibidores de proteasas es menos conocida, por ejemplo el caso de FgStefin-1, uno de los antígenos excretados más importantes en el trematode *Fasciola gigantica*.

Los ejemplos aquí presentados son sólo algunos de los posibles que involucran proteínas de secreción codificadas por familias multigénicas que juegan o podrían jugar un rol principal en la interacción entre el parásito y el hospedero. En un trabajo reciente se revisa y destaca el rol de estas proteínas y familias génicas en parásitos tripanosomátidos y protistas del grupo apicomplexa Jackson et al. (2016).

Actualmente se considera que en el caso de helmintos que parasitan el aparato digestivo, no sólo son importantes las interacciones directas con el hospedero, sino también con la microbiota (Reynolds et al. 2015; Kreisinger et al. 2015; Zaiss y Harris 2016; McSorley y Maizels 2012). Los helmintos influyen directamente e indirectamente en el microbioma del hospedador y entre los efectores directos encontramos a los péptidos antimicrobianos (AMPs). Estas proteínas de secreción excretadas en este caso serían de suma relevancia para entender esta interacción del parásito con la microbiota, sin embargo han sido poco estudiados hasta el momento en en platelmintos. Lo que se suma al hecho de que su estudio e identificación podría tener posible importancia clínica (revisado en Hancock y Sahl 2006; Marr et al. 2006; Gallo et al. 2002).

Teniendo en cuenta que: i) las proteínas de secreción excretadas se ubican en el núcleo de los procesos de interacción entre el parásito y el hospedero y que

su estudio es fundamental para entender gran parte de la interacción, ii) que las familias multigénicas representan uno de los sustratos más comunes de la selección positiva a nivel del genoma, estando involucradas a varios procesos adaptativos en varios organismos, incluso los platelmintos, iii) que las proteínas de secreción son un blanco natural para el diseño de vacunas y iv) que los platelmintos o gusanos planos tienen una importancia sobresaliente a nivel mundial en cuanto a su impacto en la salud humana y animal y por lo tanto también un impacto económico, el presente proyecto se propone estudiar la evolución y función de familias multigénicas codificantes para proteínas de secreción con roles relevantes en los distintos estadios de distintas especies dentro del phylum.

Antecedentes del Equipo de Trabajo: > Responsable:

El Dr. Iriarte trabaja en Genómica y Bioinformática desde el año 2004 cuando se integró al equipo del Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma de Facultad de Ciencias. Realizó su maestría y doctorado en genómica, haciendo uso exclusivo de herramientas bioinformáticas. Ha realizado varios cursos y actividades de perfeccionamiento en el área específica, secuenciación masiva y transcriptómica, incluyendo tres pasantías en Estados Unidos y una en Francia (ver CVuy). Ha dictado un importante número de clases de grado y posgrado relacionadas con la temática del proyecto. Realizó un posdoctorado en el IIBCE bajo el auspicio de la Dra. Elena Fabiano y el Dr. José Sotelo-Silveira, Departamentos de Bioquímica y Genómica Microbiana y Genómica, respectivamente. En el marco del posdoctorado el Dr. Iriarte a ganado un proyecto FCE que se focaliza en genómica comparativa de bacterias beta-rizobios, incluyendo análisis comparativos, filogenéticos y de evolución molecular de genes y genomas, secuenciado, ensamblado y anotación de genomas. Finalmente el Dr. Iriarte ha ganado un cargo efectivo como Prof. Adjunto en el Depto. de Desarrollo Biotecnológico, donde comenzará su proceso de consolidación como líder de grupo y línea de investigación en genómica comparativa y funcional de patógenos.

El estudio de familias multigénicas fue, junto al estudio del uso de codones sinónimos, una de las primeras líneas de investigación en la carrera del Dr. Iriarte (Koziol y Iriarte et al, 2009 [Hsp70]; Koziol et al. 2011 [Tropomiosinas]; Iriarte et al. 2012 [Glutación S-transferasas]) y continúa siendo un pilar importante en su

producción científica actual (Martínez-Rosales et al. 2015 [Proteasas]); Rodríguez et al. 2015 [esterasas y lipasas]; Green et al. 2014 [Receptores Químicos])). Comenzó trabajando en familias multigénicas del phylum Platyhelminthes, en colaboración con grupos en la Facultad de Ciencias y en el Instituto de Higiene, liderado por la Dra. Estela Castillo y el Dr. Uriel Koziol (Investigadores asociados al presente proyecto) y por la Dra. Verónica Fernández, respectivamente. Estas colaboraciones han resultado en tres publicaciones en revistas internacionales arbitradas, actualmente se trabaja en una cuarta publicación.

> Investigadores:

El Dr. José Tort tiene una importante trayectoria en parásitos platelmintos, especialmente *Fasciola hepatica*, en las áreas Biología Molecular y Genómica Funcional. Ha participado en decenas de proyectos de investigación en calidad de responsable e investigador asociado, financiados por organismos nacionales e internacionales. Es investigador del SNI Nivel II. Presenta decenas de publicaciones en revistas internacionales arbitradas, muchas de estas en las temáticas del proyecto (ver CVuy). Mantiene líneas de investigación y colaboración activa con la Dra. Estela Castillo en varios proyectos.

La Dra. Estela Castillo es experta en Biología Molecular de Platyhelminthes. Ha investigado en una variedad de especies de este phylum mecanismos asociados a la diferenciación celular y desarrollo, resultando en un importante número de publicaciones en revistas internacionales arbitradas (ver CVuy).

Participó en decenas de proyectos de investigación relacionados con la temática en calidad de responsable y como investigadora asociada. Es investigadora Nivel I del SNI.

El Dr. Koziol tiene excelente formación en Biología Molecular, Genómica y otros aspectos generales de la biología de los Platyhelminthes. Presenta una producción científica muy importante en el área específica de esta propuesta. Ha colaborado muy activamente en el diseño experimental del presente proyecto.

>Consultores internacionales:

El Dr. Federico G. Hoffmann es Profesor de la Universidad Estatal de Mississippi. Especialista en genómica evolutiva y en el estudio de familias multigénicas. Tiene más de 50 publicaciones en revistas internacionales arbitradas. Ha dirigido la pasantía del responsable del proyecto en su laboratorio.

El Dr. Francisco Peñagaricano es Profesor de la Universidad de Florida. Especialista en análisis transcriptomas, análisis de enriquecimiento funcional y su estadística asociada. Tiene una producción importante en revistas internacionales arbitradas. Es investigador asociado junto al responsable de la presente propuesta en un proyecto CSIC que hace uso del RNA-seq para identificar las bases genéticas de las propiedades del músculo en ovejas.

La Dra. Anna Protasio es investigadora posdoctoral de la Universidad de Cambridge. Especialista en Biología Computacional, Análisis de Genómica Comparativa y Funcional de Schistosoma y otros helmintos. Actualmente trabajan como coautores en un artículo vinculado a la organización del genoma de Schistosoma mansoni.

Todos los miembros de este equipo han colaborado con el responsable de la propuesta en varios proyectos, lo que se evidencia en publicaciones conjuntas (ver CVuy). Los resultados previos muestran que varias familias multigénicas secretadas se caracterizan por eventos de duplicaciones recurrentes e independientes en varios linajes, en todas las clases del phylum. Estas duplicaciones linaje-específicas que en algunos casos llegan a formar clusters de decenas de genes, parecerían ser parte de procesos adaptativos, en donde el mantenimiento de la duplicación o ciertas sustituciones a nivel de secuencias en algunos parálogos son dirigidos por la selección. Esto último podría ser el caso de la familia de las Glutación transferasas (Iriarte et al. 2012) o de la familia de las CRISP (Costabile A. et al. datos no publicados), entre otras. El grupo del José Tort ha identificado un importante conjunto de duplicaciones específicas en

la familia de las catepsinas. Estas proteínas jugarían un rol fundamental en Trematodos, en relación a la interacción con el hospedero y especialmente la invasibilidad de los distintos tejidos.

Descripción del Proyecto: Las especies parásitas y sus hospederos han co-evolucionado de forma estrecha a lo largo de miles de generaciones. Varios aspectos del genoma de los organismos parásitos “se han moldeado” en respuesta a la interacción con sus hospederos finales e intermediarios, generando complejos y diversos ciclos biológicos. En este sentido las proteínas de secreción juegan un rol clave en la interacción de los parásitos con el huésped, incluso se ha probado en varias especies del phylum que son elementos inmunomoduladores importantes. En algunos casos se ha propuesto que los productos de algunas de estas familias génicas habrían estado involucrados directamente en el proceso adaptativo (ver sección Antecedentes).

Podemos afirmar entonces que estudiar la evolución de este tipo particular de proteínas representa una oportunidad para entender la evolución del grupo y de las especies, siendo una ventana para entender la co-evolución de las mismas con su hospedero. Es esperado que las familias multigénicas jueguen un rol clave en el proceso adaptativo, puesto que, como se ha mencionado en la sección Antecedentes, suelen ser objeto de selección positiva y materia prima para la generación de nuevas funciones. Finalmente es bueno considerar que debido a su rol clave en la interacción parásito-hospedero las proteínas de secreción han sido los primeros blancos buscados para el diseño de vacunas efectivas contra los parásitos, principalmente aquellas proteínas expresadas en las primeras etapas de infección. Hasta el momento el único ejemplo de una vacuna es la proteína Eg95 efectiva contra *Echinococcus*.

El proyecto se enmarca dentro del área de la Genómica, subáreas Comparativa y Funcional. Se propone tomar una aproximación principalmente in-silico para estudiar la evolución de familias multigénicas codificantes para proteínas de secreción en el phylum Platyhelminthes, proteínas que serían importantes para entender evolución de la interacción parásito-hospedero.

La genómica es un área en gran desarrollo en todas las disciplinas dentro de la biología, y la parasitología no es la excepción. Existen importantes bases de

datos libremente disponibles y un importante avance en la anotación y curado de los genomas de especies de este phylum. A estos datos se suma información transcriptómica, es decir información sobre el nivel de expresión de los genes, en distintos estadios y/o situaciones.

La estrategia propuesta hace uso de datos genómicos y transcriptómicos para: identificar los eventos de duplicación linaje-específico, determinar miembros de las familias multigénicas con expresión estadio-específico y determinar las fuerzas responsables de los patrones evolutivos observados.

En principio los análisis transcriptómicos se limitan a estadios específicos en las especies *Hymenolepis microstoma*, *Echinococcus granulosus*, dentro de la clase cestoda y *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni*, dentro de la clase Trematoda. Ambas clases de mayor relevancia para salud humana dentro del phylum. Dentro de las familias de proteínas de secreción se dará un espacio de atención al análisis de péptidos antimicrobianos, un grupo particular de proteínas cortas de entre 12 y 50 residuos de largo con propiedades antibióticas, secretados como medio de defensa contra bacterias gram negativas y positivas, virus e incluso hongos. Para este grupo de genes se propone además de lo anterior, poner a prueba hipótesis relativo a las diferencias esperadas en cuanto a su existencia, complejidad y abundancia, así como su nivel de expresión en distintas especies y estadios dentro de especies, que se enfrentan de forma particular a medios ricos o pobres en microorganismos. Diferencias que existen incluso en especies filogenéticamente muy cercanas.

Esta propuesta se sostiene en 3 pilares: i) objetivos e hipótesis claros (ver adelante), generados a partir de resultados preliminares del grupo de trabajo, publicados y no publicados, generados en conjunto y en forma individual, ii) un grupo de trabajo sólido y diverso, cuyos integrantes son investigadores reconocidos en una o varias áreas de interés para el proyecto, sea en la biología de los organismos, las metodologías a emplear o en alguno/s de los sustentos teóricos de la propuesta y iii) el potencial demostrado de las aproximaciones genómicas para responder preguntas biológicas. La genómica comparativa tiene potencial para responder preguntas sobre la base genética de los procesos adaptativos complejos de los organismos, incluidos los organismos parásitos. En el caso de la genómica funcional, la capacidad para generar una importante cantidad de datos sobre las respuestas de la expresión del genoma en distintas

situaciones, permitiendo la identificación de los actores moleculares relevantes de un determinado proceso o momento del desarrollo.

El presente proyecto se justifica en: i) el impacto del phylum en salud humana y animal, ii) la relevancia de la categoría funcional en la interacción parásito-hospedero y en la evolución de los ciclos complejos, iii) el potencial que tienen las proteínas de secreción exocrinas como blancos vacunales y iv) su contribución directa a la formación de recursos humanos en el área de la Biología Computacional y la Genómica.

Hipótesis de Investigación : > La hipótesis central de este proyecto es que las duplicaciones y la divergencia evolutiva de genes codificantes para proteínas de secreción tuvieron un rol central en la adaptación de los diferentes estadios de platelmintos parásitos a sus hospedadores principales y secundarios.

1. Los procesos de duplicación especie- o linaje-específicos son altamente frecuentes. -Se esperan tasas de duplicación diferenciales en las ramas terminales del árbol de las especies.
2. El aumento en el número de genes y los cambios de las secuencias de las proteínas de secreción exocrinas juegan un rol importante en el proceso adaptativo de los parásitos platelmintos. -Se espera que las familias codificantes para estas familias presentan tasas de duplicación y/o divergencia significativamente más altas que otras categorías funcionales.
3. Las duplicaciones en estas familias serían relevantes en los procesos adaptativos del parásito al hospedador y serían claves en la evolución hacia ciclos complejos con múltiples estadios. -Se espera que las tasas de duplicación de estas familias sean significativamente más altas en los linajes parásitos (clase Cestoda y Trematoda) en comparación con los linajes de vida libre (clase Turbellaria).
4. Los genes de estas familias vinculados al proceso adaptativo muestran una expresión diferencial en los distintos estadios del ciclo biológico y/o patrones de evolución de secuencias dirigidos por la selección positiva (tasas $dN/dS > 1$ o aceleradas en ciertos linajes [Ver sección Diseño de investigación y

metodología]). -Se espera que, debido a las diferencias importantes entre los distintos estadios del ciclo de una especie, los genes involucradas en el proceso adaptativo a un estadio particular presenten una expresión diferencial asociada al estadio en cuestión o tasas evolutivas particulares.

5. La abundancia y la diversidad de los genes codificantes para péptidos antimicrobianos serían propiedades particulares de las especies y estarían asociados a las características y complejidad del ciclo biológico de cada una de estas. -Se espera que la expresión de estos elementos varía en los distintos estadios de los ciclos de acuerdo a la exposición del organismo a ambientes ricos en bacterias y otros microorganismos.

Diseño de investigación y metodología: El presente proyecto propone una estrategia combinada, una sección basada en análisis comparativos-evolutivos, utilizando herramientas bioinformáticas y haciendo uso de datos disponibles de genomas secuenciados del phylum. Una segunda sección propone una aproximación funcional, basada en análisis transcriptómicos de ARNm, reanalizando datos libremente disponibles de RNA-seq y generando nuevos datos de expresión en estadios no disponibles de *Hymenolepis microstoma* y *Fasciola hepatica* (ver adelante). Estas dos especies funcionan como complemento de los análisis transcriptómicos disponibles, en el caso del cestodo modelo *H. microstoma*, complementa los datos de *E. granulosus* y *E. multilocularis*. El transcriptoma del trematodo *F. hepática* complementaria el disponible de *Schistosoma mansoni*. Ambas secciones del proyecto se ejecutan en paralelo y/o intercaladas a lo largo del tiempo de ejecución del proyecto.

Una familia multigénica candidata, es decir posiblemente involucrada en el proceso adaptativo, cumpliría con al menos tres condiciones simultáneas: 1) Es una proteína excretada (secreción exocrina). Esto se comprobará mediante la identificación del péptido señal (proteínas secretadas por la vía “estándar” de secreción) y además se estudiarán proteínas excretadas que no presentan péptido señal y que han sido identificadas en la bibliografía como relevantes en alguna/s especie/s del phylum. Por ejemplo GSTs [datos no publicados de clase mu en *H. microstoma*] y Leucinaminopeptidasas [en *F. hepatica*, comunicación personal José Tort]). Resultados preliminares han identificado varias de las proteínas que se encuentran en el exterior del gusano *S. mansoni* que no contienen

el péptido señal de exportación (comunicación personal Anna V. Protasio), 2) Los miembros de la familia génica se expresan de forma diferencial en los distintos estadios en alguna de las especies. Dada la diversidad observada es esperable que las proteínas involucradas en el proceso adaptativo a los distintos estadios se expresen de forma significativamente distinta. Para esto se analizarán datos transcriptómicos. 3) Deben existir evidencias que sugieren un efecto relevante de la selección natural, ya sea operando a nivel de las secuencias, demostrado mediante aceleración de la tasa dN/dS en linajes específicos (o directamente $dN/dS > 1$), o mediante duplicaciones recurrentes específicas de ciertos linajes, lo que también sugiere un efecto de la selección operando sobre el número de copias de ciertas familias génicas. Esto es especialmente cierto para aquellas familias que están presentes, es decir que tienen al menos un miembro, en todos los organismos. Estos criterios nos permitirán identificar genes miembros de familias multigénicas involucrados en el proceso adaptativo, no todos, sino aquellos codificantes para proteínas de secreción.

>>>Genómica Comparativa:

>Obtención de Secuencias. Las secuencias del genoma completo, las secuencias codificantes para proteínas serán obtenidas de bases de datos de libre acceso: www.ncbi.nlm.nih.gov y <http://parasite.wormbase.org>, entre otras .

>Identificación de genes codificantes para proteínas de secreción, re- anotación de secuencias. Para asegurar la factibilidad se ordenarán los candidatos en base a la confianza de la predicción del péptido señal y se trabajará en un comienzo con un grupo de 40 familias multigénicas de secreción exocrinas y no más de 10 familias génicas reportadas en la bibliografía prioritarias en base a datos bibliográficos (que pueden o no tener el péptido señal). Para la identificación del

péptido señal se utilizará la última versión del programa SignalP v4.0 (Petersen et al. 2004) y se cruzaran los datos con la predicción de los programas PrediSi (Hiller et al. 2004), Signal-CF (Chou and Shen 2007), Phobius (Kall et al. 2007) y Signal-BLAST (Frank y Sippl 2008), siguiendo a Choo et al. (2009). La re- anotación manual de las familias candidatas se realizará utilizando una combinación de tblastn (Altschul et al. 1990) y Artemis (Rutherford et al. 2000).

>Identificación de péptidos microbianos. Se integrarán los resultados de los predictores AntiBP2 (Lata et al. 2010), APD3 (Wang et al. 2010), iAMP-2L (Xiao et al. 2013), DBAASP v2 (Pirtskhalava et al. 2015) y AMPA (Torrent et al. 2011).

>Identificación de genes homólogos. Los miembros homólogos de las familias multigénicas se identificarán utilizando la última versión del paquete Get_homologues (Contreras-Moreira y Vinuesa 2013) que implementa el método OrthoMCL (Li et al. 2003) y permite filtrar por identidad y cobertura mínima, además de procesar las salida mediante análisis filogenético o interrogar la matrix del pangenoma. Este estudio será complementado por programas ya desarrollados locamente basados en herramientas de la familia blast (Altschul et al. 1990), por ejemplo para detectar pseudogenes recientes. Alternativamente se identificarán homólogos utilizando la sección biomart, disponible en el sitio parasite.wormbase.org.

>Análisis filogenéticos y tasas de duplicación

El proceso para estudiar la duplicación de genes en una familia es análogo al de reconstruir filogenias entre especies, en donde además se suma la información estructural de la proteína, el contexto genómico, sus regiones reguladoras, etc. Así se integran los resultados con el fin de describir el origen, la evolución y las implicancias de dichos componentes de la familia génica en el genoma de interés. La reconstrucción filogenética será realizada mediante el

método de Máxima Verosimilitud utilizando el programa Phyml v3.1 (Guindon et al. 2010), especificando el modelo de evolución según el resultado del programa Modelgenerator (Keane et al. 2006). En Phyml se realizará la reconstrucción filogenética 5 veces distintas con agrupamientos filogenéticos randomicos alternativos y luego integrados para considerar convergencia del método. El test tipo SH (Shimodaira y Hasegawa 1999, Anisimova et al. 2011) será utilizado para conseguir el apoyo estadístico a los nodos. El programa Ranger-DTL (Mukul et al. 2012) será utilizado para el estudio masivo de familias multigénicas, mediante la identificación de eventos de duplicación y especiación con su respectivo apoyo estadístico. Las tasas de duplicación serán estimadas mediante el programa Duplidel (desarrollado por A. Fuehrer y disponible en www.cibiv.at/software) y el estudio de las familias será complementado (ej. reconstrucción de componentes ancestrales) será realizado mediante el programa Café v2.0 (De Bie et al. 2006).

>Prueba de selección positiva.

El efecto de la selección operando a nivel molecular sobre secuencias codificantes se estudiará mediante el estimador dN/dS, para esto utilizaremos el Paquete bioinformático Paml v4.9 (Yang 2007). Por favor ver archivo pdf adjunto “Anexo II Estimador dN-dS”, por una explicación del funcionamiento del estimador y la estimación sobre árboles filogenéticos.

>Análisis del contexto genómico.

Solo en el caso de algunas familias seleccionadas en base a los resultados preliminares estudiaremos el contexto genómico y avanzaremos en la determinación de los mecanismos que dieron lugar a los distintos genes componentes de las familias génicas que, incluso cuando la información obtenida de las secuencias codificantes no es clara al respecto. Los alineamientos genómicos se realizarán utilizando un algoritmo de alineamiento

progresivo implementado en el programa Mauve (Darling et al., 2010).

>>>Genómica Funcional:

>Transcriptomas libremente disponibles. Los datos transcriptómicos (generados en experimentos de secuenciación global de ARNm (RNA-seq)) serán obtenidos de bases de datos de libre acceso: planmine.mpi-cbg.de, www.ebi.ac.uk/, www.ncbi.nlm.nih.gov y también de repositorios particulares asociados a publicaciones. Se prestará especial atención a comparar datos de expresión entre experimentos de distintos estadios dentro de una misma especie, realizados en un mismo laboratorio, preferentemente asociados a una misma publicación, de esta manera se intenta reducir el denominado “batch effect”.

>Organismos y estadios del ciclo a estudiar. Se estudiará la expresión de los estadios faltantes (no disponibles actualmente) de *H. microstoma*, es decir: adulto, oncosfera y larva y de *F. hepática*, es decir estadios dentro del caracol (esporocistos y redías principalmente). También se estudiará el estado adulto de *F. hepática* como control y con propósitos comparativos. En el primer caso, los organismos y los estadios se mantienen en una colección cuyo responsable es el Dr. U. Koziol (investigador asociado al proyecto). En el segundo caso, el material biológico es parte de una colección que será provista por el Dr. J. Tort (investigador asociado al proyecto). Se analizarán tres réplicas biológicas en cada estadio.

>Extracción y secuenciación de ARN mensajero. El ARN total se extraerá y purificará mediante Kit de extracción (ej. RNeasy Mini Kit de QIAGEN). La purificación de ARN mensajeros, el armado de librerías y la secuenciación se realizará en servicio privado de secuenciación (ejemplo referencia

Macrogen, www.macrogen.com) en plataforma Illumina HiSeq 2500. HiSeq 2500 genera aproximadamente 250 millones de “paired-ends reads” por carril en una corrida (en base a experiencia previa en proyecto CSIC), utilizando 6 índices o “barcodes” por carril se obtendrían alrededor de 40 millones de reads por muestra a un costo aproximado de 600 U\$S/muestra (3700 U\$S/carril). Estos precios son fundamentales para obtener resultados significativos (un total de 4 estadíos con 3 replicas biológicas de cada estadío, 12 experimentos de secuenciación). Esta estrategia que puede ajustarse permitira obtener una cantidad de datos más que suficiente (buena profundidad) para arribar a conclusiones fehacientes y relevantes. Lamentablemente, los costos para secuenciar estas 12 muestras en nuestro país son mucho mayores en relación al servicio de Macrogen, y no puede obtenerse una financiación acorde a los logros esperados. En suma, la secuenciación en servicio privado asegura factibilidad y un correcto desarrollo del proyecto. El rendimiento de la tecnología pueden aumentar, por lo tanto los costos aquí desarrollados son estimados, es posible que al momento de ejecución del proyecto los costos bajen.

>Mapeo de lecturas o “reads”, generación de modelos génicos y estimación de los niveles de expresión. El procedimiento de secuenciación propuesto permite obtener lecturas pareadas (paired-ends reads) de 100 pb. Estas lecturas serán mapeados al genoma de referencia mediante el programa Hisat2 (Kim et al. 2015) o su alternativa clásica (Tophat2 (Kim et al. 2013)), dependiendo de la estabilidad y la compatibilidad de Hisat2 con otros programas. Los datos se normalizarán por el cálculo del FPKM (fragmentos por kilo base por millón de fragmentos mapeados) para cada gen (Mortazavi et al., 2008), utilizando como base la anotación del genoma de referencia obtenido de los sitios web antes mencionados para tener un primer dato de expresión. El mapeo de los distintos experimentos en un mismo organismo se integrarán con la anotación del genoma de referencia para generar los modelos

génicos del organismo, siguiendo el método de Trapnell y colaboradores (Trapnell et al. 2012). La definición de nuevos modelos génicos se hará con criterios muy restrictivos en virtud de las dificultades asociadas a la definición genes en estos genomas (comunicación personal Anna V. Protasio). El conteo de los reads mapeados con la versión final y mejorada de la anotación se hará utilizando herramientas de los paquetes samtools (Li et al. 2009) y htseq (Anders et al. 2014).

>Análisis de expresión diferencial.

El conteo será el archivo de entrada para el paquete edgeR (Robinson et al. 2010) o DeSeq2 (Love et al. 2014) escritos en lenguaje R (R Development Core Team, 2008). Estos programas permiten hacer los análisis comparativos e identificar a los genes diferencialmente expresados (“p” menor o igual a 0,05 y FDR (tasa de detección de falsos positivos) “q” menor o igual a 0,3) entre los distintos estadios, comparados de forma pareada o múltiple.

>Test de Enriquecimiento, Identificación de rutas o subsistemas involucrados enriquecidos.

Se utilizará el análisis GO (Gene Ontology), para detectar procesos biológicos o vías metabólicas con cambios significativos se utilizará el programa GOrse v3.2 (Young et al. 2010), que está disponible en lenguaje R. En paralelo se utilizará el servidor en línea Babelomics 5.0 (Alonso et al. 2015) y se analizarán las vías metabólicas presentes y módulos del metabolismo enriquecidos utilizando la herramienta en línea GhostKoala del KEGG (Kanehisa et al, 2016).

Equipamiento y Referencias

Equipamiento disponible actualmente para la realización del Proyecto: En los laboratorios de los investigadores asociados al proyecto, Dpto. Desarrollo Biotecnológico-Instituto de Higiene-Facultad de Medicina (A. Iriarte), Sección Bioquímica-Facultad de Ciencias (E. Castillo y U. Koziol) y Dpto. de Genética-Facultad de Medicina (J. Tort) se cuenta con todos los equipos básicos necesarios de un laboratorio de biología molecular (microcentrifugas, micropipetas, freezer, heladeras, cámara de flujo, equipos de electroforesis, transiluminador, etc) para lograr la extracción de ARN en excelentes condiciones.

El Dpto. de Desarrollo Biotecnológico (A. Iriarte) cuenta además con un equipo informático pequeño (una computadora de escritorio con procesador I7 y 1 Terabyte de almacenamiento) que puede estar disponible para análisis menores en el proyecto. A nivel edificio el Dpto. tiene espacio suficiente para albergar a los estudiantes posiblemente asociados al proyecto, para las reuniones y seminarios y también para los servidores y las fuentes estabilizadoras. El Dpto. de Genética (J. Tort) cuenta con un servidor medio (DELL T620) con 2 procesadores Xeon de 6 cores, 128 GB RAM, y 30 Tb de almacenamiento), se cuenta con este servidor para análisis cortos o puntuales puesto que habitualmente se utiliza en el marco de otros proyectos.

Referencias bibliográficas y/o técnicas del Proyecto: >>Por favor ir al archivo adjunto pdf "Anexo III Referencias bibliográficas Completas"<<

>Referencias bibliográficas seleccionadas:

Bonay, Pedro, Luis M. González, Laura Benítez, Mildred Foster, Leslie J. S. Harrison, R. Michael E. Parkhouse, and Teresa Gárate. 2002. "Genomic and

Functional Characterisation of a Secreted Antigen of Taenia Saginata Oncospheres.” Molecular and Biochemical Parasitology 121 (2): 269–73.

Cancela, Martín, Daniel Acosta, Gabriel Rinaldi, Edileusa Silva, Rosario Durán, Leda Roche, Arnaldo Zaha, Carlos Carmona, and Jose F. Tort. 2008. “A Distinctive Repertoire of Cathepsins Is Expressed by Juvenile Invasive Fasciola Hepatica.” Biochimie 90 (10): 1461–75.

Cass, Cynthia L., Jeffrey R. Johnson, Lindsay L. Califf, Tao Xu, Hector J. Hernandez, Miguel J. Stadecker, John R. Yates 3rd, and David L. Williams. 2007. “Proteomic Analysis of Schistosoma Mansoni Egg Secretions.” Molecular and Biochemical Parasitology 155 (2): 84–93.

Chow, C., C. G. Gauci, A. F. Cowman, and M. W. Lightowlers. 2001. “A Gene Family Expressing a Host-Protective Antigen of Echinococcus Granulosus.” Molecular and Biochemical Parasitology 118 (1): 83–88.

Corvo, Ileana, Anthony J. O'Donoghue, Lucía Pastro, Natalia Pi-Denis, Alegra Eroy-Reveles, Leda Roche, James H. McKerrow, et al. 2013. “Dissecting the Active Site of the Collagenolytic Cathepsin L3 Protease of the Invasive Stage of Fasciola Hepatica.” PLoS Neglected Tropical Diseases 7 (7): e2269.

Curwen, Rachel S., Peter D. Ashton, Shobana Sundaralingam, and R. Alan Wilson. 2006. “Identification of Novel Proteases and Immunomodulators in the Secretions of Schistosome Cercariae That Facilitate Host Entry.” Molecular & Cellular Proteomics: MCP 5 (5): 835–44.

Cwiklinski, Krystyna, John Pius Dalton, Philippe J. Dufresne, James La Course, Diana JI Williams, Jane Hodgkinson, and Steve Paterson. 2015. “The Fasciola Hepatica Genome: Gene Duplication and Polymorphism Reveals Adaptation to the Host Environment and the Capacity for Rapid Evolution.” Genome Biology 16 (April): 71.

Cwiklinski, Krystyna, Eduardo de la Torre-Escudero, Maria Trelis, Dolores Bernal, Philippe J. Dufresne, Gerard P. Brennan, Sandra O'Neill, et al. 2015. “The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, Fasciola Hepatica: Biogenesis Pathways and Cargo Molecules Involved in Parasite Pathogenesis.” Molecular & Cellular Proteomics: MCP 14 (12): 3258–73.

- Demuth, Jeffery P., and Matthew W. Hahn. 2009. "The Life and Death of Gene Families." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 31 (1): 29–39.
- Gallo, Richard L., Masamoto Murakami, Takaaki Ohtake, and Mohamed Zaiou. 2002. "Biology and Clinical Relevance of Naturally Occurring Antimicrobial Peptides." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (6): 823–31.
- Garczarek, L., W. R. Hess, J. Holtzendorff, G. W. van der Staay, and F. Partensky. 2000. "Multiplication of Antenna Genes as a Major Adaptation to Low Light in a Marine Prokaryote." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (8): 4098–4101.
- Gauci, Charles, Michael Merli, Volker Muller, Conan Chow, Kinpei Yagi, Ute Mackenstedt, and Marshall W. Lightowlers. 2002. "Molecular Cloning of a Vaccine Antigen against Infection with the Larval Stage of *Echinococcus Multilocularis*." *Infection and Immunity* 70 (7): 3969–72.
- Green, Richard E., Edward L. Braun, Joel Armstrong, Dent Earl, Ngan Nguyen, Glenn Hickey, Michael W. Vandewege, et al. 2014. "Three Crocodilian Genomes Reveal Ancestral Patterns of Evolution among Archosaurs." *Science* 346 (6215): 1254449.
- Guillou, François, Emmanuel Roger, Yves Moné, Anne Rognon, Christoph Grunau, André Théron, Guillaume Mitta, Christine Coustau, and Benjamin E. F. Gourbal. 2007. "Excretory-Secretory Proteome of Larval *Schistosoma Mansoni* and *Echinostoma Caproni*, Two Parasites of *Biomphalaria Glabrata*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 155 (1): 45–56.
- Haçarız, Orçun, Ahmet Tarık Baykal, Mete Akgün, Pınar Kavak, Mahmut Şamil Sağıroğlu, and Gearóid Patrick Sayers. 2014. "Generating a Detailed Protein Profile of *Fasciola Hepatica* during the Chronic Stage of Infection in Cattle." *Proteomics* 14 (12): 1519–30.
- Hancock, Robert E. W., and Hans-Georg Sahl. 2006. "Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies." *Nature Biotechnology* 24 (12): 1551–57.

- Hansell, Elizabeth, Simon Braschi, Katalin F. Medzihradzsky, Mohammed Sajid, Moumita Debnath, Jessica Ingram, K. C. Lim, and James H. McKerrow. 2008. "Proteomic Analysis of Skin Invasion by Blood Fluke Larvae." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2 (7): e262.
- Hewitson, James P., and Rick M. Maizels. 2014. "Vaccination against Helminth Parasite Infections." *Expert Review of Vaccines* 13 (4): 473–87.
- Hoffmann, Federico G., Juan C. Opazo, and Jay F. Storz. 2008. "Rapid Rates of Lineage-Specific Gene Duplication and Deletion in the Alpha-Globin Gene Family." *Molecular Biology and Evolution* 25 (3): 591–602.
- Ioppolo, S., S. Notargiacomo, E. Profumo, C. Franchi, E. Ortona, R. Rigano, and A. Siracusano. 1996. "Immunological Responses to Antigen B from *Echinococcus Granulosus* Cyst Fluid in Hydatid Patients." *Parasite Immunology* 18 (11): 571–78.
- Iriarte, Andrés, Paula Arbildi, Silvana La-Rocca, Héctor Musto, and Verónica Fernández. 2012. "Identification of Novel Glutathione Transferases in *Echinococcus Granulosus*. An Evolutionary Perspective." *Acta Tropica* 123 (3): 208–16.
- Jackson, Andrew P. 2016. "Gene Family Phylogeny and the Evolution of Parasite Cell Surfaces." *Molecular and Biochemical Parasitology*, March. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.03.007.
- Jackson, Andrew P., Thomas D. Otto, Martin Aslett, Stuart D. Armstrong, Frederic Bringaud, Alexander Schlacht, Catherine Hartley, et al. 2016. "Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism." *Current Biology: CB* 26 (2): 161–72.
- Johnson, M. E., L. Viggiano, J. A. Bailey, M. Abdul-Rauf, G. Goodwin, M. Rocchi, and E. E. Eichler. 2001. "Positive Selection of a Gene Family during the Emergence of Humans and African Apes." *Nature* 413 (6855): 514–19.
- Knudsen, Giselle M., Katalin F. Medzihradzsky, Kee-Chong Lim, Elizabeth Hansell, and James H. McKerrow. 2005. "Proteomic Analysis of *Schistosoma Mansoni* Cercarial Secretions." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 4 (12): 1862–75.

- Koziol, Uriel, Alicia Costábile, María Fernanda Domínguez, Andrés Iriarte, Gabriela Alvite, Alejandra Kun, and Estela Castillo. 2011. "Developmental Expression of High Molecular Weight Tropomyosin Isoforms in Mesocostoides Corti." *Molecular and Biochemical Parasitology* 175 (2): 181–91.
- Koziol, Uriel, Andrés Iriarte, Estela Castillo, Jeannette Soto, Gonzalo Bello, Adriana Cajaville, Leda Roche, and Mónica Marín. 2009. "Characterization of a Putative hsp70 Pseudogene Transcribed in Protoscoleces and Adult Worms of Echinococcus Granulosus." *Gene* 443 (1-2): 1–11.
- Kreisinger, Jakub, Géraldine Bastien, Heidi C. Hauffe, Julian Marchesi, and Sarah E. Perkins. 2015. "Interactions between Multiple Helminths and the Gut Microbiota in Wild Rodents." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370 (1675). doi:10.1098/rstb.2014.0295.
- Kyngdon, C. T., C. G. Gauci, A. E. Gonzalez, A. Flisser, A. Zoli, A. J. Read, J. Martínez-Ocaña, R. A. Strugnell, and M. W. Lightowlers. 2006. "Antibody Responses and Epitope Specificities to the Taenia Solium Cysticercosis Vaccines TSOL18 and TSOL45-1A." *Parasite Immunology* 28 (5): 191–99.
- Larrieu, Edmundo, Guillermo Mujica, Charles G. Gauci, Katherina Vizcaychipi, Marcos Seleiman, Eduardo Herrero, José Luis Labanchi, et al. 2015. "Pilot Field Trial of the EG95 Vaccine Against Ovine Cystic Echinococcosis in Rio Negro, Argentina: Second Study of Impact." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (10): e0004134.
- Lee, Eung-Goo, Seon-Hee Kim, Young-An Bae, Joon-Yong Chung, Myungkoo Suh, Byoung-Kuk Na, Tong-Soo Kim, Insug Kang, Liang Ma, and Yoon Kong. 2007. "A Hydrophobic Ligand-Binding Protein of the Taenia Solium Metacestode Mediates Uptake of the Host Lipid: Implication for the Maintenance of Parasitic Cellular Homeostasis." *Proteomics* 7 (21): 4016–30.
- Lightowlers, Marshall W. 2006. "Vaccines against Cysticercosis and Hydatidosis: Foundations in Taeniid Cestode Immunology." *Parasitology International* 55 Suppl: S39–43.
- Liu, Feng, Shu-Jian Cui, Wei Hu, Zheng Feng, Zhi-Qin Wang, and Ze-Guang Han. 2009. "Excretory/secretory Proteome of the Adult Developmental Stage of

Human Blood Fluke, *Schistosoma Japonicum*.” *Molecular & Cellular Proteomics*: MCP 8 (6): 1236–51.

Lowther, Jonathan, Mark W. Robinson, Sheila M. Donnelly, Weibo Xu, Colin M. Stack, Jacqueline M. Matthews, and John P. Dalton. 2009. “The Importance of pH in Regulating the Function of the *Fasciola Hepatica* Cathepsin L1 Cysteine Protease.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (1): e369.

Lynch, M., and J. S. Conery. 2000. “The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes.” *Science* 290 (5494): 1151–55.

Marr, Alexandra K., William J. Gooderham, and Robert Ew Hancock. 2006. “Antibacterial Peptides for Therapeutic Use: Obstacles and Realistic Outlook.” *Current Opinion in Pharmacology* 6 (5): 468–72.

McLysaght, Aoife, Pierre F. Baldi, and Brandon S. Gaut. 2003. “Extensive Gene Gain Associated with Adaptive Evolution of Poxviruses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 15655–60.

McSorley, Henry J., and Rick M. Maizels. 2012. “Helminth Infections and Host Immune Regulation.” *Clinical Microbiology Reviews* 25 (4): 585–608.

Monteiro, Karina M., Marcos O. de Carvalho, Arnaldo Zaha, and Henrique B. Ferreira. 2010. “Proteomic Analysis of the *Echinococcus Granulosus* Metacestode during Infection of Its Intermediate Host.” *Proteomics* 10 (10): 1985–99.

Ohno, Susumu, and Ohno Susumu. 1970. “Whence Comes Man?” In *Evolution by Gene Duplication*, 139–46.

Pérez-Sánchez, Ricardo, Alicia Ramajo-Hernández, Vicente Ramajo-Martín, and Ana Oleaga. 2006. “Proteomic Analysis of the Tegument and Excretory-Secretory Products of Adult *Schistosoma Bovis* Worms.” *Proteomics* 6 Suppl 1 (April): S226–36.

Ranson, Hilary, Charles Claudianos, Federica Orrelli, Christelle Abgrall, Janet Hemingway, Maria V. Sharakhova, Maria F. Unger, Frank H. Collins, and René Feyereisen. 2002. “Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance.” *Science* 298 (5591): 179–81.

Reynolds, Lisa A., B. Brett Finlay, and Rick M. Maizels. 2015. “Cohabitation in the Intestine: Interactions among Helminth Parasites, Bacterial Microbiota, and

Host Immunity.” *Journal of Immunology* 195 (9): 4059–66.

Riganò, R., E. Profumo, F. Bruschi, G. Carulli, A. Azzarà, S. Ioppolo, B. Buttari, et al. 2001. “Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus Granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses.” *Infection and Immunity* 69 (1): 288–96.

Robinson, Mark W., John P. Dalton, and Sheila Donnelly. 2008. “Helminth Pathogen Cathepsin Proteases: It’s a Family Affair.” *Trends in Biochemical Sciences* 33 (12): 601–8.

Rodríguez, María Cecilia, Inés Loaces, Vanesa Amarelle, Daniella Senatore, Andrés Iriarte, Elena Fabiano, and Francisco Noya. 2015. “Est10: A Novel Alkaline Esterase Isolated from Bovine Rumen Belonging to the New Family XV of Lipolytic Enzymes.” *PloS One* 10 (5): e0126651.

Rubin, G. M., M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. Gabor Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, et al. 2000. “Comparative Genomics of the Eukaryotes.” *Science* 287 (5461): 2204–15.

Saghir, N., P. J. Conde, P. M. Brophy, and J. Barrett. 2000. “A New Diagnostic Tool for Neurocysticercosis Is a Member of a Cestode Specific Hydrophobic Ligand Binding Protein Family.” *FEBS Letters* 487 (2): 181–84.

Sánchez, F., J. Garcia, F. March, N. Cardeñosa, P. Coll, C. Muñoz, C. Auladell, and G. Prats. 1993. “Ultrastructural Localization of Major Hydatid Fluid Antigens in Brood Capsules and Protoscoleces of *Echinococcus Granulosus* of Human Origin.” *Parasite Immunology* 15 (8): 441–47.

Sánchez, F., F. March, M. Mercader, P. Coll, C. Muñoz, and G. Prats. 1991. “Immunochemical Localization of Major Hydatid Fluid Antigens in Protoscoleces and Cysts of *Echinococcus Granulosus* from Human Origin.” *Parasite Immunology* 13 (6): 583–92.

Schmid-Hempel, Paul. 2009. “Parasites--the New Frontier: Celebrating Darwin 200.” *Biology Letters* 5 (5): 625–27.

Shepherd, J. C., A. Aitken, and D. P. McManus. 1991. “A Protein Secreted in Vivo by *Echinococcus Granulosus* Inhibits Elastase Activity and Neutrophil

Chemotaxis.” Molecular and Biochemical Parasitology 44 (1): 81–90.

Silva-Álvarez, Valeria, Ana Maite Folle, Ana Lía Ramos, Fernando Zamarreño, Marcelo D. Costabel, Eduardo García-Zepeda, Gustavo Salinas, Betina Córscico, and Ana María Ferreira. 2015. “Echinococcus Granulosus Antigen B: A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the Host-Parasite Interface.” Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids 93 (February): 17–23.

Sripa, Banchob, Eimorn Mairiang, Bandit Thinkhamrop, Thewarach Laha, Sasithorn Kaewkes, Paiboon Sithithaworn, Smarn Tessana, Alex Loukas, Paul J. Brindley, and Jeffrey M. Bethony. 2009. “Advanced Periductal Fibrosis from Infection with the Carcinogenic Human Liver Fluke Opisthorchis Viverrini Correlates with Elevated Levels of Interleukin-6.” Hepatology 50 (4): 1273–81.

Waterkeyn, J., C. Gauci, A. Cowman, and M. Lightowlers. 1997. “Sequence Analysis of a Gene Family Encoding Taenia Ovis Vaccine Antigens Expressed during Embryogenesis of Eggs.” Molecular and Biochemical Parasitology 86 (1): 75–84.

Woollard, D. J., D. D. Heath, and M. W. Lightowlers. 2000. “Assessment of Protective Immune Responses against Hydatid Disease in Sheep by Immunization with Synthetic Peptide Antigens.” Parasitology 121 (Pt 2) (August): 145–53.

Zaiss, M. M., and N. L. Harris. 2016. “Interactions between the Intestinal Microbiome and Helminth Parasites.” Parasite Immunology 38 (1): 5–11.

Zarowiecki, Magdalena, and Matt Berriman. 2015. “What Helminth Genomes Have Taught Us about Parasite Evolution.” Parasitology 142 Suppl 1 (February): S85–97.

>>Referencias metodológicas solo incluidas en Anexo<<

Objetivos y Actividades

Objetivo General: Estudiar el papel de la duplicación en la adaptación a la vida parasitaria y a los ciclos complejos, tomando como modelo especies del phylum Platyhelminthes.

Objetivos específicos:

Nº	Objetivo Específico	Resultado esperado	Observaciones
1	Identificar proteínas de secreción codificadas por familias multigénicas que pudieran estar jugando un rol en la adaptación del parásito al hospedador final o secundario o a los nichos específicos de los estadios.	<p>>Una lista de genes (y sus familias multigénicas respectivas) candidatas a estar involucradas en el proceso adaptativo en determinado estadio en las especies estudiadas</p> <p>>Evidencia de los niveles de expresión de los genes en cuestión en distintos estadios, buscando elementos que aporten a su vinculación al proceso adaptativo.</p> <p>>Información transcripcional de estadios poco analizados de <i>Hymenolepis microstoma</i> y <i>Fasciola hepatica</i>.</p>	

- | | | |
|---|--|--|
| 2 | Estudiar y cuantificar el efecto de la selección natural operando sobre la evolución de las secuencias o sobre el número de copias de estas familias. | >Reconstrucción filogenética de las familias codificantes para proteínas de secreción. >Estimación de la tasa de duplicación y mapeo de los eventos de duplicación en los distintos linajes del phylum Platyhelminthes.

>Estimación de la tasa de evolución molecular dN/dS en los distintos linajes de la familia gónicas.

>Asociar estos eventos a cambios funcionales exclusivos de los estadios y/o las especies. Generar hipótesis del posible rol funcional de los genes expresados en los distintos estadios. |
| 3 | Identificar genes codificantes para péptidos antimicrobianos (AMPs) en los genomas de las especies del phylum. Realizar un análisis comparativo de estos genes y su expresión en distintas especies y estadios dentro de especies. | Lista de AMPs en los distintos genomas analizados.

Resultados sobre el grado de conservación, la abundancia y distribución filogenética de los distintos elementos identificados. Obtener datos de expresión de los distintos elementos identificados. |

ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

Plan de trabajo

Plan de trabajo:

Actividad/Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Extracción de ARN ...		X	X																																		
Secuenciación de ARN en servicio privado. ...			X	X	X																																
Obtención de secuencias de genomas, anotación y secuencias codifi .			X	X	X																																
Análisis de expresión diferencial en estadios de H. microstoma y ...					X	X	X	X	X	X	X	X																									
Análisis de expresión diferencial en estadios disponibles princip ...											X	X	X	X	X	X																					
Agrupamiento de familias multigénicas (grupos de genes homologos) .																X	X	X	X																		
Identificación de proteínas de secreción excretadas, mediante ide ...																		X	X	X	X																
Pasantía Andrés Iriarte en Mississippi State University, en el La ...																		X																			
Estimación de tasa de evolución dN/dS para las familias seleccion ...																					X	X	X	X													
Estimación de tasa de duplicación de las distintos familias sobre ...																									X	X	X										
Integración de resultados (tasas de duplicación, tasa de evolució ...																												X	X	X							
Identificación de genes precursores de péptidos antimicrobianos (...																													X	X	X						
Escritura de Manuscritos y/o comunicación a Congreso ...																														X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de expresión de los genes precursores para AMPs utilizan ...																															X	X	X				
Estudio de la distribución filogenética de los genes precursores ...																																	X	X			

ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

Descripción de las actividades:

Nº	Actividad	Mes inicio/fin	Es hito	Observaciones
1	Extracción de ARN	1/2	NO	A desarrollarse en la Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias.
2	Secuenciación de ARN en servicio privado.	2/4	SI	El presupuesto estimado corresponde a los precios actuales en el servicio internacional Macrogen. La Justificación del servicio internacional esta en la sección Contenido Técnico (Materiales y métodos).
3	Obtención de secuencias de genomas, anotación y secuencias codificantes del phylum.	2/4	NO	Se obtendrán de bases de datos de libre acceso.
4	Análisis de expresión diferencial en estadios de H. microstoma y F. hepatica.	4/10	NO	
5	Análisis de expresión diferencial en estadios disponibles principalmente de S. mansoni, E. granulosus, E. granulosus y otras especies con análisis de RNA-seq disponibles (ej. planarias en planmine.mpi-cbg.de)	10/15	NO	Los datos de transcriptomas a utilizar deben de cumplir con las condiciones establecidas en materiales y métodos: de las mismas especies, comparados en el mismo articulo, que hayan sido generados por el mismo grupo, preferentemente en el mismo momento.

ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

6	Agrupamiento de familias multigénicas (grupos de genes homologos) y análisis filogenéticos de los grupos.	15/18	SI	
7	Identificación de proteínas de secreción excretadas, mediante identificación de péptido señal. Y selección de proteínas excretadas previamente identificadas en la bibliografía.	18/21	SI	Se comenzara con 40 familias multigénicas identificadas mediante el péptido señal y 10 seleccionadas de la bibliografía. De acuerdo a las dificultades es posible aumentar el número del primer y segundo grupo. En principio se seleccionaran en base a la con
8	Pasantía Andrés Iriarte en Mississippi State University, en el Lab. del Dr. Hoffmann.	18/18	NO	
9	Estimación de tasa de evolución dN/dS para las familias seleccionadas.	21/24	NO	
10	Estimación de tasa de duplicación de las distintas familias sobre la filogenia de las especies.	25/27	SI	
11	Integración de resultados (tasas de duplicación, tasa de evolución dN/dS, datos de expresión diferencial) generados en los puntos anteriores.	28/30	SI	
12	Identificación de genes precursores de péptidos antimicrobianos (AMPs) en los genomas completos disponibles de especies del phylum.	29/31	NO	

ESPECIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

13	Escritura de Manuscritos y/o comunicación a Congreso	30/36	SI	Si bien este punto esta limitado a los últimos meses del proyecto, esperamos comunicar algunos de los resultados y conclusiones, posiblemente en forma de manuscritos y/o comunicaciones a congresos, de algunas de las secciones anteriores de forma independi
14	Análisis de expresión de los genes precursores para AMPs utilizando los datos de transcriptomas generados y procesados en los puntos anteriores.	31/33	NO	Se utilizarán los datos de RNA-seq procesados en los puntos anteriores, obtenidos de bases de datos libres (que cumplan con las condiciones de acuerdo a lo establecido en materiales y métodos) y generados en el presente proyecto.
15	Estudio de la distribución filogenética de los genes precursores para péptidos antimicrobianos. Integración con los datos de expresión.	33/34	NO	

Impactos del proyecto

Contribuciones del Proyecto: <<<A>>>Avance del conocimiento. <<a>>Principales: <1>Entender la relevancia del proceso de duplicación, su dinámica evolutiva y sus implicancias a nivel de estos organismos. <2>Identificar genes relevantes para entender la compleja interacción parásito-hospedero en sus distintos ciclos. <3>Cuantificar el proceso de duplicación/delección de las distintas familias en los distintos linajes dentro del phylum Platyhelminthes. <4>Estudiar y proponer hipótesis sobre el rol de algunas familias al proceso adaptativo de los parásitos. <5>Mediante análisis transcriptómicos y de variabilidad de secuencias el proyecto propone poner a prueba las hipótesis sobre las consecuencias funcionales de las duplicaciones. <6>Mejorar la anotación de péptidos antimicrobianos en genomas de Platyhelminthes y cuantificar su expresión en estadios clave de especies referentes. Integrar varias de las herramientas actuales para la identificación de AMP, optimizar parámetros para su búsqueda. <7>Contribuir al entendimiento del rol de las proteínas de secreción a la Biología de los organismos, en especial a la adaptación a sus ciclos particulares. <>Secundarias: <1>Identificar un conjunto de posibles blancos vacunales (Proteínas de secreción altamente expresadas en momentos claves del ciclo de estos parásitos). <2>La generación de una importante cantidad de datos transcriptómicos de distintos estadios en especies parásitas de interés que pueden en un futuro ser utilizados con otros fines. Los estadios (en sus respectivas especies) propuestos para analizar por genómica funcional no existen hasta el momento. <3>Mejorar la anotación existente de los genomas de especies parásitas de mucho interés en salud humana. Integrando datos transcriptómicos será posible identificar nuevos genes e isoformas (llamados también variantes transcripcionales). <4>El proyecto propone estudiar el rol de la selección natural en la evolución de las secuencias de estas proteínas, contribuyendo a la discusión vieja, pero no saldada entre la visión seleccionista y neutralista de la evolución molecular. <<>>Formación de recursos humanos. <1>Este proyecto generará un marco natural para el desarrollo de cursos de grado y posgrado que puede ser de interés para estudiantes

de varios servicios de la UdelaR en distintos programas PEDECIBA (Áreas Biología, Química y Bioinformática) y PROINBIO. <2>El proyecto requiere la participación de al menos un estudiante de posgrado y uno de grado bajo la dirección del responsable del proyecto. Los estudiantes participaran en todas las etapas del proyecto. Se prevé que los estudiantes realizarán pasantías en el exterior en alguno/s de los laboratorios que forman parte del presente proyecto. Finalmente en el marco de la realización de seminarios, los estudiantes participaran en la presentación y discusión de resultados. <3>El proyecto propuesto aporta directamente a la formación de recursos humanos en genómica y biología computacional (y/o bioinformática), áreas de gran interés para el desarrollo de la ciencia del país que siguen siendo altamente demandadas. <<<C>>>Otros. <1>Consolidar los vínculos entre grupos que trabajan en temáticas similares en institutos de investigación independientes a nivel nacional e internacional. <2>Consolidar la creación de una línea de investigación liderada por el responsable del proyecto, dedicada al la genómica comparativa y funcional de patógenos en el Departamento Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.

Divulgación: El proyecto generará resultados que serán difundidos en al menos un evento nacional y un evento internacional, se procurará priorizar congresos vinculados al área de genómica de parásitos. El proyecto prevé la formación de recursos humanos en la forma de tesis de grado y posgrado por lo que las defensas de tesis y/o exposiciones orales de los estudiantes serán otros eventos de difusión. Por último los resultados serán publicados en revistas internacionales arbitradas en el área de la genómica, biología computacional y/o biología molecular de parásitos.

Vinculación con la diáspora: SI

Manera en que se llevará a cabo esta Vinculación y en qué medida representa un aporte al Proyecto: El proyecto cuenta con el asesoramiento de tres investigadores uruguayos radicados en el exterior que son expertos en metodologías o temáticas asociadas del proyecto: Federico Hoffmann, Anna Protasio y Francisco Peñagaricano (ver arriba). El proyecto incluye gastos para cubrir una pasantía de un estudiante en alguno de los laboratorios de los investigadores asesores internacionales. Se aplicará a programas de financiamiento para cubrir otras pasantías de estudiantes y/o del responsable del proyecto. Finalmente en el marco del proyecto se plantea un curso o encuentro en Uruguay sobre “Genómica Evolutiva y Funcional de Platyhelminthes” para los cuales estos investigadores serán invitados y también se aplicará a financiamiento nacional.

Propiedad y uso de los resultados:

Resultado	Factibilidad de protección	Forma de apropiación
-----------	----------------------------	----------------------

Impacto ambiental

Impacto ambiental: No requiere Autorización Ambiental Previa

Aspectos éticos : No hay aspectos éticos a considerar en la presente propuesta.

Personal Técnico

Nombre	Rol	Dedicación	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Andrés IRIARTE ODINI	Responsable Técnico - Científico	25 Hs.Sem - 36 Meses	160.000	1.152.000	1.312.000
Total \$U: 1.312.000					

Profesores Visitantes

Nombre	Cantidad/Días	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Total \$U: 0				

Consultores

Nombre	Rol	Dedicación	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0					

PRESUPUESTO: Detalle

Capacitación

Nombre	Descripción	Institución	Duración	Dedicación	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Total \$U: 0							

Viáticos y Estadías

Nombre	Destino	Duración	Descripción	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Andrés IRIARTE ODINI	Mississippi state University, Starkville, Mis	1	Pasantía	75.000	0	75.000
Total \$U: 75.000						

Pasajes

Nombre	Destino	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Andrés IRIARTE ODINI	Mississippi state University, Starkville, Mis	41.000	0	41.000
Total \$U: 41.000				

PRESUPUESTO: Detalle

Servicios					
Descripción	Proveedor	Duración	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Secuenciación	Macrogen	1	264.000	0	264.000
Total \$U: 264.000					

Adecuación Edilicia			
Descripción	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Adecuación espacio para servidor, Aire acondicionado	30.000	0	30.000
Total \$U: 30.000			

Equipamiento Laboratorio					
Descripción			Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0					

Otros Equipos

PRESUPUESTO: Detalle

Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
computadora de alto rendimiento o "Workstation". El equipo cuenta con alta capacidad de proceso (al menos 40 procesadores y 256 GB de memoria RAM) (Ver Anexo IV Adjunto "Justificación Equipo"	272.000	0	272.000
Total \$U: 272.000			

Material Bibliográfico

Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Textos de Genómica Funcional, Comparativa y Biología Computacional	16.500	0	16.500
Total \$U: 16.500			

Materiales e Insumos

Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Material plástico y vidrio, RNA-stable tubes	49.500	0	49.500
Total \$U: 49.500			

Software y licencias

Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0			

Promoción y Difusión			
Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Total \$U: 0			

Protección Propiedad Intelectual			
Descripción	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Total \$U: 0			

Imprevistos			
Descripción	Aporte ANII	Otros Aportes	Total
Reparación de equipos y o re-envío de muestras, doble extracción ARN	45.000	0	45.000

PRESUPUESTO: Detalle

Total \$U: 45.000

Gastos de Administración			
Descripción	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Overhead	45.000	0	45.000
Total \$U: 45.000			

Resumen de inversiones

Rubro	Aporte ANII	Otros aportes	Total
Personal Técnico	160.000	1.152.000	1.312.000
Profesores Visitantes	0	0	0
Consultores	0	0	0
Capacitación	0	0	0
Viáticos y Estadías	75.000	0	75.000
Pasajes	41.000	0	41.000
Servicios	264.000	0	264.000
Adecuación Edilicia	30.000	0	30.000
Equipamiento Laboratorio	0	0	0
Otros Equipos	272.000	0	272.000
Material Bibliográfico	16.500	0	16.500
Materiales e Insumos	49.500	0	49.500
Software y licencias	0	0	0
Promoción y Difusión	0	0	0
Protección Propiedad Intelectual	0	0	0
Imprevistos	45.000	0	45.000
Gastos de Administración	45.000	0	45.000

PRESUPUESTO



Total \$U	998.000	1.152.000	2.150.000
-----------	---------	-----------	-----------

Cronograma de ejecución

Rubro	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4	Semestre 5	Semestre 6
Personal Técnico	54.000	53.000	53.000	0	0	0
Viáticos y Estadías	0	0	0	75.000	0	0
Pasajes	0	0	0	41.000	0	0
Servicios	264.000	0	0	0	0	0
Adecuación Edilicia	24.000	0	0	0	0	0
Otros Equipos	280.000	0	0	0	0	0
Material Bibliográfico	0	0	16.500	0	0	0
Materiales e Insumos	49.500	0	0	0	0	0
Imprevistos	7.500	7.500	7.500	7.500	7.500	7.500
Gastos de Administración	7.500	7.500	7.500	7.500	7.500	7.500
Total \$U:	686.500	68.000	84.500	131.000	15.000	15.000

A continuación se listan los documentos adjuntos:

CV del Equipo Técnico	(CV Anna V. Protasio)
Otros	(Anexo I Ciclos)
Otros	(Anexo II Estimador dN/dS)
Otros	(Anexo III Referencias bibliográficas Completa)
Otros	(Anexo IV "Justificación Compra Equipo")
Carta aval	(Carta aval - I. Higiene - Institución donde s)
Carta aval de las participantes	(Carta aval - F. Medicina - Institucion partic)
Carta aval de las participantes	(Carta aval - F. Ciencias - Institucion partic)
Declaración jurada	(Declaración Jurada - Andrés Iriarte - estable)

Exportador de : FCE_3_2016_1