

Reunión Nacional de Investigación — PECUARIA —



Foto: Felipe de Jesús Ruiz López

MEMORIA

COMPILADORES:

Ana María Anaya Escalera, Claudia García Figueroa, Laura Yavarik Alvarado Avila Miguel Enrique Arechavaleta Velasco y Luis Reyes Muro

ISSN
2954-4165



ANOTACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DEL TRANSCRIPTOMA ENSAMBLADO A PARTIR DE DOS AISLADOS DE *Haemonchus contortus* SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A IVERMECTINA.

David E. Reyes-Guerrero¹, Verónica Jiménez-Jacinto², Miguel A. Alonso-Díaz³, Rogelio A. Alonso-Morales⁴, Jocelyn Maza-López¹, Camas-Pereyra R^a, Ma. Eugenia López-Arellano^{1*}

¹Laboratorio de Helminología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla 8534, Progreso, C.P. 62550 Jiutepec, Morelos, México.

²Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Chamilpa, C. P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México.

³Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 5. Carretera Federal Tlapacoyan-Martínez de la Torre, C.P. 93600 Martínez de la Torre, Veracruz, México.

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico, C.P. 04510, México

*lopez.mariaeugenia@inifap.gob.mx

Palabras clave: *Haemonchus contortus*, RNA-Seq, Enriquecimiento funcional

INTRODUCCIÓN

El nematodo *Haemonchus contortus*, es un parásito gastrointestinal (NGI) de pequeños rumiantes, localizado en zonas de pastoreo de regiones tropicales y templadas. Debido a los problemas de salud que provoca por sus hábitos hematófagos puede ocasionar la muerte de los animales jóvenes, provocando pérdidas económicas en la producción pecuaria (Kotze & Prichard, 2016). La especie *H. contortus* ha sido estudiada como modelo biológico, debido a la diversidad genética asociada a los mecanismos implicados en la resistencia antihelmíntica (RA) entre poblaciones de nematodos de la misma familia. Por ejemplo, los genes de los canales iónicos de cloro (ej. *GluCl*) y los del transportador de membrana, P-glicoproteína (P-gp) han sido asociados a la resistencia a ivermectina (IVM), perteneciente a la familia de las lactonas macrocíclicas (LM) en diferentes especies de nematodos, incluyendo a *H. contortus* (Whittaker et al., 2016). Por otro lado, la información transcriptómica y genómica de *H. contortus* es de relevancia para entender su asociación a la patogenicidad, funciones biológicas, interacción huésped-parásito y resistencia a antihelmínticos (AH), información que podría contribuir en el control de este nematodo y de otros NGI de importancia pecuaria como son los géneros *Cooperia* spp. y *Ostertagia* spp. (Doyle et al., 2020). En México, se han caracterizado dos aislados de campo de *H. contortus* susceptible (IVMs) y resistente (IVMr) a IVM. Así mismo, se determinó la expresión de diversos genes de *Hco-pgp* por RT-qPCR involucrados a resistencia a IVM en ambas cepas de *H. contortus*, mostrando variabilidad en el incremento de expresión génica en la cepa IVMr, principalmente de los genes de *Hco-p-gp 1, 4, 10 y 16* en diferentes estadios de *H. contortus* (Reyes-Guerrero et al 2020). Debido a la importancia de *H. contortus* y a la dispersión de la RA es necesario conocer más acerca de los genes funcionales que conforman este nematodo, lo cual puede contribuir a conservar la toxicidad de los antihelmínticos (AH), así como en la búsqueda de otras estrategias de control (Whittaker et al., 2016). Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue realizar la anotación y el enriquecimiento funcional de los transcritos expresados diferencialmente en el transcriptoma ensamblado *de novo* a partir de dos cepas de *H. contortus* IVMs e IVMr.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de Haemonchus contortus

Las cepas fueron caracterizadas previamente mediante ensayos *in vitro* por Reyes-Guerrero y colaboradores (2020), evaluando el efecto letal de IVM, grado analítico sobre larvas infectantes de *H. contortus*. Germoplasma de las *H. contortus* IVMs e IVMr, fue colectado de ovinos donadores y sacrificados siguiendo las Normas Oficiales Mexicanas de cuidado humanitario y sacrificio experimental de animales (NOM-051-ZOO-1995, NOM-033-ZOO-1995, and NOM-062-ZOO-1999, <https://www.gob.mx/senasica>). Nematodos de adultos de *H. contortus* de cada cepa fueron separados, utilizando los machos para el presente estudio.

RNA-Seq

RNA total a partir de 100 machos adultos de cada cepa de *H. contortus* fue purificado por triplicado, utilizando el reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific, USA). Una concentración total de 3 µg de RNA fue estimada con espectrofotometría (Implen N-80, USA), confirmando pureza e integridad a través de electroforesis y por fluorometría en un Bionalizador 2100 (Agilent, USA), obteniendo valores de integridad de RNA (RIN) óptimos para llevar a cabo secuenciación. La construcción de bibliotecas de cDNA se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN, México), utilizando los kits comerciales TrueSeq y mRNASeq Strander (Illumina). La secuenciación se desarrolló en la plataforma Illumina HighSeq 2500 (USA) en fragmentos pareados de 76 pb (2 x 76).

Expresión diferencial de genes (EDG), anotación y análisis de enriquecimiento funcional (AEF)

La determinación y el análisis de la calidad de secuencias se realizó mediante el programa FastQC v.1.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>). Se removieron secuencias adaptadoras y secuencias repetidas, utilizando el programa CutAdapt v.1.16. Las lecturas de secuencias fueron alineadas con genoma de referencia, utilizando el programa Smalt (<https://www.sanger.ac.uk/tool/smalt-0/>). Sin embargo, se procedió a realizar índice de Genoma con algoritmo bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). El ensamblaje de lecturas de los transcritos, se realizó usando anotaciones de referencia mediante Trinity v.3.0 (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>). El análisis de EDG entre cepas se realizó con los algoritmos 1) Imma, 2) edgeR, 3) DESeq2 y 4) NOISeq dentro de la paquetería IDEAMEX (<http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>) (Jiménez-Jacinto et al., 2019). Posteriormente, se generó la anotación de genes que resultaron diferencialmente expresados únicamente por el algoritmo DESeq2 entre las cepas de *H. contortus* *IVMs* e *IVMr*, utilizando la base de datos de Trinotate (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>).

Términos de Gene Ontology (GO) fueron seleccionados a partir de las secuencias de los transcritos diferencialmente expresados y anotados dentro del phylum Nematoda mediante herramientas BLAST del NCBI. Los términos GO basados en los transcritos seleccionados, fueron analizados con el estadístico de prueba exacta de Fisher a través del paquete TopGo (Alexa et al., 2006) (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>), considerando valores significativos de Fold-change ≥ 1 ($p \leq 0.05$) de los transcritos evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El transcriptoma *de novo* ensamblado a partir de secuencias de las cepas *IVMs* e *IVMr* de campo de *H. contortus* consistió en un tamaño de ~127 Mpb, mostrando 44.4 % del contenido de G + C. Así mismo, el ensamblaje generó un total de 180,400 secuencias de transcritos (isoformas), resultando en 77,423 secuencias que se encuentran entre un rango de longitud de 200 y 7700 pb. En el presente estudio, se obtuvieron transcritos con una longitud promedio de 776 pb (contigN50) por gen. A este respecto, Palevich et al., (2019) reportaron tamaños promedios similares de transcritos, correspondientes a 666 pb por gen en machos de *H. contortus*. El análisis de EDG, mostró 27,324 secuencias de transcritos ($p \leq 0.05$), entre ambas cepas *IVMs* e *IVMr* de *H. contortus* utilizando la matriz de conteos con el paquete *DESeq2*, resultando en 13,881 y 13,442 genes sobre-expresados en la cepa *IVMr* e *IVMs*, respectivamente. A partir de los 27,324 transcritos se llevó a cabo la anotación utilizando Trinotate. De esta anotación, se identificaron 13,624 secuencias, correspondientes a 6772 y 6850 secuencias codificantes sobre-expresadas para la cepa *IVMr* e *IVMs*, respectivamente. La anotación con el phylum Nematoda resultó en 6845 genes con expresión diferencial entre ambas cepas de *H. contortus*. Esto podría indicar diversidad entre las cepas de *H. contortus*, cuya regulación de genes podría estar asociada a adaptaciones en el genoma, posiblemente por la exposición a fármacos como IVM (Palevich et al., 2019).

El AEF en términos de GO se desarrolló a partir de un total de 9884 genes expresados diferencialmente y anotados en el phylum Nematoda. El análisis identificó un total de 8702 componentes celulares (CC), 8430 de funciones moleculares (FM) y 7450 términos GO relacionados a procesos biológicos (PB), lo cual indica una gran diversidad genética. Considerando el criterio de selección de fold-change ≥ 1 ($p < 0.05$) y la prueba exacta de Fisher sobre los 9884 genes, 6663 genes fueron anotados significativamente, mostrándose 898, 1799 y 5614 términos GO relacionados a las categorías de CC, FM y PB, respectivamente, observando que los procesos biológicos claramente son los que muestran mayor regulación. Los cinco términos GO mas enriquecidos para cada categoría fueron los siguientes: para CC, los GO: 0005622, 0043226, 005737, 0043229, 0043231, los cuales están relacionados a la estructura anatómica intracelular; para FM, GO: 0003824, 0019853, 0003735, 0019842, 0003723, involucrados en la actividad catalítica, estructura

molecular y procesos de unión; y para PB los GO: GO:0008152, 0044237, 1901564, 0019538, 0044267, asociados a la regulación del metabolismo y procesos celulares. Estudios en *H. contortus*, han mostrado el perfil transcriptómico y AEF de set de genes con base en su función biológica como agentes inmunizantes, mecanismos implicados en la resistencia antihelmíntica o relacionados con la biología del parásito (Doyle et al., 2020).

CONCLUSIONES

La información presentada en este estudio sugiere la presencia de una gran diversidad genética entre aislados de *H. contortus*, la cual puede estar asociada a diferentes factores, incluyendo la presión de AH, la prevalencia de nematodos respecto a sus condiciones ambientales y geográficas, así como también por las interacciones huésped-parásito. La funcionalidad de los genes diferencialmente expresados en el transcriptoma de *H. contortus*, podría ser clave para comprender los mecanismos de RA y procesos de detoxificación de fármacos e identificar genes candidatos como blancos terapéuticos o agentes inmunizantes enfocados en estrategias para el control de *H. contortus* y otros NGI con la finalidad de mantener el efecto tóxico de los AH.

AGRADECIMIENTOS Y FUENTE FINANCIERA

Proyecto fiscal-INIFAP "Caracterización molecular y análisis funcional de P-glicoproteínas 1 y 16 como genes asociados a la resistencia a ivermectina" con número 9495336224

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Doyle SR, Tracey A, Laing R. et al. Genomic and transcriptomic variation defines the chromosome-scale assembly of *Haemonchus contortus*, a model gastrointestinal worm. *Commun. Biol.* 2020;3:656. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01377-3>.
2. Kotze AC, Prichard RK. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv. Parasitol.* 2016;93:397- 428.
3. Palevich N, Maclean PH, Baten A, Scott RW, Leathwick DM. The Genome Sequence of the Anthelmintic- Susceptible New Zealand *Haemonchus contortus*. *Genome Biol. Evol.* 2019;11(7);1965–1970. doi:10.1093/gbe/evz141.
4. Reyes-Guerrero DE, Cedillo-Borda M, Alonso-Morales RA, Alonso-Díaz MA, Olmedo-Juárez A, Mendoza-de-Gives P, López-Arellano ME. Comparative study of transcription profiles of the P-glycoprotein transporters of two *Haemonchus contortus* isolates: susceptible and resistant to ivermectin. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 2020;111281:1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111281>.
5. Whittaker JH, Carlson SA, Jones DE, Brewer MT. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *J. Vet. Pharmacol. Therapeutics* 2016. doi: 10.1111/jvp.12330