

hospedadores de *D. immitis* tienen una base molecular. El acortamiento del ciclo vital de los vermes de *D. immitis* en el gato y el humano, con respecto a lo que ocurre en el perro, podría relacionarse con una mayor capacidad para bloquear con anticuerpos, algunas proteínas fundamentales implicadas en los mecanismos de generación de energía y de evasión de la respuesta inmune por parte del parásito.

Referencias

- [1] Oleaga A, Pérez-Sánchez R, Pagés E, Marcos-Atxutegi C, Simón F. Identification of immuno-reactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. *Mol Biochem Parasitol* 2009;166:134-141.

Identificación de proteínas de *Neospora caninum* implicadas en procesos de invasión y virulencia

Virginia Marugán-Hernández¹, Javier Regidor-Cerrillo¹, Gema Álvarez-García¹, Fiona Tomley², Adriana Aguado-Martínez¹, Mercedes Gómez-Bautista¹, Luís Miguel Ortega-Mora¹

¹SALUVET. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. ²Division of Microbiology. Institute for Animal Health. Reino Unido

La neosporosis bovina es una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado bovino a nivel mundial [1]. *Neospora caninum*, agente etiológico de esta enfermedad, es un protozoo intracelular obligado perteneciente al *phylum* Apicomplexa y relacionado filogenéticamente con *Toxoplasma gondii*. Existe una diversidad intra-específica demostrada entre aislados de *N. caninum* desde el punto de vista genético [2] y fenotípico (patogenicidad *in vivo*, tasas de crecimiento e invasión *in vitro*) (Regidor-Cerrillo y col., manuscrito enviado).

Por otra parte, en la invasión de la célula hospedadora están implicadas tres tipos de organelas secretoras, micronemas, roptrias y gránulos densos. En concreto, las roptrias han sido descritas como factores de virulencia en *T. gondii* [3]. Se ha identificado un gran número de proteínas de roptrias en *T. gondii* mientras que en *N. caninum* únicamente NcROP2 ha sido caracterizada [4].

Por todo ello, el objetivo del presente estudio fue realizar un análisis diferencial de los perfiles de expresión proteica entre distintos aislados de *N. caninum* para dilucidar los mecanismos implicados en la virulencia del parásito. Por otro lado, se procedió a la identificación de proteínas roptrias, potencialmente relacionadas con los procesos de invasión y virulencia.

Los extractos proteicos empleados fueron obtenidos a partir de taquizoítos -fase de replicación rápida- mantenidos en cultivos celulares de células MARC-145 y, posteriormente, purificados mediante columnas desaladoras PD-10.

OBJETIVO 1: La técnica DIGE fue empleada en el estudio comparativo de expresión proteica diferencial de aislados que presentaron diferencias de patogenicidad: dos aislados virulentos (Nc-Liv y Nc-Spain7) y uno naturalmente atenuado (Nc-Spain1H). Se realizaron seis réplicas de geles y que fueron analizadas con el software DeCyder v6.0. Las manchas proteicas con una abundancia relativa mayor o menor que 1,3 con una $p < 0,05$ (*t* de Student) fueron consideradas diferencialmente expresadas. Algunas de estas manchas fueron escindidas del gel para su posterior análisis por MALDI-TOF.

OBJETIVO 2: Para la identificación de las proteínas de roptrias se obtuvieron fracciones enriquecidas en organelas secretoras a partir de los taquizoítos de Nc-Liv mediante fraccionamiento subcelular. Sobre las fracciones enriquecidas en roptrias se llevó a cabo la identificación de proteínas localizadas en un rango de peso molecular de 37 a 250 kDa, mediante nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en trampa iónica LQT linear.

En ambos estudios proteómicos se empleó el algoritmo MASCOT frente a las bases de datos del NCBI nr y ToxoDB v5.1 para llevar a cabo las identificaciones proteicas.

Resultados y conclusiones

OBJETIVO 1: Un total de 124 manchas proteicas mostraron una expresión diferencial. Nueve al comparar Nc-Liv y Nc-Spain1H, 50 al hacerlo con Nc-Liv y Nc-Spain 7 y 65 entre Nc-Spain7 y Nc-Spain1H. A partir de ellas se consiguió la identificación de 19 manchas correspondientes a 12 proteínas que se detallan en la Tabla 1. Entre ellas, se observaron variaciones en algunas isoformas de las proteínas actina y miosina dependientes del aislado, implicadas ambas en la motilidad del parásito

y en la invasión. Además, se observó una mayor abundancia de la proteína de membrana NcPDI, y de aquellas de organelas como NcMIC1, NcROP8 y NcNTPasa en aquellos aislados más virulentos, todas ellas relacionadas con los mecanismos de invasión y proliferación.

OBJETIVO 2: A partir de las fracciones subcelulares enriquecidas en roptrias se obtuvo un amplio número de identificaciones (Tabla 2). Algunas de las nuevas proteínas, denominadas “ROP”, presentaron homólogos en *T. gondii*, si bien no siempre estaban situadas en el mismo locus. Por otra parte, la aparición de una serie de kinasas y fosfatasa indica la existencia de posibles factores de virulencia, y la identificación de proteínas “RON” indicaría la existencia de la “unión móvil” durante el proceso de invasión, tal como ocurre en *T. gondii*.

Tabla 1. Proteínas de roptrias de *N. caninum*.

Proteína	pI/Mr (kDa) Teórico	Identidad (%)	Nº péptidos	Secuencia (Nº Acceso)	Abundancia	Función
NTPase	5,56/69,6	34	21	NCLIV 145870	NcSp7>NcSp1H* NcLiv≥NcSp1H	Captación de purinas-virulencia
aspartyl-tRNA synthetase	5,95/62,8	48	13	NCLIV 082700	NcSp7>NcSp1H NcLiv≥NcSp1H	Síntesis de proteínas
microneme-associated protein (NcMIC1)	4,79/50,1	46	18	gi 17226315	NcSp7>NcSp1H NcLiv≥NcSp1H	Invasión
elongation factor 2	5,93/94	38	29	NCLIV 081030	NcSp7>NcSp1H NcLiv≥NcSp1H	Síntesis de proteínas
glucose-6-phosphate dehydrogenase	8,59/112,6	21	17	NCLIV 010690	NcSp7>NcSp1H NcLiv≥NcSp1H	Metabolismo
ROP8	6,29/43,2	66	23	NCLIV 000700	NcSp7>NcSp1H NcLiv≥NcSp1H	Invasión-proliferación
myosin light chain	4,55/24,9	46	18	NCLIV 000030	NcSp7<NcSp1H& NcLiv=NcSp1H	Invasión-motilidad
glycine hydroxymethyltransferase	6,26/55,2	43	10	NCLIV 123730	NcSp7<NcSp1H NcLiv=NcSp1H	Metabolismo
protein disulfide isomerase	5,18/53,2	62	26	NCLIV 051400	NcSp7>NcSp1H NcLiv>NcSp1H	Plegamiento de proteínas
actin	5,05/42,6	72	24	NCLIV 020800	NcSp7<NcSp1H& NcLiv<NcSp1H	Invasión-motilidad
6-phosphogluconate dehydrogenase	6,28/55,2	45	24	NCLIV 140400	NcSp7>NcSp1H NcLiv=NcSp1H	Metabolismo
porin	8,87/31,5	48	14	NCLIV 090640	NcSp7<NcSp1H& NcLiv=NcSp1H	Transporte transmembrana

* > indica un incremento significativo en la abundancia de la proteína entre los aislados, ≥ denota la tendencia de incremento en la expresión (p> 0,05). & Resultados mostrados por la isoforma mayoritaria.

Este estudio ha permitido identificar una serie de proteínas potencialmente implicadas en procesos de invasión y virulencia. Estas proteínas podrían cons-

tituir un nuevo arsenal de dianas terapéuticas e inmunoprolácticas frente a la infección por *N. caninum*.

Tabla 2. Proteínas identificadas expresadas de forma diferencial entre aislados de *N. caninum*

Proteína de <i>N. caninum</i>	Homólogo en <i>T. gondii</i>	Mismo locus		Identidad (%)	Positivos (%)
surface protein rhoptry	rhoptry 1	SI	65.9	28	38
ROP8	ROP8	NO	348	43	64
rhoptry antigen	rhoptry protein 5	SI	213	53	67
surface protein rhoptry	rhoptry protein 5	SI	282	51	63
rhoptry antigen	rhoptry 1	NO	70.5	29	38
Rhoptry neck protein 4	rhoptry neck protein 4	SI	902	65	78
conserved hypothetical protein	rhoptry neck protein 2	SI	2209	72	81
hypothetical protein	rhoptry neck protein 3	SI	3262	78	88
hypothetical protein	rhoptry neck protein 8	SI	4298	82	91
hypothetical protein	protein kinase	SI	758	80	89
acid phosphatase	acid phosphatase	SI	741	88	92
mitogen-activated protein kinase-related	Protein kinase domain protein	NO	99	27	46
Subtilisin-like serine protease	subtilisin-like protein TgSUB1	SI	373	62	73
subtilase family serine protease,	subtilisin	SI	1123	57	67
serine/threonine protein phosphatase,	serine/threonine protein phosphatase	SI	2265	69	82
Subtilisin-like serine protease	subtilisin-like serine protease	SI	1193	100	100

Agradecimientos

Agradecemos a Rick Oakes y Vanesa Navarro su excelente apoyo técnico. El trabajo proteómico ha sido realizado por el Servicio de Proteómica UCM-PCM, miembro de la red ProteoRed. VMH está financiada por una ayuda FPI del MICINN. El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL 2007-60132/GAN.

Referencias

- [1] Dubey, J. P., Schares, G., Ortega-Mora, L. M., Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum. Clin. Microbiol. Rev. 2007; 20: 323-367.
- [2] Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Diaz, S., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M., Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in Neospora caninum. J. Parasitol. 2006; 92:517-524.
- [3] Saeij, J. P., Boyle, J. P., Coller, S., Taylor, S. et al., Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. Science 2006; 314:1780-1783.
- [4] Debache, K., Guionaud, C., Alaeddine, F., Mevissen, M., Hemphill, A., Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with Neospora caninum tachyzoites. Int. J. Parasitol. 2008; 38: 1455-1463.