

- nostoma caproni* (Trematoda) recognized by Mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. *Parasite Immunol* 2008;30:271-79.
- [4] Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EAL, Guimaraes PEM, Ojopi EPB et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet* 2003;35:148-57.
- [5] Wilson RA, Ashton, PD, Braschi S, Dillon, GP, Berriman M, Ivens A. "Oming" in on schistosomes: prospects and limitations for post-genomics. *Trends Parasitol* 2003;23:14-20.
- [6] Bernal D, Carpena I, Espert A, De la Rubia JE, Esteban JG, Toledo R, Marcilla A. Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infections. *Proteomics* 2006;9:2835-43.

Las técnicas de proteómica aplicadas al estudio de las relaciones parásito/hospedador en la dirofilariosis animal y humana

Javier González-Miguel¹, Rodrigo Morchón-García¹, Ana Oleaga², Mar Siles-Lucas², Ricardo Pérez-Sánchez², Fernando Simón¹

¹Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca. ²Laboratorio de Parasitología, IRNA Salamanca (CSIC)

Resumen

En el presente trabajo se emplean técnicas de electroforesis 2D, western blot y espectrometría de masas para analizar la existencia de una base molecular en las relaciones que *Dirofilaria immitis* establece con sus diferentes hospedadores. Se han identificado similitudes y diferencias en las moléculas parasitarias que parecen jugar un papel fundamental en dichas relaciones, en cada hospedador.

Dirofilaria immitis es el agente causante de la dirofilariosis cardiopulmonar canina y felina y de la dirofilariosis pulmonar humana. Tanto el desarrollo del parásito, como las implicaciones clínicas, son diferentes en cada uno de sus 3 hospedadores. En el perro los vermes adultos de *D. immitis* pueden vivir durante más de 7 años produciendo microfilarias y la enfermedad tiene, generalmente, un desarrollo crónico. En el gato los adultos viven solamente 2 años y las infecciones son siempre amicrofilarémicas. La patología tiene un curso imprevisible y habitualmente agudo. En el hombre, *D. immitis* no alcanza el estado adulto. En algunas ocasiones, vermes preadultos se alojan en una rama de la arteria pulmonar, donde embolizan y causan un

nódulo pulmonar benigno que puede confundirse con cáncer en radiología. La comprensión de las relaciones parásito/hospedador en la dirofilariosis precisa de datos sobre las moléculas del parásito y el papel que desempeñan, tanto en el estímulo de los mecanismos patológicos e inmunes, como de los mecanismos de supervivencia. Las técnicas de proteómica son una herramienta muy útil para identificar dichas moléculas y analizar sus funciones. En el presente trabajo, el proteoma de *D. immitis* y los inmunomas obtenidos en cada hospedador, se relacionan los datos biológicos y clínicos de la enfermedad en cada uno de ellos.

Se utilizó un extracto antigénico soluble de vermes adultos de *D. immitis* (DiSB). El proteoma de *D. immitis* fue obtenido mediante electroforesis 2D del extracto DiSB. Las proteínas se tiñeron con nitrato de plata o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la realización del western blot 2D, en las que se incubaron con pools de sueros de los diferentes hospedadores infectados y de controles sanos. *Los spots* que contenían proteínas inmunógenas, se escindieron manualmente de los geles 2D y fueron enviadas al Servicio de Proteómica del CNIC para su correspondiente identificación por espectrometría de masas [1].

Tras la electroforesis 2D, el extracto DiSB resolvió más de 400 spots, la mayor parte con pI/s entre 5 y 8, y con un amplio intervalo de PMs (10-170 kDa). Los western blot 2D revelaron, en los casos de análisis con sueros de perros, gatos y humanos con dirofilariosis, un total de 48, 105 y 66 spots de *D. immitis*, de los cuales 37, 72 y 61 fueron identificados y se correspondieron con 19, 32 y 23 proteínas, respectivamente. A continuación, se determinó la función molecular y el proceso biológico en el que están implicadas las proteínas identificadas según las bases de datos *Gen Ontology* y *Swiss-Prot/UniProt*.

La mayor parte de las proteínas inmunógenas identificadas pertenecían a tres grupos funcionales (Figura 1), que son fundamentales en las relaciones parásito/hospedador en la dirofilariosis: proteínas de choque térmico (Hsps), enzimas del metabolismo energético y enzimas redox. Como se observa en la tabla 1, dentro de las Hsps y las enzimas redox, los gatos reconocen más proteínas que los humanos, y estos últimos a su vez, más que el hospedador canino. Por otra parte, desde el punto de vista del metabolismo energético, la ruta glicolítica del parásito es ampliamente inhibida por los tres hospedadores, no obstante, *D. immitis* es un fermentador homoláctico

y la principal enzima de la glicolisis anaerobia, la lactato deshidrogenasa, es tan solo bloqueada por gatos y humanos.

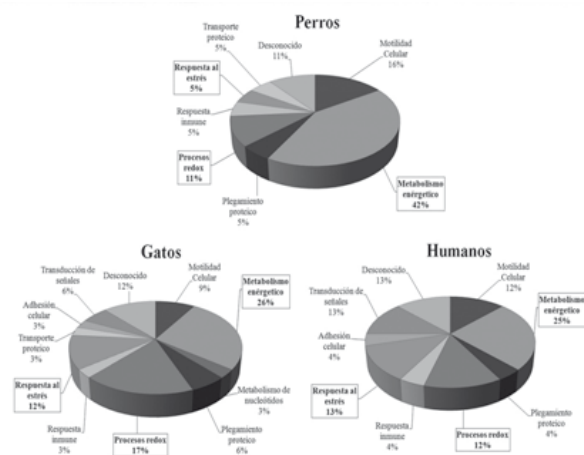


Figura 1. Procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas inmunógenas del extracto DiSB reconocidas por perros, gatos y humanos. Datos expresados como porcentaje del total de proteínas reconocidas por cada hospedador. Los grupos funcionales discutidos en el presente trabajo se hallan recuadrados.

Estos resultados sugieren que las diferencias biológicas y clínicas existentes entre los diferentes

Tabla 1. Proteínas inmunógenas del extracto DiSB reconocidas por perros, gatos y humanos en los grupos funcionales de proteínas de choque térmico, enzimas del metabolismo energético y enzimas redox.

Función	Proteína	Perros	Gatos	Humanos
Proteínas de choque térmico	Hsp 70	X	X	X
	sHsp		X	X
	Proteína OV25-1		X	X
	sHsp p27		X	
Enzimas del metabolismo energético	Enolasa	X	X	X
	Fructosa-bisfosfato aldolasa	X	X	X
	GAPDH	X	X	X
	Triosa-fosfato isomerasa	X	X	X
	Fosfoglicerato mutasa	X	X	X
	Fosfoglicerato quinasa	X	X	
	Glucosa-fosfato isomerasa	X	X	
	Lactato deshidrogenasa		X	X
Fumarasa	X	X		
Enzimas redox	Aldo/queto oxidoreductasa	X	X	X
	Tiorredoxina peroxidasa		X	
	Precursor de Glutatión peroxidasa		X	
	Glutatión transferasa		X	
	Hipotética oxidoreductasa FAD dep.	X	X	
	Precursor de transglutaminasa		X	X
	Disulfuro isomerasa			X

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 immunoreactive 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.