

Análisis proteómico en protozoos formadores de quistes relevantes en sanidad animal

Marugán-Hernández V¹, Regidor-Cerrillo J¹, Fernández-García A¹, Álvarez-García G¹, Aguado-Martínez A¹, Risco-Castillo V¹, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora L.M¹.

¹ Grupo SALUVET. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain.

Introducción

En la actualidad la neosporosis bovina, originada por *Neospora caninum*, está considerada como una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado bovino (Dubey et al., 2007). Por su parte la besnoitiosis bovina, causada por *Besnoitia besnoiti*, provoca esterilidad en los machos, deterioro del estado corporal en las hembras y se encuentra en expansión en los países del sur de Europa (Cortes et al., 2005). Ambos agentes presentan en su ciclo biológico dos estadios diferentes de desarrollo, el taquizoíto - responsable de la fase aguda de la infección - y el bradizoíto - responsable de la fase crónica-. Por otra parte, comparten organelas típicas del phylum Apicomplexa (roptrias y micronemas) que intervienen en los procesos de adhesión-invasión de la célula hospedadora y que parecen estar relacionadas con su virulencia. Nuestro interés reside en identificar proteínas implicadas en la virulencia y/o específicas de estadio de *N. caninum* y *B. besnoiti* mediante el empleo de técnicas proteómicas, las cuales podrían ser de utilidad diagnóstica e inmunoprolifáctica.

Material, métodos y resultados

La técnica Ettan 2-D DIGE se empleó en primer lugar para estudiar la variabilidad en el proteoma de tres aislados de *N. caninum* que presentaron diferencias de patogenicidad en un modelo experimental murino (Collantes-Fernández et al., 2006). Se detectó una expresión diferencial significativa ($\pm 1,3$, $p < 0,05$) en un número de manchas proteicas que varió en función del par de aislados comparado (de 9 a 65). Algunas de las proteínas fueron identificadas (NcNTPasa, NcMIC1 y actina) están involucradas en los procesos de invasión/ adhesión celular del parásito. Esta técnica también se empleó en la identificación de proteínas específicas de estadio (taquizoíto o bradizoíto) tanto en *N. caninum* como en *B. besnoiti*. Un total de 82 y 262 manchas proteicas se

expresaron significativamente de forma diferencial entre ambos estadios en *N. caninum* y *B. besnoiti*, respectivamente. En cada caso se identificaron al menos 10 proteínas específicas de bradizoíto mediante espectrometría de masas, destacando en *B. besnoiti* las enzimas ENO1 y LDHIII, descritas en otros protozoos apicomplexa. Finalmente, el último abordaje consistió en la obtención de fracciones enriquecidas en micronemas y/o roptrias a partir de taquizoítos de *N. caninum* mediante fraccionamiento celular (Kawazoe et al., 1992). Las distintas fracciones obtenidas mostraron perfiles proteicos diferentes por SDS-PAGE y la selección de las fracciones de interés se realizó mediante western blot con anticuerpos específicos frente a proteínas presentes en estas organelas. A partir de estas fracciones se está procediendo a la identificación de nuevas proteínas.

Conclusiones

Los resultados preliminares obtenidos ponen de manifiesto la utilidad de las técnicas proteómicas en el estudio de diferentes aspectos de la biología de estos protozoos relevantes en Sanidad Animal, posibilitando la identificación de nuevas dianas terapéuticas e inmunoprolifácticas implicadas en la virulencia y/o específicas de estadio.

Bibliografía

- Dubey J.P., Schares G., Ortega-Mora, L.M. Clin. Microbiol. Rev. 2007, 20, 323-367.
- Cortes H., Leitao A., Vidal R., Vila-Vicosa M.J., et al. Vet. Rec. 2005, 157, 262-264.
- Collantes-Fernández E., López-Pérez I., Álvarez-García G., Ortega-Mora L.M. Infect. Immun. 2006, 74, 2491-4.
- Kawazoe, U., Tomley, F.M., Frazier, J.A. Parasitology 1992, 104, 1-9.