



Programa de
Desarrollo de las
Ciencias Básicas



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

“Caracterización molecular de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 y su rol en la patogénesis de *Neospora caninum*”

Soledad Estefani Echeverría Cordo

Tesis Doctoral presentada al Programa de Posgrado de PEDECIBA Biología,
Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos
necesarios para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Director:

PhD Carlos Robello

Codirector:

PhD Andres Cabrera

Montevideo – Uruguay

Diciembre de 2025

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Carlos Robello y Andrés Cabrera por darme la oportunidad de realizar la tesis e integrarme a un grupo tan lindo como es el laboratorio de interacciones hospedero-patógeno (LIHP).

También agradecer a Federico Carrion por todo su apoyo y trabajo durante el proceso de expresión, purificación y caracterización de las proteínas, por compartir su experiencia y por su paciencia. A Martín Soñora que nos ayudó y enriqueció enormemente el trabajo estructural. A Ramiro Tomasina, que gracias a sus microscopía de expansión obtuvimos imágenes super lindas y enriquecedoras para la tesis.

Quiero agradecer a mi familia que siempre me apoya y está presente en todo momento. ¡Mis padres, quienes fueron fundamentales en el inicio de mi carrera profesional, y mis hermanos, que, aunque no entienden nada, siempre me escuchan!

A mis amigas que estuvieron en este viaje con todos los altibajos y cambios desde siempre y a las que hice en el camino.

Y al que más ha tenido que soportar este proceso Daniel (mi esposo, compañero y amigo) que ha escrito cada una de mis tesis conmigo, ha aprendido y llorado conmigo, compartido y soportado a lo largo de los años. Sin él, no hubiese llegado tan lejos, la vuelta después de tantos años ha sido compleja y él estuvo ahí apoyándome y recordando lo mucho que amo mi trabajo a pesar de los momentos de rabia.

¡Sin más solo dar las gracias a todos y cada uno de los que han hecho parte de este proceso!

Resumen

La neosporosis bovina, causada por el protozoo *Neospora caninum*, constituye una de las principales causas de aborto en bovinos a nivel mundial, generando importantes pérdidas económicas en los sistemas de producción lechera y cárnica. Es una enfermedad que presenta una seroprevalencia a nivel mundial de un 20%, con seroprevalencias particularmente más elevadas en América del Sur. En Uruguay, la neosporosis representa un problema sanitario relevante, con altas tasas de seropositividad, especialmente en rodeos lecheros, y un impacto económico significativo asociado a pérdidas reproductivas.

N. caninum es un parásito apicomplejo con un ciclo de vida heterólogo que involucra a cánidos como hospedadores definitivos y a bovinos como hospedadores intermediarios. La transmisión vertical madre-feto constituye la principal vía de perpetuación de la infección en los rodeos y se asocia tanto a abortos como al nacimiento de terneros congénitamente infectados. A nivel celular, el parásito alterna entre taquizoítos, responsables de la fase aguda de la infección, y bradizoítos, que permiten el establecimiento de infecciones crónicas y la reactivación durante la gestación.

Estudios genómicos recientes han demostrado que *N. caninum* presenta diferencias sustanciales con respecto a *Toxoplasma gondii*, destacándose la expansión de la familia de proteínas de superficie SRS (SAG-related sequence). Estas glicoproteínas, ancladas a la membrana por GPI, desempeñan roles clave en la adhesión, invasión celular, evasión del sistema inmune y adaptación a distintos hospedadores. Dentro de esta familia, las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 se destacan como antígenos de superficie mayoritarios y han sido implicadas en la virulencia y la transmisión transplacentaria del parásito.

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar molecular, estructural y funcionalmente las proteínas de superficie NcSAG1 y NcSRS2 de *N. caninum*, con el fin de elucidar su participación en los procesos de invasión, virulencia y transmisión del parásito. Para ello, se realizaron estudios de modelado estructural tridimensional, expresión y purificación de las proteínas recombinantes, y caracterización biofísica mediante técnicas de cromatografía, dicróismo circular, nanoDSF y dispersión dinámica de luz. Asimismo, se analizó su localización subcelular, su participación en la invasión y proliferación parasitaria, su asociación con vesículas extracelulares y la capacidad neutralizante de anticuerpos específicos en ensayos in vitro.

Los resultados obtenidos evidencian que NcSAG1 y NcSRS2 presentan una elevada conservación estructural a pesar de su divergencia de secuencia, comprobamos la secreción de las proteínas al medio extracelular y su presencia en vesículas, también observamos que favorecen la infección de la célula hospedera por parte de *N. caninum*. Por otra parte realizamos el primer árbol de homología estructural para la familia de proteínas SRS. En conjunto, este trabajo aporta información original y relevante sobre el rol de las proteínas de superficie en la patogénesis de la neosporosis, y contribuyo al desarrollo de herramientas diagnósticas y futuras estrategias vacunales orientadas a reducir la transmisión vertical y el impacto de la enfermedad en la producción bovina

Tabla de contenidos

1.Introducción.....	6
1.1 Impacto de la temática.....	6
1.2 Antecedentes de neosporosis en Uruguay.....	7
1.3 <i>Neospora caninum</i> y su ciclo biológico.....	8
1.3.1 Historia.....	8
1.3.2 Ciclo de vida.....	9
1.4 <i>Neospora caninum</i> : el genoma y las proteínas en la invasión.....	10
1.5 Proteínas de superficie.....	12
2. Hipótesis y Objetivos.....	18
2.1 Hipótesis.....	18
2.2 Objetivo General.....	18
2.3 Objetivos Específicos.....	18
3. Materiales y Métodos.....	19
3.1 Cultivos Celulares.....	19
3.1.1 Cultivo de parásitos.....	19
3.1.2 Ensayos de invasión y proliferación parasitaria.....	20
3.1.3 Transfección y obtención de líneas celulares S2 estables.....	20
3.1.4 Ensayos de infección en presencia de rNcSAG1, rNcSRS2 y medio condicionado.....	21
3.1.5 Aislamiento de vesículas extracelulares.....	21
3.2 Acidos Nucleicos.....	22
3.2.1 Extracción y cuantificación de ARN total.....	22
3.2.2 Clonado de genes y construcción de vectores de expresión.....	22
3.2.3 Evaluación mediante qRT-PCR del cambio de la expresión de NcSAG1 y NcSRS2 durante el estrés.....	23
3.3 Proteínas.....	23
3.3.1 Cromatografía de afinidad.....	23
3.3.2 Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	23
3.3.3 Eliminación de la etiqueta Twin-Strep-tag®.....	24
3.3.4 Fluorimetría diferencial de barrido en nano escala (Nano-scale Differential Scanning Fluorimetry nanoDSF).....	24
3.3.5 Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering DLS).....	24
3.3.6 Dicroísmo circular (far-UV CD).....	24
3.3.8 Crosslink de proteínas.....	25
3.3.9 Visualización de proteínas.....	25
3.4 Inmunológicos.....	26
3.4.1 Generación de anticuerpos.....	26
3.4.2 Western Blot.....	26
3.4.3 Inmunofluorescencia Indirecta.....	26
3.4.4 Ensayo de seroneutralización.....	27
3.4.5 Microscopía de Expansión.....	27
3.5 Análisis bioinformáticos y estadísticos.....	28

3.5.1 Modelado estructural con AlphaFold.....	28
3.5.2 Comparación estructural con Pairwise Structure Alignment.....	28
3.5.3 Comparación estructural con DALI.....	29
3.5.4 Filogenia estructural.....	29
3.5.5 Visualización y análisis.....	29
3.5.6 Procesamiento de imágenes en ImagJ.....	29
3.5.7 Análisis estadístico en GraphPad Prism 8.....	30
4.Resultados.....	31
4.1 Expresión, caracterización y análisis estructural de NcSAG1 y NcSRS2.....	31
4.1.1 Análisis de secuencias y modelado tridimensional.....	32
4.1.2 Expresión y purificación de rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST.....	36
4.1.3 Capacidad inmunogénica y antigénica de las proteínas rNcSAG1 y rNcSRS2.....	39
4.1.4 Caracterización fisicoquímica de rNcSAG1 y rNcSRS2.....	40
4.1.5 Estudio de la estructura secundaria de las proteínas rNcSAG1 y rNcSRS2.....	43
4.1.6 Modelado de las SRS y comparación estructura de las proteínas.....	45
4.2 Localización y efectos en la infección de NcSAG1 y NcSRS2.....	46
4.2.1 Localización celular de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2.....	46
4.2.2 Presencia de NcSAG1 y NcSRS2 en vesículas extracelulares y medio de cultivo.....	50
4.2.3 Búsqueda de interactores de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2.....	52
4.2.4 Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-NcSAG1 y anti-NcSRS2.....	53
4.2.5 Efectos de las proteínas en la infección por <i>N. caninum</i>	53
4.3 Ensayos de atenuación de <i>N. caninum</i>	56
5. Discusión.....	60
6. Conclusiones y perspectivas.....	70
7. Aportes en otros trabajos.....	70
Referencias bibliográficas.....	72
Apéndice I: Cebadores utilizados para la realización de la qPCR.....	80
Apéndice II: Lista de ID de las secuencias pertenecientes a proteínas de la familia SRS.....	81
Apéndice III: Datos estadísticos.....	83
Anexo I: Marcadores de peso molecular.....	91

1.Introducción

1.1 Impacto de la temática

La neosporosis bovina es causada por el parásito *Neospora caninum*. Es una de las principales causas de aborto a nivel mundial, generando pérdidas de miles de millones de dólares al año (1). Estas pérdidas no solo afectan al ganado lechero, sino también al cárnico. La neosporosis se presenta a nivel mundial, con una prevalencia que va desde el 5 al 35%, dependiendo del sistema productivo y las medidas de control que se implementan. Las vacas infectadas crónicamente son capaces de transmitir la enfermedad de madre a feto en el 90% de los casos, siendo esta la forma más frecuente de transmisión. En Estados Unidos se calcula que aproximadamente existen unos 40.000 abortos al año a causa de la neosporosis, que representan pérdidas anuales de 35 millones de dólares (2).

A nivel mundial, numerosos estudios han documentado la alta prevalencia y el impacto económico de la neosporosis bovina. En América Latina, las tasas de infección también son elevadas: en Perú, Puray Ch. et al. (2012) encontraron una prevalencia del 12,4% en vacas adultas; en Ecuador, Guamán Ramírez (2022) registró una prevalencia del 42%; y en México, Ojeda-Carrasco. (2016) reportaron una seroprevalencia de hasta el 51.7%(3–5). En Argentina se han reportado seroprevalencias de 56.9% (6) y en Brasil de un 14% (7). Estas cifras confirman la distribución global de la enfermedad y refuerzan la necesidad de establecer medidas efectivas de control y prevención, adaptadas a las características de cada sistema productivo. En un metanálisis del 2019, se obtuvieron seroprevalencias por región que marcan a América como la región con mayor prevalencia de la neosporosis, siendo América del sur la que presenta mayores seroprevalencias en diferentes estudios para la neosporosis. En la Tabla 1 se puede observar los promedios de seroprevalencias regionales reportadas en este trabajo (8).

Tabla 1. Resumen de la seroprevalencias reportadas en el metanálisis de Ribeiro et al, 2019 (8)

Región	Seroprevalencia (%)	IC 95%
América del Norte y Central	24	19–29
América del Sur	24	20–28
Asia	18	14–21
Europa	15	12–18
África	13	11–16
Oceanía	8	4–14

1.2 Antecedentes de neosporosis en Uruguay

La neosporosis fue diagnosticada por primera vez en Uruguay en el año 1998, fue detectado el parásito en 5 fetos abortados y se obtuvieron por serología 276 vacas positivas para el parásito (9). Este primer diagnóstico demuestra como relevante la neosporosis en Uruguay. En estudios posteriores, se reportó una prevalencia serológica para la neosporosis en rodeo lechero era del 22% y para rodeos de carne 14.3% (10). Posteriormente, se observó que los establecimientos lecheros comerciales con historial de aborto, tenían una tasa mayor de seropositividad que aquellos sin historial (11). Según el trabajo de M. Carrillo et al. en 2018 las pérdidas por abortos causados en bovinos de leche por *N. caninum* fueron de 12 millones de dólares estadounidenses, lo que representa un 3,3% del volumen anual del país (12).

Estos hallazgos subrayan la alta incidencia de *N. caninum* en la ganadería uruguaya, especialmente en sistemas lecheros, donde su presencia se ha asociado directamente con elevadas tasas de aborto y pérdidas económicas considerables. Un estudio realizado en 102 establecimientos lecheros uruguayos determinó una seroprevalencia individual del 23,1%, con valores que variaron entre 0 y 53,3% dependiendo del establecimiento (13). Esta elevada prevalencia no solo repercute en la producción lechera, sino que también tiene un impacto negativo en los sistemas de cría y engorde, ya que la pérdida de terneros reduce significativamente el número de animales destinados a la reposición o al engorde final, afectando directamente la eficiencia productiva y la rentabilidad del sector cárnico.

En nuestro laboratorio se logró el aislamiento y la caracterización molecular de cuatro nuevas cepas de *N. caninum* a partir de terneros infectados congénitamente, las cuales fueron denominadas NcURU1, NcURU2, NcURU3 y NcURU4 (figura 1). Estas cepas fueron comparadas con las cepas de referencia Nc-1 y Nc-Liverpool en cuanto a su capacidad infectiva y replicativa en cultivos celulares. Los resultados demostraron una marcada variabilidad fenotípica entre los aislamientos uruguayos: NcURU1 mostró un perfil biológico y cinético similar al de las cepas de referencia, mientras que NcURU3 presentó diferencias significativas, con una menor tasa de invasión y replicación, lo que la posiciona como la más divergente del grupo. Estos hallazgos indican la existencia de una considerable variabilidad genotípica y fenotípica en las cepas de *N. caninum* que circulan en Uruguay, lo cual tiene implicancias directas en la patogénesis, el diagnóstico y el diseño de estrategias de control adaptadas al contexto local (14).



Figura 1. Mapa de Uruguay que muestra la procedencia geográfica de los aislados de *Neospora caninum* obtenidos en el laboratorio. (13)

1.3 *Neospora caninum* y su ciclo biológico

1.3.1 Historia

N. caninum fue descrito por primera vez a mediados de la década de 1980, cuando Bjerkås et al. (1984) reportaron un protozoo desconocido asociado a casos de encefalitis y miopatías en perros en Noruega (15). Aunque en ese momento no se identificó formalmente como una nueva especie, este hallazgo marcó el inicio del interés científico por el parásito. Fue en 1988 cuando Dubey y colaboradores lograron aislarlo y describirlo morfológica y ultraestructuralmente, diferenciándolo claramente de otros coccidios, como *Toxoplasma gondii* (16). Este trabajo pionero no solo estableció a *N. caninum* como una nueva especie, sino que también sentó las bases para el estudio de su ciclo biológico y su patogenicidad.

Durante los años siguientes, la investigación se centró en demostrar su importancia veterinaria, particularmente como agente etiológico principal de abortos en bovinos (17). Estos estudios evidenciaron que la transmisión transplacentaria es una de las vías de perpetuación de la infección en el ganado, lo cual tuvo un impacto significativo en la comprensión epidemiológica de la enfermedad y en el desarrollo de estrategias de control. A raíz de la demostración de su implicancia en abortos bovinos, se comenzaron a desarrollar y validar pruebas serológicas específicas, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ELISA, que permitieron diagnosticar infecciones de forma masiva y estudiar su prevalencia en distintos países (18–20). Estos avances también facilitaron la identificación de factores de riesgo asociados a la infección y contribuyeron a dimensionar su impacto económico, consolidando a la neosporosis como una preocupación sanitaria global en la producción ganadera.

Investigaciones más recientes comenzaron a centrarse en los mecanismos de interacción entre el parásito y su hospedador, así como en el desarrollo de estrategias vacunales dirigidas a prevenir su transmisión y efectos patogénicos. Hemphill y Gottstein (2000) describieron detalladamente las características celulares y moleculares del parásito, subrayando su capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador y establecer infecciones crónicas, especialmente en el sistema nervioso central y la placenta (21). Los principales avances en vacunas experimentales para la neosporosis, incluyeron formulaciones con parásitos vivos atenuados, vacunas inactivadas, subunidades recombinantes y ADN, aunque hasta ese momento ninguna había demostrado una eficacia y seguridad suficientes para su uso comercial en bovinos (22,23). Más recientemente, investigaciones centradas en proteínas clave en la adhesión e invasión celular —como NcSAG1, NcMICs y NcGRAs— han abierto nuevas perspectivas para el diseño de vacunas más específicas y eficaces (24–27), posicionando a estos antígenos como candidatos prometedores para el desarrollo de inmunógenos adaptados al control de la neosporosis.

1.3.2 Ciclo de vida

N. caninum es un protozoo del filo Apicomplexa que presenta un ciclo de vida heterólogo, involucrando un hospedador definitivo, cánidos (familia *Canidae*), donde ocurre la reproducción sexual, y hospedadores intermediarios, principalmente bovinos, donde se desarrolla la reproducción asexual (2,21,22,28). La infección por *N. caninum* puede producirse por la ingesta de los ooquistes que contaminan el ambiente o la transmisión transplacentaria; estos tipos de transmisión también se conocen como transmisión horizontal y transmisión vertical respectivamente (Figura 2).

En el hospedador definitivo, los ooquistes resultantes de la reproducción sexual se liberan en las heces y contaminan el ambiente, donde pueden infectar a hospedadores intermediarios a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados (2). Una vez en el intestino del hospedador intermediario, los ooquistes liberan esporozoítos, que penetran las células, diferenciándose en taquizoítos, la forma de proliferación rápida y más infectiva del parásito. Los taquizoítos son responsables de la fase aguda de la infección, generando daño tisular (2).

A medida que progresa la infección y se establece la respuesta inmune del hospedador, los taquizoítos se transforman en bradizoítos, formas de replicación lenta que se agrupan en quistes tisulares, especialmente en el sistema nervioso y en el tejido muscular (29). Este pasaje de taquizoíto a bradizoíto implica cambios significativos en el parásito, incluyendo modificaciones en la expresión de proteínas de superficie que permiten la evasión inmune y la persistencia crónica dentro del hospedador (21). Estas adaptaciones contribuyen a la capacidad del parásito para evitar la eliminación inmunológica y establecer infecciones latentes que pueden reactivarse, especialmente durante la preñez, facilitando la transmisión vertical (30). Estapuede dar lugar a la pérdida del feto por aborto, al nacimiento de un ternero congénitamente infectado asintomático o congénitamente infectado con síntomas de ataxia, parálisis, entre otras, llevando a la muerte prematura del mismo.

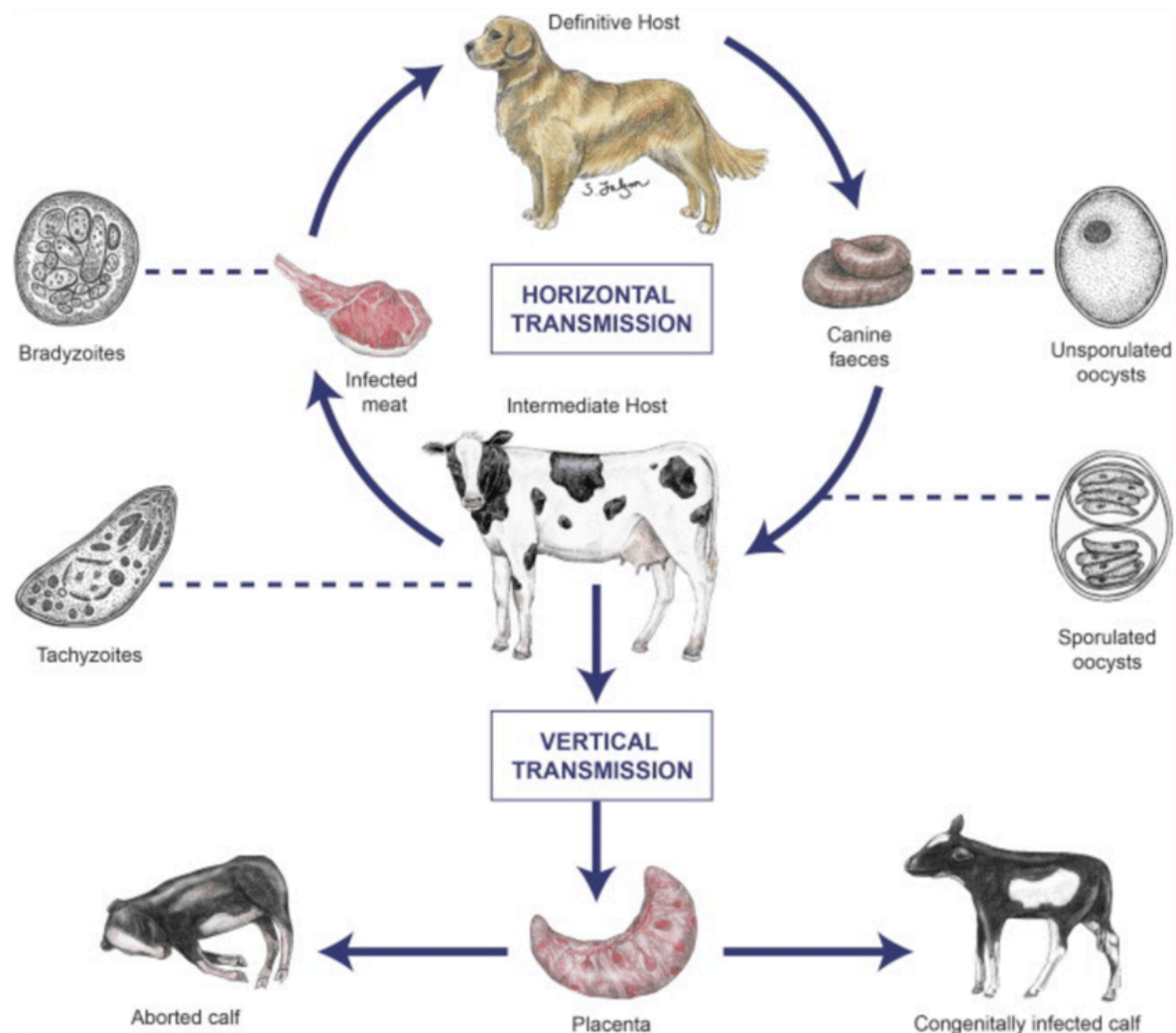


Figura 2. Ciclo biológico de *N. caninum* extraído de Goodweson et al, 2013 (31)

Durante una infección aguda, *N. caninum* puede atravesar la barrera transplacentaria, lo que con frecuencia se asocia a abortos en el ganado bovino. Este tipo de transmisión vertical es responsable de las denominadas tormentas de aborto. Por otro lado, en animales crónicamente infectados, el parásito puede reactivarse y también transmitirse al feto a través de la placenta. El ciclo se completa cuando el hospedero definitivo se infecta por la ingesta de quistes presentes en los tejidos contaminados de los hospederos intermediarios.

1.4 *Neospora caninum*: el genoma y las proteínas en la invasión

Estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran que, contrariamente a lo que se consideraba previamente, el genoma de *N. caninum* presenta diferencias significativas respecto al de *T. gondii*, no solo en la organización genómica sino también en el número y la estructura cromosómica (32). En particular, se ha observado una notable expansión en la familia de proteínas de superficie SRS (*SAG-related sequence*), con más de 200 genes identificados en *N. caninum*, una cifra considerablemente superior a la presente en *T. gondii* (32,33).

La expansión del repertorio SRS ha sido asociada con la capacidad del parásito para adaptarse a una amplia gama de hospedadores intermediarios, lo cual podría explicar su eficiencia en la invasión de diversos tipos celulares y su amplio rango de tropismo tisular(34). Además, la expresión diferencial de proteínas SRS durante las fases de taquizoíto y bradizoíto, y entre cepas con distintos grados de virulencia, indica que esta familia no solo cumple funciones estructurales, sino que también está implicada directamente en la evasión inmune y la adaptación ambiental del parásito (35–38). En conjunto, la expansión de la familia SRS en *N. caninum* constituye un factor clave en su biología invasiva y representa un conjunto de blancos prometedores para el desarrollo de vacunas más específicas y efectivas. En este sentido, se propone que la combinación de antígenos de superficie con proteínas secretadas podría incrementar significativamente la eficacia de las vacunas experimentales contra la neosporosis (39).

Ambos parásitos utilizan mecanismos moleculares similares para invadir células hospedadoras, basados en la secreción secuencial de proteínas desde orgánulos apicales especializados: micronemas, roptrias y gránulos densos. En *T. gondii* se ha descrito que el proceso se inicia con el contacto superficial mediado por proteínas SRS como TgSAG1 y TgSRS2, que se unen a proteoglicanos sulfatados como condroitín sulfato y heparán sulfato (22,40). Esta interacción inicial es de baja afinidad y reversible, permitiendo una adhesión transitoria que facilita el reposicionamiento del parásito sobre la superficie celular. Posteriormente, se produce la secreción de proteínas de micronema (MICs), como MIC3 y MIC6, que actúan como adhesinas de alta afinidad, conectando al parásito con receptores hospedadores y vinculando esta unión al sistema actina-miosina intracelular, responsable de la motilidad (41). Luego, proteínas de roptria, como RON2, RON4 y RON5, interactúan con AMA1 (también secretada por micronemas), formando la unión móvil que media la entrada activa del parásito a través de la membrana celular del hospedador (2,42). Finalmente, las proteínas de los gránulos densos (GRAs) modifican la vacuola parasitófora para crear un ambiente favorable para la replicación del parásito, protegiéndolo de las respuestas inmunes del hospedador (43).

Aunque este proceso generalmente es compartido entre *N. caninum* y *T. gondii*, existen diferencias significativas en las características estructurales y funcionales de sus respectivas proteínas. Por ejemplo, *N. caninum* expresa variantes únicas de SRS, como NcSRS67, que no tiene homólogo directo en *T. gondii*, así como diferencias en la expresión de algunas de estas proteínas, como NcSRS17, lo cual podría afectar su inmunogenicidad y especificidad celular (44,45). A nivel funcional, se ha demostrado que *T. gondii* posee factores de virulencia ausentes o inactivos en *N. caninum*: TgROP18 y TgROP16 son proteínas roptriales clave que modulan la respuesta inmune del hospedador mediante la fosforilación de IRGs o la activación de STATs, mientras que sus homólogos en *N. caninum* carecen de actividad catalítica o de efecto sobre STAT6 (46,47).

En resumen, aunque *N. caninum* y *T. gondii* comparten una maquinaria molecular básica de invasión, las variaciones en la composición, regulación y función de sus proteínas determinan diferencias sustanciales en el tropismo, la virulencia y la inmunogenicidad. La notable expansión de la familia SRS en *N. caninum*, junto con las divergencias funcionales en proteínas secretadas, sugiere adaptaciones evolutivas específicas que podrían ser explotadas tanto para el diagnóstico diferencial como para el desarrollo de vacunas dirigidas.

1.5 Proteínas de superficie

La superficie celular de *N. caninum* está compuesta principalmente por proteínas de la familia SRS (*SAG-related sequence*), que constituyen los antígenos de superficie más abundantes del parásito. La familia SRS corresponde a un grupo de glicoproteínas ancladas a la membrana del parásito mediante anclajes de glicofosfatidilinositol (GPI). Estas proteínas fueron descritas por primera vez en *T. gondii* como los principales antígenos de este parásito. En sus primeras descripciones se utilizaba su masa molecular aparente para nombrarlas, siendo denominadas como p30, p29, p43, etc (46–48). En 1991, se propuso nombrarlas utilizando según su localización subcelular, así es como p30 de *T. gondii* pasó a nombrarse como SAG1, por sus siglas en inglés *surface antigen 1*, y numeradas de acuerdo al orden en que fueron descriptas (49). Conforme se fueron conociendo más miembros de esta familia, con el conocimiento del genoma de *T. gondii*, y encontraron variaciones, se denominaron SRS, de las siglas en inglés *SAG-related sequence*. La familia SRS ha sido descrita exclusivamente en parásitos apicomplexos, particularmente dentro de la subclase Coccidia.

Las SRS presentan una identidad de secuencia que oscila entre el 25 y el 30 %, con un peso molecular que oscila entre 30 y 45 kDa. Estas proteínas presentan ciertas características altamente conservadas, que comprenden, un péptido señal en el N-terminal, entre 8 y 12 residuos de cisteína, cuatro residuos de prolina, un residuo de triptófano ubicado en la región próxima a la membrana, una región bisagra, que une los dominios y el anclaje GPI, también la mayoría de las proteínas de esta familia están formadas por dos dominio, denominados D1 y D2 (Figura 3), aunque se han encontrado algunas que presentan un único dominio o hasta 4 en el caso de *N. caninum* (36,44,50,51). Como se mencionó, la familia SRS se encuentra expandida en *N. caninum* con respecto a *T. gondii*; se encuentran varias SRS ortólogas entre ambos parásitos y otras que son únicas. En los estudios de genoma se ha observado que estas proteínas se disponen en tándem, lo que supone una evolución por duplicación de genes y por recombinación. En concordancia con estos estudios filogenéticos, se muestra cómo estas proteínas se agrupan según el estadio de expresión (Figura 4). También se muestra la división en dos grandes subfamilias de estas proteínas denominadas SAG y SAG2A, dado que estas dos subfamilias se agrupan según su homología de secuencia con TgSAG1 o TgSAG2A, respectivamente (36,52).

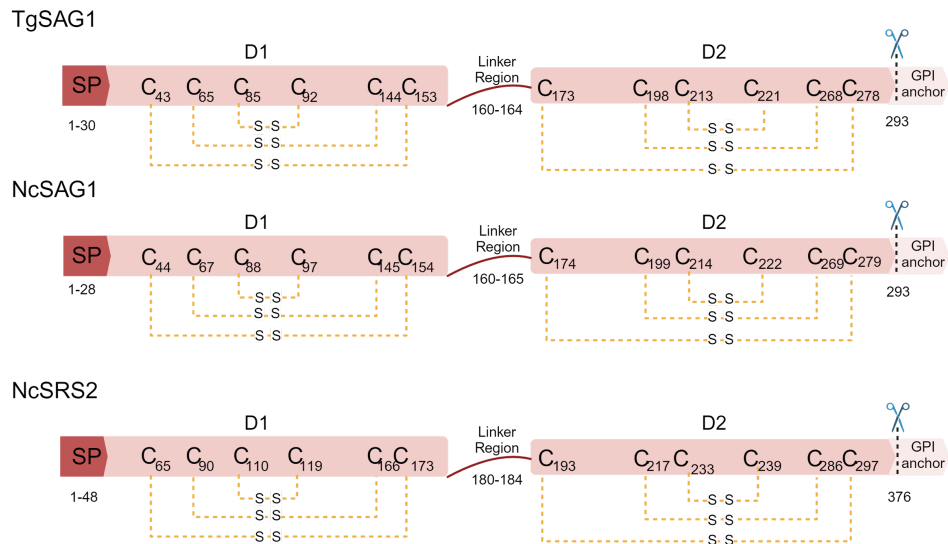


Figura 3. Esquema de las características altamente conservadas entre las proteínas de la familia SRS.

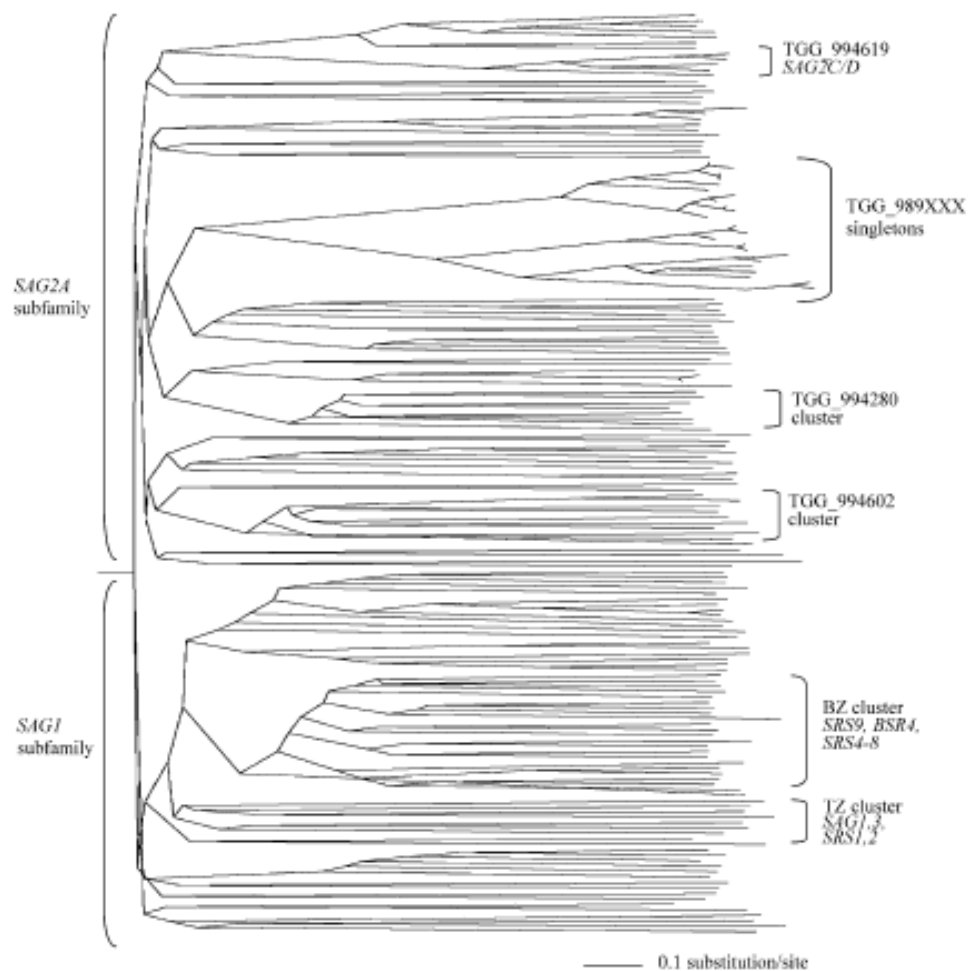


Figura 4. Árbol filogenético de las SRS de *T. gondii* extraído de Jung et al., 2004

Algunas proteínas SRS se han caracterizado estructural y funcionalmente, pero su función global y las razones de la amplia expansión de esta familia en *N. caninum* aún no se comprenden por completo. Se propone que esta expansión se asocia a cambios en la virulencia y a la ampliación del espectro de hospederos. Existen trabajos en los que se observa que en las cepas menos virulentas de *N. caninum* se expresa una mayor variedad de estas proteínas (53). Existen diferencias en el perfil de SRS que se expresan durante el estadio de taquizoíto con respecto al estadio bradizoíto (36,37), y en los estudios se ha visto que las cepas menos virulentas expresan un mayor número de SRS bradizoíto-like. Estos datos podrían hacer referencia a su rol inmunomodulador y de evasión del sistema inmune por parte del parásito (35,53).

Se conoce la estructura cristalográfica de TgSAG1, TgSporoSAG y TgBSR4 (54–56). Estos estudios mostraron claramente la existencia de dos dominios formados por hojas beta plegadas, tanto antiparalelas como paralelas, estabilizadas por tres puentes disulfuro altamente conservados. En el estudio de la resolución TgSAG1 se observó que esta cristaliza como homodímero, mencionando que la dimerización recuerda a la forma de una inmunoglobulina (Figura 5). También se pudo modelar y observar que en el caso de TgSAG3 en la hendidura formada por el homodímero era posible acomodar una heparina, lo que concuerda con los estudios que proponen la interacción de estas proteínas con estos compuestos (56). A diferencia de TgSAG1, TgSporoSAG no parecería dimerizar, lo que podría sugerir un rol diferente para esta proteína (55).

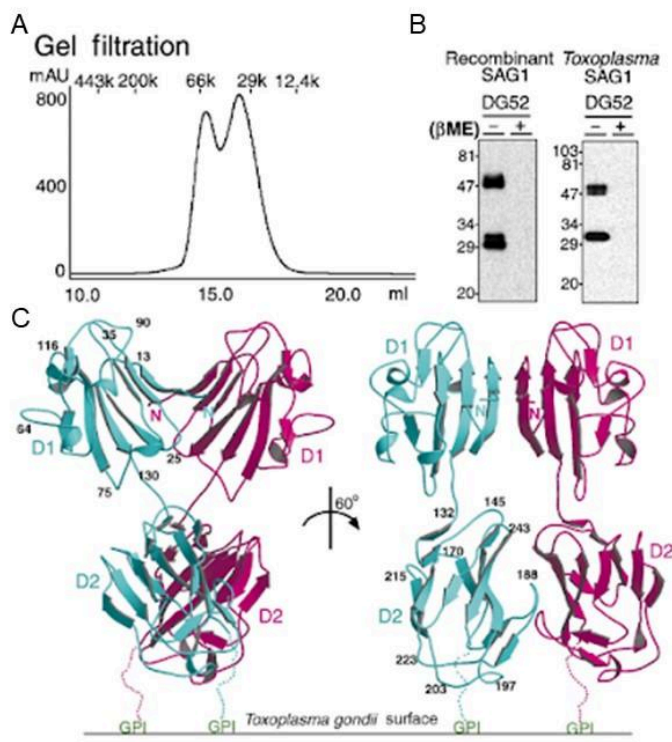


Figura 5. Modelado de la estructura cristalográfica obtenida para TgSAG1. (A) Análisis por gel filtración de rTgSAG1. (B) Western blot que evidencia la presencia de dímeros estables en SDS, tanto de rTgSAG1 como de TgSAG1 nativo derivado del parásito. (C) Dos vistas en representación de cintas del dímero de SAG1. Un monómero se muestra en rosa y el otro en cian. Extraída de He et al., 2002 (56)

En *N. caninum*, entre los miembros mejor caracterizados de esta familia destacan NcSAG1 (también conocido como Ncp36) y NcSRS2 (también denominado Ncp43 o Ncp35), cuya participación en la adhesión e invasión de células hospedadoras ha sido ampliamente documentada (57–60). Se ha demostrado la localización en la superficie celular de NcSAG1 (Figura 6) y se sabe que está codificada por un gen de copia única, cuya expresión disminuye durante el estadio de bradizoíto (Figura 7) (48,60,61).

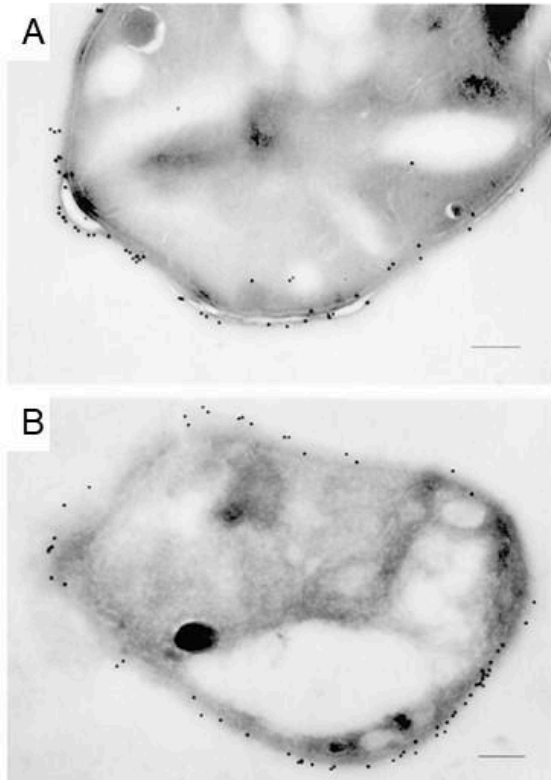


Figura 6. Micrografía que muestra la marcación de NcSAG1 y NcSRS2 mediante inmunogold, (A) se observa la marcación de NcSAG1. (B) Se observa la marcación de NcSRS2, en ambos se evidencia su localización en la superficie del parásito *N. caninum* extraída de Howe et al., 1998 (48).

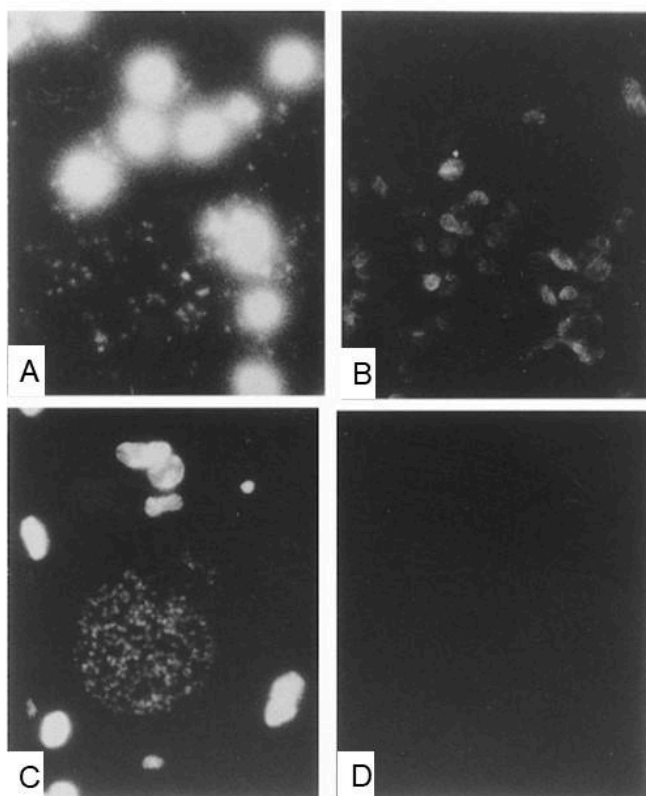


Figura 7. Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la marcación de la proteína NcSAG1 en *N. caninum*. Las imágenes (A) y (B) corresponden a taquizoítos, mientras que (C) y (D) corresponden a bradizoítos, todos marcados con un anticuerpo anti-NcSAG1. Extraídos de Sonda et al., 1998 (60)

Diferentes estudios han demostrado que NcSAG1 está involucrada en los procesos de adhesión del parásito y posterior invasión (59). Un estudio funcional clave sobre NcSAG1 fue realizado mediante su eliminación dirigida por la técnica CRISPR/Cas9. Los resultados mostraron que la cepa mutante NcSAG1KO presentaba una capacidad reducida de invasión y egreso celular *in vitro*. Asimismo, en modelos murinos, los animales infectados con NcSAG1KO exhibieron una mayor tasa de supervivencia y una menor pérdida de peso en comparación con aquellos infectados con la cepa parental Nc-1, lo que evidencia que NcSAG1 es un determinante crucial de la virulencia (62). Particularmente relevante es el hallazgo de que la delección de NcSAG1 redujo la transmisión vertical del parásito en modelos murinos, al disminuir la carga parasitaria en el cerebro de las crías sobrevivientes y aumentar su tasa de supervivencia. Este efecto resalta el rol esencial de NcSAG1 en la patogénesis tanto en el hospedador adulto como en la transmisión transplacentaria (62). Además, NcSAG1 ha sido evaluada como antígeno vacunal en diversos estudios, mostrando capacidad para inducir respuestas inmunes celulares del tipo Th1, consideradas clave en la protección frente a la neosporosis (63). En este contexto, su inclusión en formulaciones vacunales, ya sea sola o en combinación con otros antígenos, como proteínas de choque térmico, ha mostrado resultados prometedores en la prevención de la infección fetal.

Por su parte, NcSRS2 es el segundo antígeno de *N. caninum* reportado (48). La localización no solo en la superficie del parásito, sino también en organelos de secreción como roptrias y gránulos densos (Figura 8) (64) Haldorson et al. (2006) demostraron que el uso de

anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra NcSRS2 reduce de manera significativa la capacidad de los taquizoítos para adherirse e invadir células trofoblásticas placentarias in vitro, lo que subraya el papel central de esta proteína en la infección transplacentaria y la patogénesis reproductiva (65). Esta proteína ha sido ampliamente utilizada en diversos ensayos como antígeno vacunal, demostrando su capacidad para disminuir la transmisión vertical y la virulencia (58,66–68).

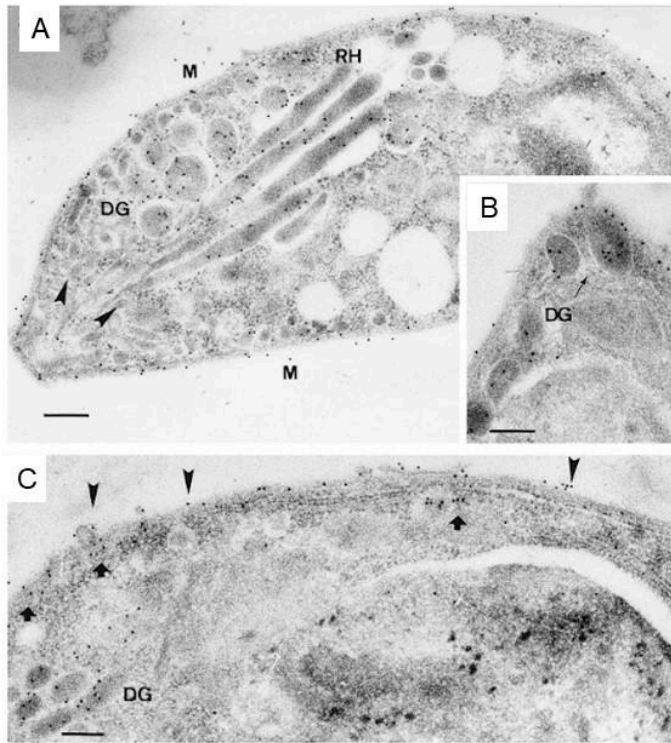


Figura 8. Micrografía en la que se observa la marcación con partículas de oro de la proteína NcSRS2 en *N. caninum*. (A) es la imagen de una taquizoito donde DG corresponde a los gránulos densos, M a la membrana y RH a las roptrias. (B) corresponde a un zoom de las zona apical. (C) muestra la sección de la membrana del parásito. Extraído de Hemphill, 1996 (64).

En conjunto, los datos disponibles posicionan a las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 como componentes esenciales en la biología invasiva, la evasión inmunológica y la patogénesis reproductiva de *N. caninum*. Estas proteínas constituyen blancos estratégicos tanto para el diagnóstico diferencial como para el diseño de vacunas específicas orientadas a reducir la transmisión vertical de la neosporosis.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Las proteínas de superficie NcSAG1 y NcSRS2 desempeñan funciones esenciales en la adhesión, invasión, modulación inmunitaria y establecimiento de la infección por *Neospora caninum*, y sus propiedades estructurales y bioquímicas determinan diferencias en su contribución a la patogénesis y a la transmisión del parásito.

2.2 Objetivo General

Caracterizar molecular, estructural y funcionalmente las proteínas de superficie NcSAG1 y NcSRS2 de *Neospora caninum*, para elucidar su participación en los procesos de invasión, virulencia y transmisión del parásito.

2.3 Objetivos Específicos

1. Modelar las estructuras tridimensionales de NcSAG1 y NcSRS2 y compararlas tanto entre sí como con el repertorio completo de proteínas SRS de *N. caninum*, con el fin de situarlas en el marco evolutivo y estructural de esta familia.
2. Expresar y purificar las proteínas recombinantes NcSAG1 y NcSRS2 en un sistema eucariota y caracterizar sus propiedades físico-químicas (estabilidad térmica, estado de oligomerización, estructura secundaria) mediante cromatografía de exclusión molecular, dicroísmo circular, nanoDSF y DLS.
3. Determinar la localización subcelular de NcSAG1 y NcSRS2 en taquizoítos y bradizoítos de *N. caninum* y evaluar su participación en los procesos de adhesión, invasión y proliferación del parásito en células hospedadoras.
4. Investigar la asociación de NcSAG1 y NcSRS2 con las vesículas extracelulares liberadas por *N. caninum*.
5. Evaluar y comparar la capacidad neutralizante *in vitro* de anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra NcSAG1 y NcSRS2, en ensayos de invasión y proliferación parasitaria.

3. Materiales y Métodos

3.1 Cultivos Celulares

3.1.1 Cultivo de parásitos

Se utilizaron dos cepas diferentes de *N. caninum*, una de mayor virulencia la cepa Liverpool (NcLiv), ampliamente utilizada como de referencia en los laboratorios y muy bien caracterizada genética y fenotípicamente. La otra cepa utilizada fue NcUru1, una cepa aislada y caracterizada genética y fenotípicamente en nuestro laboratorio. Dicha cepa tiene menor virulencia en comparación con la cepa de referencia(14). Los taquizoítos de ambas cepas se mantuvieron en cultivo en células Vero, incubadas a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Para el mantenimiento de los cultivos celulares, se utilizó medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tamponado con bicarbonato (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), suplementado con 5% de suero bovino inactivado (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y una mezcla de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) (59).

Para inducir la conversión de taquizoítos a bradizoítos en ambas cepas de *N. caninum*, se empleó un protocolo de estrés *in vitro* basado en condiciones de pH alcalino y ausencia de intercambio gaseoso. Para ello, monocapas de células Vero al 80% de confluencia fueron infectadas con diferentes dosis de taquizoítos según la cepa. Para la cepa de menor virulencia (NcURU1) se utilizaron 5×10^3 taquizoítos; en cambio, para la cepa NcLiv se utilizó una dosis de 2.5×10^3 taquizoítos. La infección se realizó en medio de cultivo DMEM modificado al pH 8 y las botellas se cerraron herméticamente para impedir el intercambio de gases durante todo el experimento. Este protocolo surge de la combinación de protocolos previamente utilizados tanto para *N. caninum* como para *T. gondii* (69,70).

Los cultivos infectados se mantuvieron bajo estas condiciones durante 10 días. Finalizado este período, los parásitos fueron recuperados. Para ello, se realizó un raspado de la monocapa infectada y luego se homogeneizó y se pasó por una jeringa directamente del sobrenadante, según el estado de la monocapa celular.

Para ello se realizaron dos posibles procedimientos:

1. En el caso de la capa lisada se recuperó el sobrenadante, se centrifugó y resuspendió en medio fresco
2. En el caso de que aún hubiera monocapa:
 - 2.1. Se realizó un raspado
 - 2.2. Se homogeneizó
 - 2.3. Se pasó por jeringa
 - 2.4. Se centrifugó y resuspendió en medio fresco

Los parásitos recuperados se utilizaron para reinfectar nuevas monocapas de células Vero, manteniendo las mismas condiciones de pH alcalino y ausencia de intercambio gaseoso. Este proceso de pasaje se repitió durante un total de 40 días

Cada 20 días, uno de los cultivos fue destinado a la realización de ensayos funcionales de invasión y proliferación, con el fin de evaluar la capacidad infectiva y replicativa de los parásitos sometidos al tratamiento de estrés.

3.1.2 Ensayos de invasión y proliferación parasitaria

Con el objetivo de evaluar la infectividad de *N. caninum*, se realizaron ensayos de invasión y proliferación en células Vero, utilizando la inmunofluorescencia indirecta (IFI) como método de cuantificación.

El ensayo se llevó a cabo en placas de 12 pocillos, en cuyos fondos se colocaron previamente cubreobjetos estériles para permitir la adhesión de las células Vero en monocapa. Posteriormente, se infectaron con una cantidad conocida de parásitos, estableciendo así la multiplicidad de infección (MOI) definida como la relación parásito/célula. La MOI utilizada en cada ensayo se definió en el momento de infección debido a que no podemos prever la cantidad de parásitos que se recuperaron post estrés, por esto cada experimento también incluyó un control en la misma MOI de parásitos sin estrés. Para sincronizar la infección, las placas se centrifugaron a $200 \times g$ durante 5 minutos, asegurando el contacto simultáneo de los parásitos con las células hospedadoras.

Las infecciones se mantuvieron a diferentes tiempos de incubación:

- Ensayo de invasión: 1 h y 4 h post-infección.
- Ensayo de proliferación: 24 hs y 48 hs post-infección.

Transcurridos los tiempos correspondientes, se realizó un lavado con PBS 1x de forma de eliminar los parásitos que no estén adheridos al cultivo celular. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído (PAF) al 3% en PBS 1x y procesadas para IFI, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.3. Con el único cambio de que se utilizó como primario suero de ratón infectado con *N. caninum* en una dilución de 1/100.

Una vez finalizada la tinción, las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Para los ensayos de invasión se cuantificó la cantidad de parásitos adheridos o internalizados sobre el número total de células en el campo. En total se tomaron aleatoriamente diez campos. En el caso de los ensayos de proliferación, se contabilizaron la cantidad de parásitos por vacuola parasitófora, así como el número total de células dentro del campo evaluando. Al igual que en el ensayo de invasión se utilizaron diez campos al azar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado independiente.

Los datos obtenidos se expresaron como el promedio de parásitos y células por campo y se compararon con la proporción de infección esperada en función de la MOI. Finalmente, los resultados se representaron en forma de porcentaje de infección observada respecto al valor teórico calculado.

3.1.3 Transfección y obtención de líneas celulares S2 estables

Las células S2 son derivadas del cultivo primario de embriones tardíos de *Drosophila melanogaster*, que fueron aisladas por Schneider en 1972 (71). Actualmente se trata de una línea comercial que puede aparecer como S2 o *Schneider's Drosophila Line 2*.

Para generar líneas celulares S2 estables que expresaran rNcSAG1-ST, rNcSRS2-ST, se realizó una co-transfección con el vector de expresión correspondiente y el plásmido de selección pCoPuro en una proporción 2:1, de acuerdo con lo descrito previamente por Carrión et al. 2023 (72). Las transfecciones se efectuaron utilizando el sistema *ExPERT STx* con ensamblajes de procesamiento OC-400 (MaxCyte).

Las células transfectadas fueron seleccionadas a 28 °C en medio *Insect Xpress* (LONZA) suplementado con 6 µg/mL de puromicina. Posteriormente, las líneas celulares estables se cultivaron en frascos de vidrio a 28 °C, con agitación orbital a 110 rpm. La inducción de la expresión proteica se realizó a una densidad de 5×10^6 células/mL mediante la adición de 5 µM de CdCl₂. Entre los tres y cuatro días posteriores a la inducción, las células se recolectaron por centrifugación (150 × g, 5 minutos), se recuperaron los sobrenadantes, se ajustaron a pH 8,0 y se almacenaron para la purificación proteica (sección 3.3.1).

3.1.4 Ensayos de infección en presencia de rNcSAG1, rNcSRS2 y medio condicionado

Para evaluar el posible papel de las proteínas rNcSAG1 y rNcSRS2 y del medio condicionado en la infección por *N. caninum*, se realizaron ensayos de infección en diferentes condiciones de incubación con células Vero. Las diferentes condiciones de incubación fueron: medio condicionado, proteínas, su combinación y por último el control utilizando la cepa NcLIV. Como forma de control se utiliza también el medio condicionado (el cual es un medio proveniente de células Vero infectadas con NcLiv por 48hs y filtrado mediante membranas de 0,2 µm para eliminar restos de parásito) ya que este presenta la forma nativa de estas proteínas entre otras proteínas del parásito. Las monocapas se incubaron durante 30 minutos con 10 µg/mL de NcSAG1, 10 µg/mL de NcSRS2, una mezcla de ambas proteínas (5 µg/mL de cada una) o con medio condicionado. El ensayo fue llevado a cabo en placas de 12 pocillos para las placas a revelar mediante IFI y de 6 pocillos para las placas reveladas con Giemsa.

Finalizado el período de incubación, los cultivos se lavaron dos veces con PBS. Las diferentes condiciones se infectaron con la cepa NcLIV en una relación 1:1 parásito/célula. La infección se mantuvo durante 48 h. Posteriormente las placas se procesaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) (según se describe en la sección 3.4.3) o tinción con Giemsa, según correspondiera. Para la tinción con Giemsa, las células fueron fijadas con metanol durante 5 minutos y posteriormente incubadas con Giemsa 1x durante 2 minutos y lavadas con agua destilada.

Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el programa ImageJ (73). En el caso de la IFI, se cuantificó el área ocupada por los parásitos, mientras que en las muestras teñidas con Giemsa se determinó el área correspondiente a la lisis celular.

3.1.5 Aislamiento de vesículas extracelulares

El aislamiento de vesículas extracelulares de *N. caninum* se realizó mediante pasos de centrifugación, siguiendo protocolos descritos en otros artículos (74–76). En distintos tiempos post infección (12, 24, 36 y 48 horas) y con taquizoítos incubados en medio de cultivo durante 3 horas, se recolectó el sobrenadante del cultivo y se centrifugó a $3000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C para eliminar los parásitos. Luego, se utilizó un filtro de $0,20\ \mu\text{m}$ para eliminar las vesículas apoptóticas y los restos celulares. Posteriormente, se realizaron dos tratamientos diferentes, que ayudan a verificar si las proteínas se encuentran dentro de las vesículas:

- A. Los sobrenadantes fueron tratados con proteinasa K ($100\ \mu\text{g/mL}$) durante 1 hora a 37°C . Luego, la suspensión se centrifugó nuevamente durante 1 hora y 30 minutos a 4°C a $150.000 \times g$.
- B. Los sobrenadantes se centrifugaron durante 1 hora y 30 minutos a 4°C a $150.000 \times g$; el pellet se resuspendió en PBS con 1% de Tritón X100 y se trató con proteinasa K ($1\ \text{mg/mL}$) durante 1 hora a 37°C . La suspensión se centrifugó nuevamente durante 1 hora y 30 minutos a 4°C a $150.000 \times g$.

En ambos casos, el pellet final se resuspendió en PBS y se evaluó mediante Western blot (sección 3.4.2).

3.2 Ácidos Nucleicos

3.2.1 Extracción y cuantificación de ARN total.

La extracción de ARN total de *N. caninum* se realizó utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen), según el protocolo descrito por el fabricante. Las muestras utilizadas para la extracción se obtuvieron de monocapas de células infectadas. Para la purificación de parásitos se realiza la ruptura mecánica de la monocapa, en el caso de ser necesario (con rastrillo, etc). Posteriormente, se colectaron los parásitos por centrifugado a $3000\ g$, por 10 minutos. Se realizan tres lavados con PBS 1X. Se filtran con filtro de $3.0\ \mu\text{m}$ *PC Membrane Isopore*™. Una vez filtrados, se guardan en trizol a -80°C , para luego extraer el ARN. El ARN se cuantificó con el kit Qubit (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

3.2.2 Clonado de genes y construcción de vectores de expresión

Se seleccionaron dos proteínas de superficie de *N. caninum* asociadas a un estadio específico para su producción recombinante: NcSAG1, NcSRS2. Ambas proteínas son características del estadio taquizoíto y desempeñan un papel fundamental en los procesos de adhesión e invasión de las células hospedadoras.

Las construcciones de expresión se diseñaron a partir de las secuencias de ADN que codifican los aminoácidos 31–317 de NcSAG1 (GenBank: AF123660) y 54–401 de NcSRS2 (GenBank: AF061249). Cada secuencia fue fusionada en su extremo C-terminal a un sitio de corte de enteroquinasa, seguido de una etiqueta *Twin-Strep-tag*® (IBA) y un codón de terminación. Todas las secuencias fueron optimizadas para el uso de codones de *Drosophila melanogaster* y sintetizadas por la empresa GenScript.

Los genes sintéticos se clonaron en el vector de expresión *pMT/V5-His* (Invitrogen), inmediatamente después de la secuencia señal *BiP*, que es responsable de la secreción de las proteínas al sobrenadante, siguiendo el procedimiento previamente descrito por Carrión et al. 2023 (72).

3.2.3 Evaluación mediante qRT-PCR del cambio de la expresión de NcSAG1 y NcSRS2 durante el estrés

Se tomaron 100 ng de ARN y se retrotranscribió empleando oligo dT y la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). La expresión génica se cuantificó mediante qRT-PCR en formato TaqMan, utilizando un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900HT. Los juegos de cebadores y sondas empleados se detallan en la Tabla 4 del apéndice I.

El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de 2 minutos a 50 °C, seguida de una incubación de 10 minutos a 95 °C, y posteriormente 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. El gen 28S rRNA de *N. caninum* se utilizó como control endógeno para la normalización de la cantidad de transcritos. Los niveles de expresión génica se representaron como $2^{-\Delta CT}$, indicando los niveles absolutos de transcritos en relación con el mismo día del gen s28. También se realiza un análisis donde la expresión relativa se representa como $2^{-\Delta\Delta CT}$, con respecto al gen Ncsag1 en el día 0 para NcURU1 y día 10 para NcLiv.

3.3 Proteínas

3.3.1 Cromatografía de afinidad

Las proteínas recombinantes se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad. Los sobrenadantes se clarificaron por centrifugación ($6.000 \times g$, 10 °C) y se cargaron en columnas *Strep-Tactin®XT 4Flow®* de 5 mL (IBA), a un caudal de 2 mL/min. Las columnas se lavaron con 5–6 volúmenes de tampón de almacenamiento (0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA). La elución se realizó con 10 mL de tampón *BXT 1x* (IBA), que se dejó incubar en la columna durante 15 minutos antes de continuar el lavado con tampón de almacenamiento, hasta que la absorbancia a 280 nm descendiera a valores basales. Se recolectaron los picos de elución en los que se encuentran las proteínas recombinantes.

3.3.2 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Para el SEC las columnas se equilibraron en tampón de almacenamiento durante toda la noche (aproximadamente 16 h) a un flujo de 0.5 mL/min. Se realizó un primer SEC para las proteínas rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST, utilizando columnas Superdex 200 Increase 10/300 GL o HiLoad Superdex 200 16/600 pg (Cytiva) en tampón de almacenamiento.

Posteriormente se realizó un análisis de las proteínas mediante SEC utilizando la columna Superdex 200 Increase 10/300 GL (Cytiva), previamente equilibrada con el tampón de almacenamiento. Se inyectaron 100 µL de la muestra y la elución se efectuó a un flujo constante de 0,5 mL/min. Para estimar el peso molecular de las proteínas. En este caso, la columna se calibró empleando los kits de calibración de filtración en gel de bajo peso

molecular (*Low Molecular Weight, LMW*) y alto peso molecular (*High Molecular Weight, HMW*) (Cytiva), bajo las mismas condiciones experimentales.

3.3.3 Eliminación de la etiqueta Twin-Strep-tag®

La etiqueta de purificación se eliminó incubando las proteínas purificadas por SEC con Enterokinasa-His (GenScript) (20 U/mg) durante la noche a 25 °C. Para eliminar la etiqueta se realizó una cromatografía de afinidad, como se describió anteriormente, recuperando las proteínas escindidas (rNcSRS2* y rNcSAG1*) en la fracción de flujo. Estas proteínas se vuelven a purificar por SEC según se describió anteriormente.

3.3.4 Fluorimetría diferencial de barrido en nano escala (Nano-scale Differential Scanning Fluorimetry nanoDSF)

La termoestabilidad de rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST en solución se analizó mediante nanoDSF utilizando un equipo Prometheus NT.48 (Nanotemper). Las curvas de desnaturalización y renaturalización se obtuvieron midiendo la fluorescencia de emisión intrínseca a 350 y 330 nm durante ciclos de calentamiento y enfriamiento secuenciales a una velocidad de 1 °C/min, en un rango de temperatura entre 20 y 90 °C. Los valores de TM se calcularon a partir de los puntos de inflexión siguiendo la primera derivada de la razón F350/F330.

3.3.5 Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering DLS)

El radio hidrodinámico (RH) de las proteínas recombinantes se analizó mediante dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo Zetasizer Nano S (Malvern), utilizando cubetas de cuarzo de bajo volumen (ZEN2112) a 25 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado con rNcSAG1* y rNcSRS2*, luego de concentrar las muestras a 1 mg/mL mediante ultrafiltración centrífuga utilizando tubos Amicon® Ultra-15 (Millipore).

3.3.6 Dicroísmo circular (far-UV CD)

El análisis de la estructura secundaria de rNcSAG1* y rNcSRS2*, se realizó utilizando un espectropolarímetro Chirascan V100 (Applied Photophysics) a 25 °C. Tras la eliminación de la etiqueta Strep, seguida de la ultrafiltración de las proteínas, se midió la absorbancia de las muestras a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 10 mm de longitud de trayecto para calcular la concentración proteica. Para obtener los espectros de CD en la región del UV lejano, las muestras se diluyeron 1:20 en óxido de deuterio hasta alcanzar concentraciones de 3,04 µM y 3,58 µM, respectivamente, y se midieron entre 260 nm y 180 nm, con un tiempo de adquisición de 1 s por punto, utilizando cubetas de cuarzo de 0,1 mm de longitud de trayecto. El procesamiento inicial de los datos se realizó con el software ProData Viewer v:4.4.2.0, y el análisis de estructura secundaria se llevó a cabo utilizando el servidor web BeStSel (77) mediante los modos Single Spectrum y PDB ID Analysis.

3.3.7 Espectrometría de masa

El análisis proteómico se realizó en la Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica del Institut Pasteur de Montevideo. Los espectros de masas fueron adquiridos utilizando un

analizador 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ (Applied Biosystems, Framingham, MA), equipado con un láser Nd:YAG (355 nm). Los espectros se registraron en modo reflector positivo, en un rango de relación masa/carga (m/z) de 800–4000. La calibración se efectuó empleando una mezcla estándar de péptidos (Mass Standards Kit for Calibration of AB Sciex TOF/TOF), y los iones precursores más intensos fueron seleccionados para espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La identificación de proteínas se llevó a cabo mediante el motor de búsqueda MASCOT v2.3.02 (Matrix Science), con licencia para el Institut Pasteur de Montevideo, utilizando la base de datos Invertebrates_EST EST_135 (78).

Para este análisis se cortaron las bandas proteicas a partir de un gel SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue. El decolorado se realizó incubando los fragmentos de gel con 100 μ L de bicarbonato de amonio 0,2 M (pH 8,0) y acetonitrilo (1:1, v/v) a 30 °C durante 30 minutos en un termomezclador a 1400 rpm. Este paso se repitió dos veces. Posteriormente, se deshidrataron con 100 μ L de acetonitrilo bajo las mismas condiciones y se secaron al aire en flujo laminar. La reducción se efectuó con 10 mM de ditioneitol (DTT) durante 1 hora a 56 °C. Tras enfriar a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante, se llevó a cabo la alquilación con 55 mM de iodoacetamida (IAM) durante 45 minutos en oscuridad. Los fragmentos de gel se deshidrataron nuevamente con acetonitrilo y se secaron. La digestión proteica se realizó durante la noche a 37 °C utilizando tripsina de grado de secuenciación (0,1 μ g/ μ L en bicarbonato de amonio 67 mM, pH 8,0).

Los péptidos fueron extraídos incubando los fragmentos de gel dos veces con 100 μ L de una solución de acetonitrilo al 60 %/ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, a 30 °C durante 30 minutos. Los sobrenadantes se reunieron y concentraron al vacío hasta un volumen final aproximado de 20 μ L. El desalinizado se realizó mediante microcolumnas C18 ZipTip (Millipore) y los péptidos fueron eluidos directamente sobre una placa de destino MALDI empleando una solución saturada de α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) en acetonitrilo al 60%/TFA al 0,1%.

3.3.8 Crosslink de proteínas

Se realizó el entrecruzamiento (crosslink) de las proteínas de superficie de los parásitos mediante incubación con paraformaldehído (PFA) al 3% en PBS 1× durante 20 minutos. Finalizado este paso, se procedió a la extracción de las proteínas de superficie. Para ello, los parásitos fueron centrifugados a 3.000 $\times$ g durante 10 minutos, seguidos de tres lavados consecutivos con PBS 1X. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en PBS 1× con Triton X-100 al 1% y se incubó a 4 °C durante la noche (59). Finalmente, se adicionó buffer de carga para su posterior utilización en ensayos de *Western blot* y electroforesis en gel de poliacrilamida.

3.3.9 Visualización de proteínas

La visualización de las proteínas obtenidas en el proceso se realizó mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE, estos se tiñeron con Coomassie Blue. Los diferentes marcadores de peso molecular se encuentran en el ANEXO I. Y han sido denominados como MW1 o MW2, según corresponda.

3.4 Inmunológicos

3.4.1 Generación de anticuerpos

Para obtener los anticuerpos que reconozcan las proteínas, se inmunizaron ratones hembra BALB/c (de 6 semanas de edad) por vía intraperitoneal una vez con 100 µg de proteína purificada mezclada en partes iguales con adyuvante completo de Freund. Posteriormente, se realizaron dos inmunizaciones adicionales con la proteína purificada mezclada en igual volumen con adyuvante incompleto de Freund, con intervalos de 15 días entre cada dosis. Los ratones fueron sangrados 15 días después de la última inmunización (59). Este protocolo se llevó a cabo por separado para cada una de las proteínas.

3.4.2 Western Blot

Para los ensayos de Western blot se utilizaron como antígenos extractos proteicos de taquizoítos de las cepas NcLiv y NcUru1 (14), así como proteínas recombinantes purificadas. Los antígenos fueron cargados en un gel SDS-PAGE al 12% con cargas iguales (1×10^6 parásitos/mL y 1 mg/mL de proteínas, de los cuales se cargaban 20 µL para el gel) y transferidos a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Millipore, MA, EE. UU.) junto con un marcador de proteínas visible preteñido (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™) después de la electroforesis. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en PBS durante 1 hora a 37 °C. Luego se lavaron con tampón de lavado y se incubaron con anticuerpos anti-NcSAG1 y anti-NcSRS2 en PBST (PBS con 0,1% de Tween-20) durante 1 hora a 37 °C (estos anticuerpos fueron producidos como se describió anteriormente). Las membranas se lavaron cinco veces con PBST, después de los lavados, se incubó con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (H+L) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:30.000, Sigma, EE. UU.). Finalmente, las bandas de reacción se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™) en él, tras un tiempo de exposición de 30 segundos.

Para evaluar la expresión, el tamaño y la integridad de las proteínas recombinantes tras la inducción, se realizó un análisis por Western blot. La detección se llevó a cabo utilizando Strep-Tactin-HRP (IBA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se cargaron 20 µL del sobrenadante de cultivo (*Insect Xpress*) recolectado 48 horas después de la inducción en un gel SDS-PAGE en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana PVDF, como se describió anteriormente. Las membranas se bloquearon con BSA al 3% y Tween-20 al 0,05% en PBS durante 2 horas a 37 °C. Luego de la incubación se realizaron tres lavados con PBS que contenía 0,1% (v/v) de Tween-20, se incubaron durante 1 hora con Strep-Tactin® conjugado con HRP (1:10.000), y las proteínas fueron reveladas por quimioluminiscencia como se describió anteriormente.

3.4.3 Inmunofluorescencia Indirecta

Para visualizar la infección por *N. caninum* mediante inmunofluorescencia, las células Vero se cultivaron en placas de cultivo celular con pocillos (12), en los cuales se colocó un cubreobjetos. Las mismas se infectan con dosis conocidas de parásitos (MOI 1:1). Una vez pasado el tiempo de incubación, los cubreobjetos que contenían células infectadas, fueron lavados con PBS y fijados con PFA 3% en PBS 1x durante 20 minutos a RT (temperatura

ambiente). A continuación, se realizan tres lavados con PBS 1x, seguidos del bloqueo con una solución de suero fetal bovino (SFB) al 3% en PBS 1x durante 15 minutos a RT. Luego se permeabilizan las células con una incubación de 20 minutos a RT, utilizando una solución de PBS 1x, SFB 3% y 0,02% de Triton X100.

Una vez terminada la permeabilización, el preparado se incubaba con los anticuerpos para detectar el parásito. Para la inmunodetección del mismo, se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpos primarios y secundarios que se pasan a detallar:

- como Anticuerpos primarios:
 - Anticuerpo policlonal de ratón anti-NcSAG1, 1/200
 - Anticuerpo policlonal de ratón anti-NcSRS2, 1/1000
 - Anticuerpo policlonal de conejo anti-NcSAG1, 1/1000
 - Anticuerpo policlonal de conejo anti-NcSRS2, 1/1000
 - Suero de ratones infectados con NcLIV, 1/100
- como Anticuerpos secundarios:
 - Anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Rockford, IL, EE.UU., A28175)
 - Anticuerpo policlonal de cabra antiratón conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Rockford, IL, EE.UU.)
 - Anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Rockford, IL, EE.UU.).

Los anticuerpos primarios fueron incubados 1h a RT. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X. En cambio todos los anticuerpos secundarios fueron empleados a una dilución de 1:1000, e incubados durante 1 hora a RT. Se realizaron tres lavados con PBS 1X. Posteriormente, se incubaron durante 5 minutos con DAPI (1 µg/mL en PBS) para la tinción nuclear. Finalmente, los cubreobjetos se montaron utilizando ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen, Rockford, IL, EE.UU., P36930) o Fluoroshield con DAPI (Sigma, Saint Louis, MO, EE.UU., F6057).

3.4.4 Ensayo de seroneutralización

Para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos obtenidos en ratón contra las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 se realizó el ensayo de neutralización. El cual consiste en enfrentar a los parásitos a diferentes diluciones de anticuerpos. Para ello se cultivaron los parásitos de las cepas NcLIV y NcURU1, los cuales fueron incubados durante 30 minutos con diferentes diluciones de suero (1:100 y 1:500) correspondientes a cada proteína de manera independiente. Posteriormente, se infectaron monocapas de células Vero en una proporción parásito:célula de 1:1, la infección se mantuvo durante 48 horas. Luego de ese periodo, las células fueron teñidas con la tinción de Giemsa y se cuantificó el área de lisis celular mediante el programa ImageJ.

3.4.5 Microscopía de Expansión

La microscopía de expansión de ultraestructura (UExM) se llevó a cabo siguiendo la metodología previamente descrita para *T. gondii* (79), respetando estrictamente las condiciones originales del protocolo. En términos generales, los portaobjetos que contenían

células infectadas con parásitos fueron incubados durante 5 horas en una solución compuesta por 0,7% de acrilamida (AA) y 1% de formaldehído (FA) a 37 °C. Posteriormente, se procedió a la gelificación mediante la adición de una solución de 19% de acrilato de sodio (SA), 10% de AA y 0,1% de BIS-AA en PBS. Este proceso catalítico se desarrolló durante 1 hora a 37 °C. En la siguiente etapa, se efectuó la desnaturalización proteica mediante una incubación de 1,5 horas a 95 °C, lo que favoreció la expansión del gel que contenía a las células infectadas con los parásitos. Dicho gel expandido fue sumergido en agua y se dejó en expansión durante toda la noche. Con el objetivo de visualizar la ultraestructura de los parásitos y analizar la distribución espacial de proteínas específicas, se aplicó un protocolo convencional de inmunofluorescencia indirecta, previamente descrito en la sección 3.4.3.

Las observaciones se realizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM880 (Oberkochen, Alemania), equipado con un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63×/1.40. El procesamiento posterior de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software ImageJ v1.54g (NIH) y Zeiss ZEN Blue Edition v2.0. Finalmente, los modelos tridimensionales presentados en la figura 27 fueron generados mediante el software libre Agave v1.5.0 (80).

3.5 Análisis bioinformáticos y estadísticos

3.5.1 Modelado estructural con AlphaFold

Las estructuras tridimensionales de las proteínas se predijeron mediante AlphaFold a partir de sus secuencias de aminoácidos (81). Se aplicaron los siguientes parámetros: *msa_mode*: MMseqs2 (para alineamientos múltiples de secuencias), *num_models*: 5 (cinco modelos por secuencia), *num_recycles*: 5 (refinamiento estructural iterativo) y *model_preset*: full_dbs (utilización de bases de datos completas). El proceso fue automatizado mediante scripts personalizados en bash, los cuales gestionaron la cola de trabajos, la asignación de recursos y el manejo de errores para asegurar una ejecución robusta. Las 219 secuencias de proteínas SRS analizadas fueron previamente identificadas mediante un análisis BLAST de proteínas de la secuencia traducida del genoma de *N. caninum* (32). Para abordar la tendencia de AlphaFold a modelar regiones de baja confianza como lazos desestructurados, se recortaron los extremos amino y carboxilo de cada proteína, conservando las regiones globulares y los lazos con forma de espiral que las conectan. Estas regiones con estructura de lazo, aunque intrínsecamente desestructuradas, se incluyeron debido a su posible relevancia funcional.

3.5.2 Comparación estructural con Pairwise Structure Alignment

Una vez generadas las estructuras proteicas de NcSAG1 y NcSRS2, se compararon con la estructura de TgSAG1 (PDB ID: 1KZQ) utilizando el servidor web de alineamiento estructural por pares (*Pairwise Structure Alignment*) (82), empleando el algoritmo de alineamiento por modelado de plantillas (Template Modeling-alignment). El puntaje TM (Template Modeling score) varía entre 0 y 1; un valor superior a 0,5 suele indicar que las dos estructuras comparten el mismo pliegue o topología, lo que implica una similitud estructural significativa. En esta tesis se define como porcentaje de TM al valor obtenido en la plataforma multiplicado por 100.

3.5.3 Comparación estructural con DALI

Para explorar las similitudes y diferencias estructurales dentro de la familia de proteínas SRS, empleamos DALI (Distance Matrix Alignment) para un análisis estructural detallado. Usando este enfoque, analizamos 219 modelos de AlphaFold, aprovechando el robusto marco de trabajo de DALI para la comparación de estructuras proteicas tridimensionales (83,84). DALI realiza comparaciones estructurales por pares evaluando matrices de distancias para identificar residuos estructuralmente equivalentes. El método optimiza una función de puntuación que maximiza la suma ponderada de similitudes en las distancias intramoleculares entre pares de átomos equivalentes, lo que permite un alineamiento y comparación estructural precisos. Realizamos un análisis de comparación estructural All-against-All utilizando DALI. Este análisis generó un dendrograma de similitud estructural al comparar sistemáticamente cada estructura proteica con todas las demás en el conjunto de datos. El dendrograma resultante ilustra visualmente las relaciones estructurales dentro de la familia de proteínas SRS, proporcionando valiosos conocimientos sobre sus conexiones evolutivas y funcionales.

3.5.4 Filogenia estructural

Para investigar las relaciones evolutivas dentro de la familia de proteínas SRS, generamos alineamientos de secuencias de aminoácidos para las 219 secuencias mencionadas anteriormente. Estos alineamientos se centraron en las regiones conservadas y las similitudes estructurales, sirviendo como base para los análisis filogenéticos y estructurales subsiguientes. Gblocks (85) refinó el alineamiento excluyendo posiciones mal alineadas o ambiguas, mejorando la fiabilidad de las inferencias evolutivas. Se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando el software MEGA (86). La reconstrucción utilizó el modelo de sustitución de aminoácidos JTT+G4+I, seleccionado en función de su robustez estadística y adecuación para modelar la dinámica evolutiva de estas proteínas.

3.5.5 Visualización y análisis

Utilizando la matriz de similitud obtenida de DALI, construimos un mapa de calor para visualizar los clústeres estructurales de las estructuras proteicas. Esta visualización se creó mediante scripts personalizados en Python, aprovechando bibliotecas como Matplotlib y Seaborn para la representación gráfica. El mapa de calor resalta grupos de proteínas con alta similitud estructural, facilitando la identificación de posibles relaciones funcionales o evolutivas. Las estructuras proteicas fueron visualizadas utilizando VMD (87).

3.5.6 Procesamiento de imágenes en ImagJ

Para cuantificar el área ocupada por los parásitos y las placas de lisis, las imágenes fueron procesadas mediante su conversión a formato binario (88).

En el caso de las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia indirecta (IFI), se realizó inicialmente la separación de los canales de fluorescencia. Posteriormente, se aplicó un balance de señal para eliminar el ruido de fondo. Una vez optimizada la imagen, esta fue convertida a formato binario y se efectuó el conteo de partículas, lo que permitió determinar el área ocupada tanto por los parásitos como por los núcleos celulares.

En el caso de las imágenes teñidas con Giemsa, se generó una máscara que cubría los puntos correspondientes a las zonas de lisis celular. Al igual que en el procedimiento anterior, las imágenes fueron convertidas en binarias y se realizó el conteo de partículas para estimar el área afectada.

3.5.7 Análisis estadístico en *GraphPad Prism 8*

Para el análisis de la significancia estadística de los datos de seroneutralización, procesos de invasión, proliferación y demás, se utilizó el programa *GraphPad Prisma 8*. En las distintas etapas se utilizaron diferentes tipos de análisis, siendo todos ellos de comparación múltiple. Utilizando las configuraciones de 2-way ANOVA y Ordinary one-way ANOVA, según fuera adecuado.

4.Resultados

4.1 Expresión, caracterización y análisis estructural de NcSAG1 y NcSRS2

Para expresar estas proteínas se eligió un sistema eucariota, que es capaz de realizar modificaciones postraduccionales y el correcto apareamiento de los puentes disulfuro. Para su producción fue necesario eliminar las secuencias correspondientes al péptido señal característico de la familia y al anclaje GPI. Como se menciona en la sección 3.1.3, el fragmento a clonar de las proteínas corresponde a los aminoácidos 31–317 de NcSAG1 (GenBank: AF123660) y 54–401 de NcSRS2 (GenBank: AF061249). En la Figura 9 se muestra la secuencia de ambas proteínas, marcando las regiones que corresponden al péptido señal, los diferentes dominios y el anclaje GPI. Asimismo, se resaltan las regiones conservadas entre ambas proteínas.

Es importante destacar que los genes que codifican NcSAG1 y NcSRS2 están contiguos en el genoma, lo que llevó a proponer que ambas proteínas surgieron a partir de un evento de duplicación génica y posterior divergencia. Sin embargo, las diferencias observadas en sus secuencias sugieren que también podrían derivar de orígenes distintos.

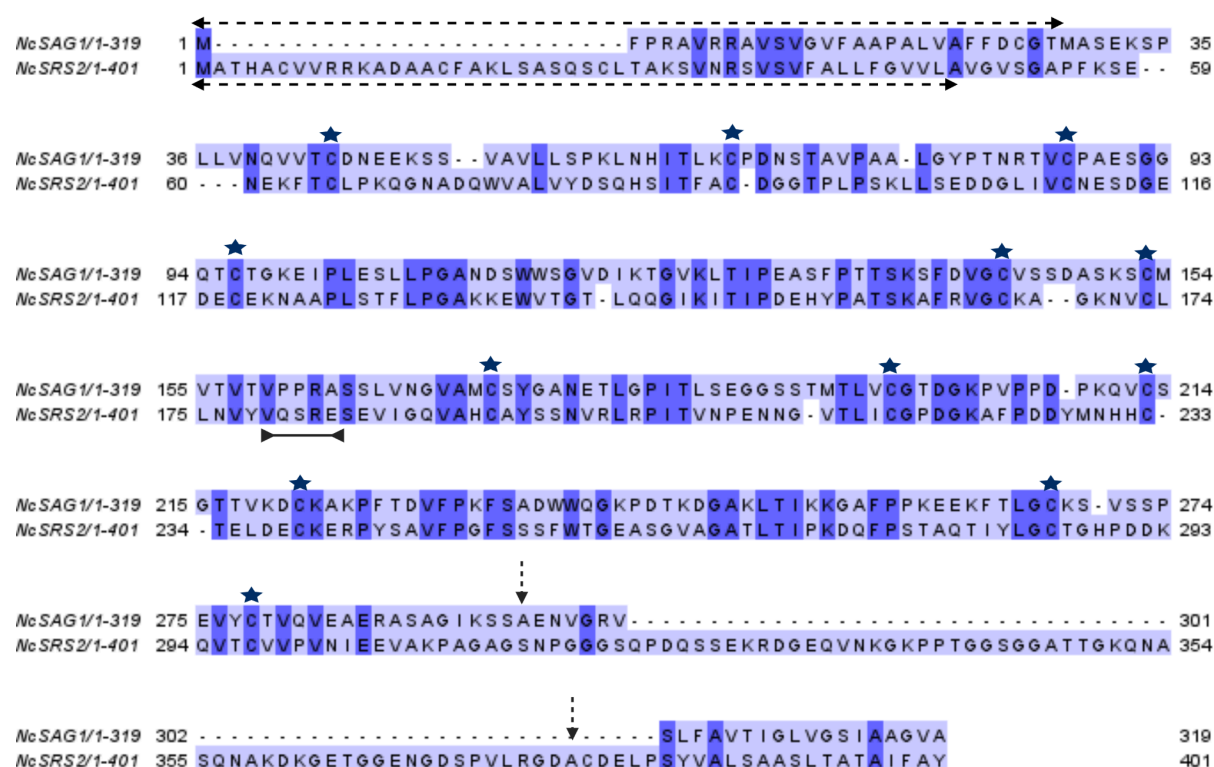


Figura 9. Alineación de las secuencias aminoacídicas de NcSAG1 y NcSRS2. En la figura se indica, mediante la doble flecha punteada, la secuencia predicha del péptido señal para ambas proteínas. Los asteriscos indican las cisteínas conservadas y la doble flecha continua la región bisagra. La flecha simple punteada marca el sitio de anclaje GPI. El color azul más oscuro marca los aminoácidos conservados entre ambas secuencias.

4.1.1 Análisis de secuencias y modelado tridimensional

En un primer análisis se realizó un alineamiento de las secuencias de NcSAG1 y NcSRS2 con TgSAG1 utilizada como referencia de la familia de SRS. Como se muestra en las figuras 9 y 10, se identificaron las cisteínas típicamente conservadas de esta familia, que se alinean tanto entre sí en las proteínas de *N. caninum* como con TgSAG1. Asimismo, en la Figura 10 puede observarse que en la secuencia consenso aparecen los aminoácidos previamente descritos como altamente conservados, cuatro prolinas y un triptófano característico..

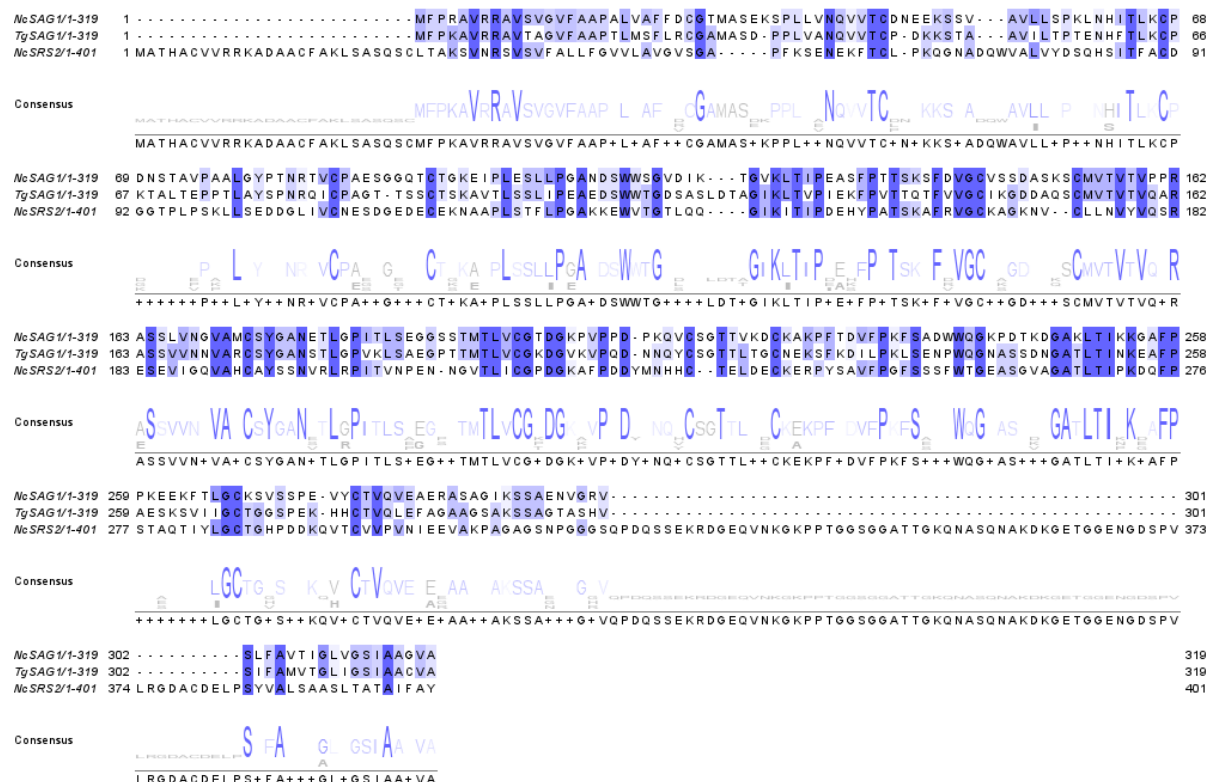


Figura 10. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de NcSAG1, TgSAG1 y NcSRS2. En azul se resaltan los aminoácidos conservados en las tres secuencias y en celeste se resaltan los conservados sólo en dos de ellas. En la línea que dice *consensus* se encuentran las secuencias consenso para esta alineación donde se colorean de acuerdo a la conservación en gradiente de celeste a azul.

A partir de la estructura previamente descrita de TgSAG1, junto con la información obtenida de los alineamientos, se construyó el esquema general de estas proteínas, representadas en la figura 11A. Posteriormente se realizó el modelado estructural de ambas proteínas utilizando el programa AlphaFold. Para este análisis, las secuencias fueron procesadas eliminando las regiones correspondientes al péptido señal y al anclaje GPI. Como se observa en las figuras 11B y 11C, se identificaron los dos dominios característicos de la familia, así como la región bisagra que los conecta. El modelado permitió además identificar la mayor parte de los puentes disulfuro en las configuraciones que coinciden con las descritas en la estructura de TgSAG1 (56).

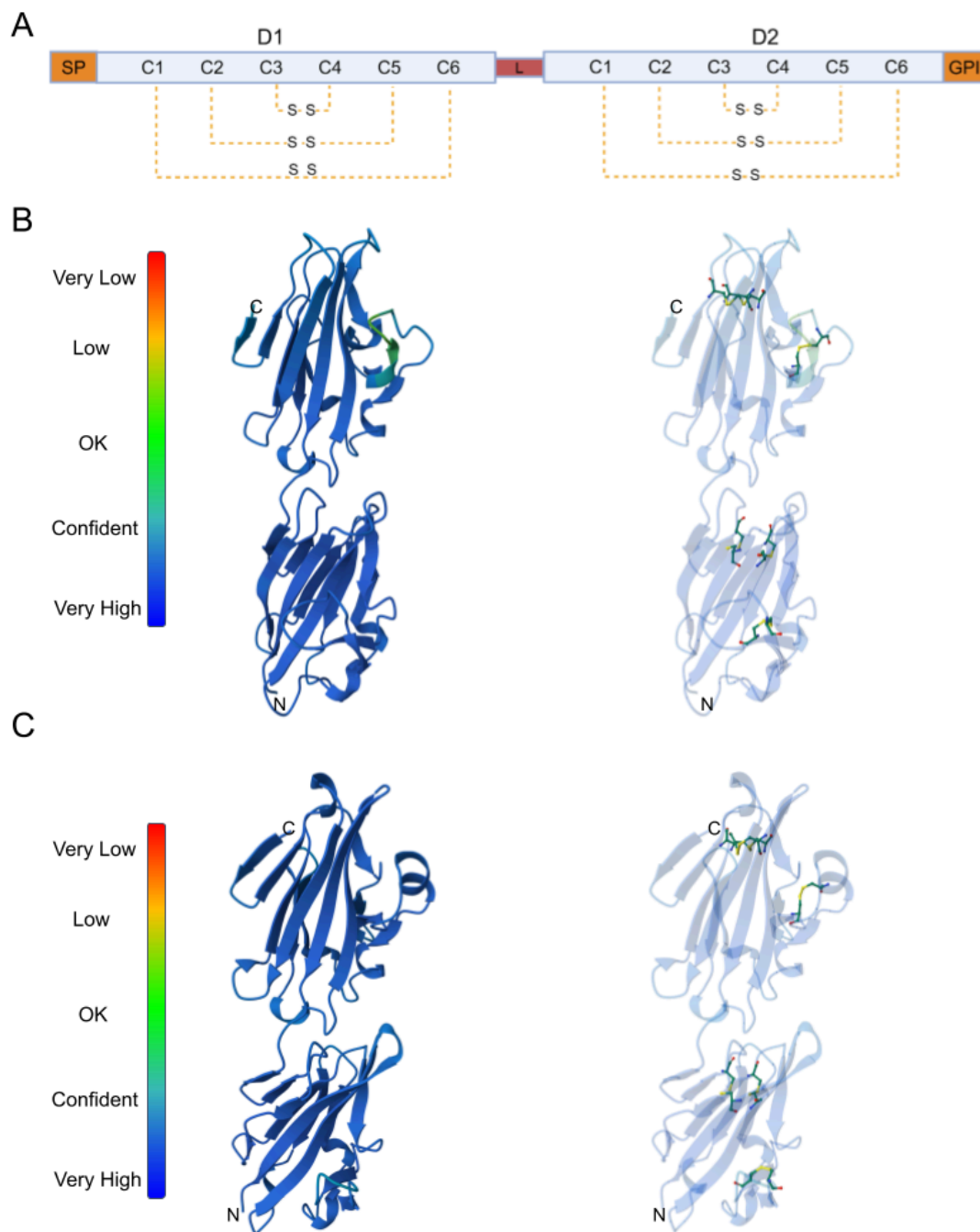


Figura 11. Modelado de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2. (A) se muestra un esquema general de las proteínas, donde SP se refiere al péptido señal, D1 y D2 a los dominios, L a la región bisagra y GPI a la región de anclaje por GPI, también se muestra la formación de los puentes de cisteína. En (B) y (C) se muestra el modelado en AlphaFold de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2, respectivamente. A la izquierda se encuentran las estructuras donde se pueden apreciar los puentes disulfuros.

Una vez obtenido el primer modelado y teniendo en cuenta que la proteína TgSAG1 fue descrita como un posible dímero, se procedió a realizar el modelado del dímero para NcSAG1, que se observa en la figura 12A. Las estructuras se compararon con las estructuras obtenidas por difracción de rayos X de TgSAG1 y así estudiar la homología. Al realizar la comparación de las estructuras (según se explica en la sección 3.5.2), se obtiene

un TM de 61% (visualización de la figura 12B). Esto implica que la estructura obtenida por AlphaFold para NcSAG1 presenta una topología similar a TgSAG1. Si bien los puentes disulfuro en NcSAG1 y NcSRS2 difieren en sus posiciones relativas respecto a los de TgSAG1, el orden general de los enlaces disulfuro se conserva (figura 12C).

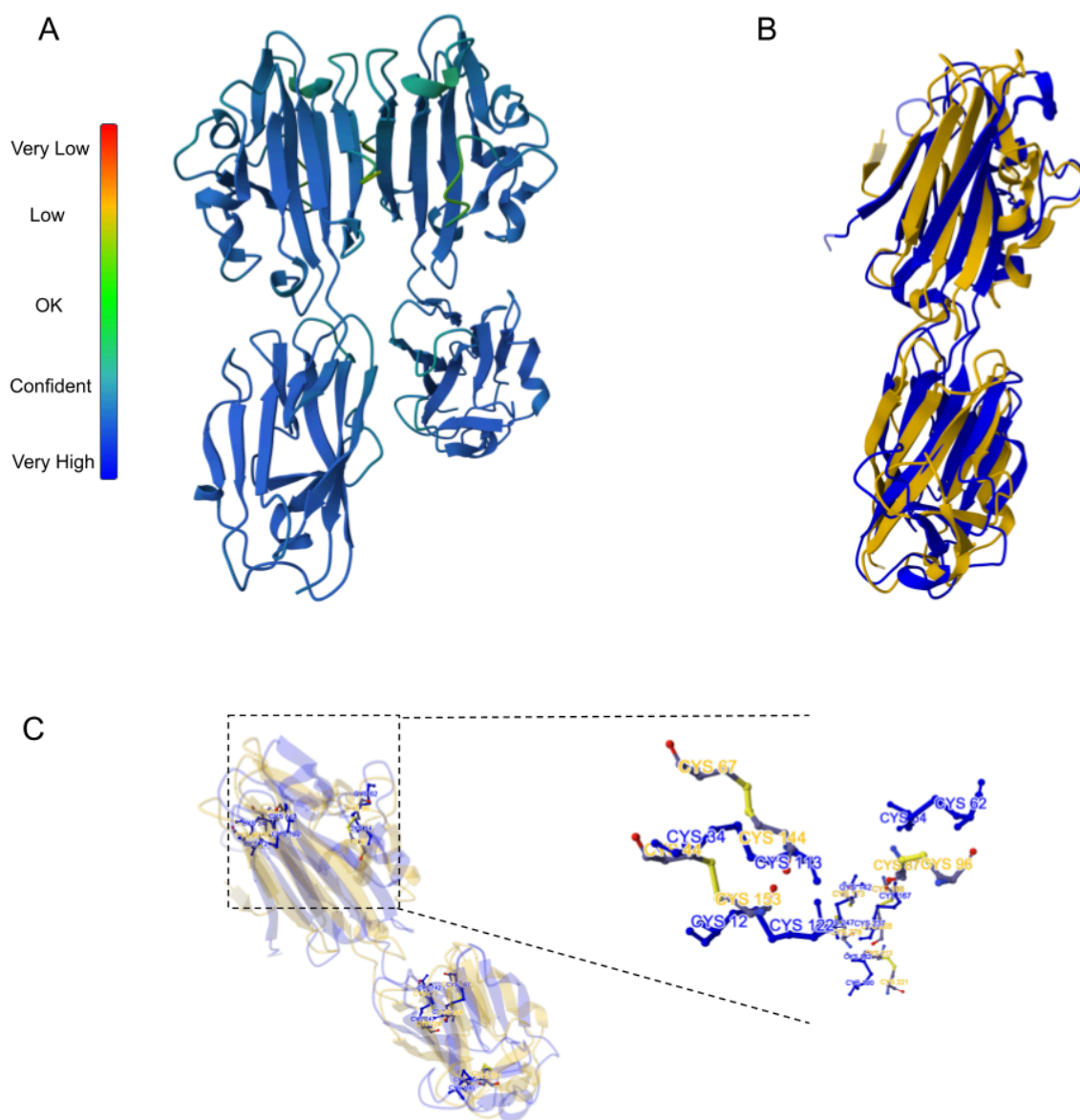


Figura 12. Modelado de dímero de NcSAG1 y comparación con la estructura experimental de TgSAG1. (A) se observa el dímero obtenido por AlphaFold para NcSAG1, en (B) la comparación de las estructuras de NcSAG1 (amarillo) y TgSAG1 (PDB1KZQ en azul). (C) se observa la disposición de los puentes disulfuro, y a la derecha una vista detallada sobre uno de los dominios como ejemplo de la disposición de los puentes disulfuro.

Una vez realizada la comparación de la estructura de NcSAG1 con TgSAG1, se procedió a comparar la similitud estructural y de secuencia de NcSAG1 y NcSRS2. Estos resultados se pueden observar en la tabla 2. A pesar de la divergencia de secuencia, NcSAG1 y NcSRS2 exhiben una similitud estructural significativa, con una puntuación TM de 86 %. La

comparación de los dominios D1 exhibe una puntuación TM de 83 %, lo que indica una alta conservación estructural a pesar de su baja similitud de secuencia. Por el contrario, los dominios D2 son más divergentes, con una puntuación TM de 58 % (Figura 13 y tabla 2). Existe una diferencia significativa a nivel de secuencia entre los dominios dentro de la misma proteína, pero a nivel estructural la identidad permanece siendo alta (tabla 2).

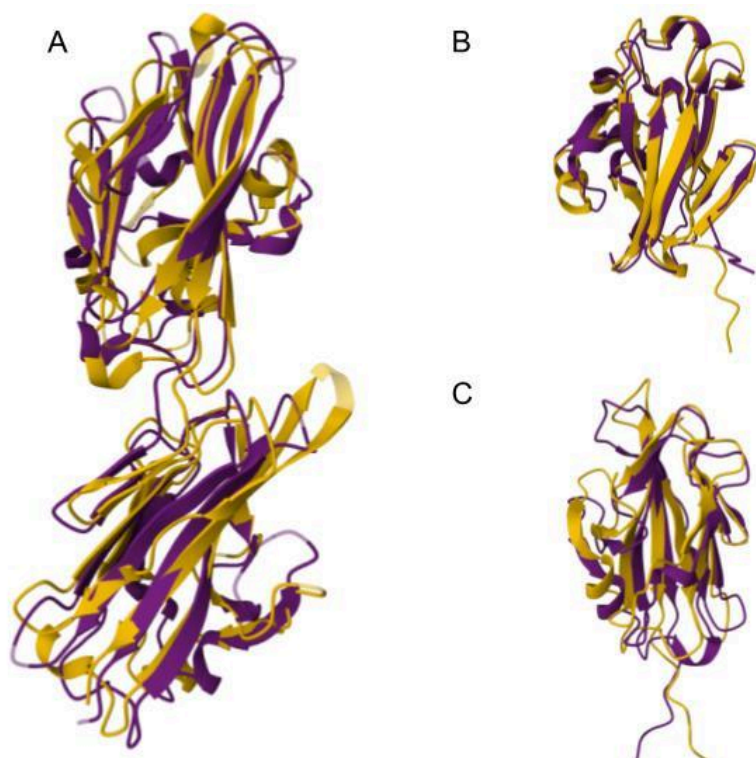


Figura 13. Representación del alineamiento de las estructuras de NcSAG1 (amarillo) y NcSRS2 (violeta). (A) se puede observar la alineación de NcSAG1 y NcSRS2 enteras. (B) corresponde a la alineación de los dominios D1 de ambas proteínas. (C) corresponde a la alineación de los dominios D2 de ambas proteínas

En la figura 13 podemos observar el resultado del alineamiento de las estructuras de AlphaFold para NcSAG1 y NcSRS2. Como se puede observar a nivel estructural ambas proteínas conservan de forma significativa el ordenamiento espacial, observando las mayores discordancias en las zonas de loops y flexibles de las mismas.

Tabla 2. Tabla donde se resumen los porcentajes de identidad y similitud para la comparación entre dominio de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2. Tanto a nivel de secuencia como estructuralmente.

Dominios a comparar	AA Identidad (%)	AA Similitud (%)	TM-Score x 100
NcSAG1-D1 vs NcSRS2-D1	31	48	83
NcSAG1-D2 vs NcSRS2-D2	24	35	58
NcSRS2-D1 vs NcSRS2-D2	14	24	51
NcSAG1-D1 vs NcSAG1-D2	28	38	78
NcSAG1-D1 vs NcSRS2-D2	18	29	77
NcSAG1-D2 vs NcSRS2-D1	23	34	77

4.1.2 Expresión y purificación de rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST

Las proteínas fueron expresadas en un sistema eucariota; para esto se utilizaron células S2 de *D. melanogaster*. El plásmido empleado (*pMT/V5-His*) incluye una secuencia señal que dirige la secreción de las proteínas al medio de cultivo. Para confirmar la expresión y liberación al medio de las proteínas se realiza un primer Western blot, en que se reconocen las proteínas mediante la etiqueta de Twin-Strep-tag®. Como se puede visualizar en la figura 14, tanto rNcSAG1-ST como rNcSRS2-ST se expresaron de forma soluble y fueron secretadas al medio.

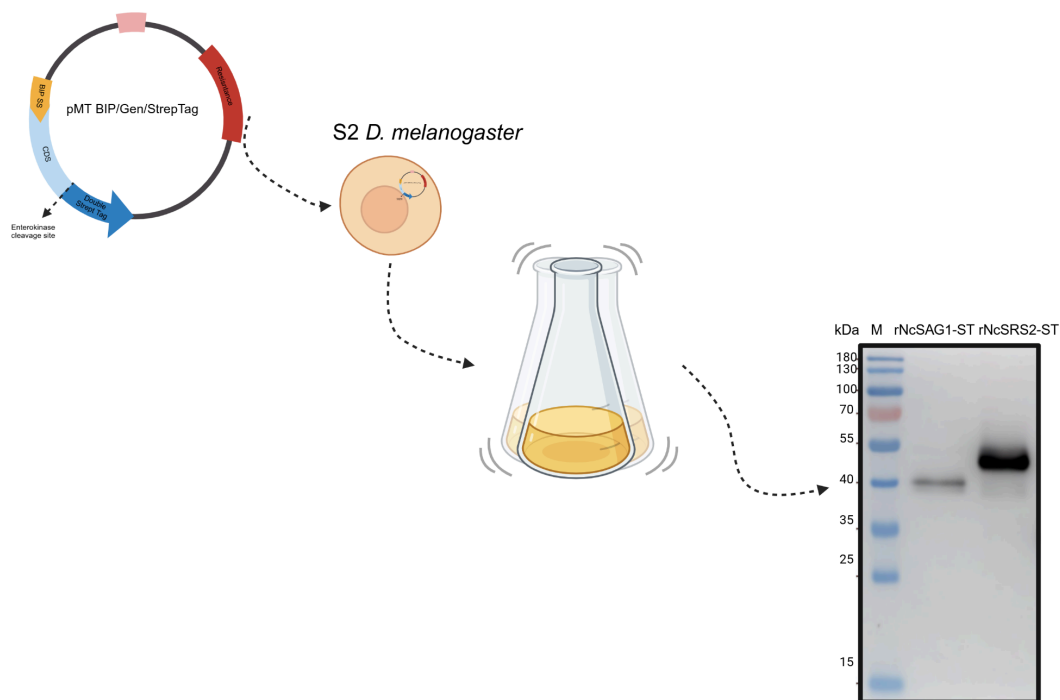


Figura 14. Esquema del sistema de producción de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2. En la figura se pueden observar los pasos seguidos para la producción y verificación de la expresión en el medio utilizando *Western blot*. El marcador de peso molecular corresponde al MW2.

Una vez confirmada la secreción de las proteínas al medio de cultivo, se procedió a su purificación. Para ello, como se detalla en la Sección 3.3.1, el sobrenadante fue centrifugado para eliminar los restos celulares y cargado en una columna de afinidad. La elución fue monitoreada mediante la medida de absorbancia a 280 nm. Como se muestra en la figura 15, se obtuvo un único pico de elución.

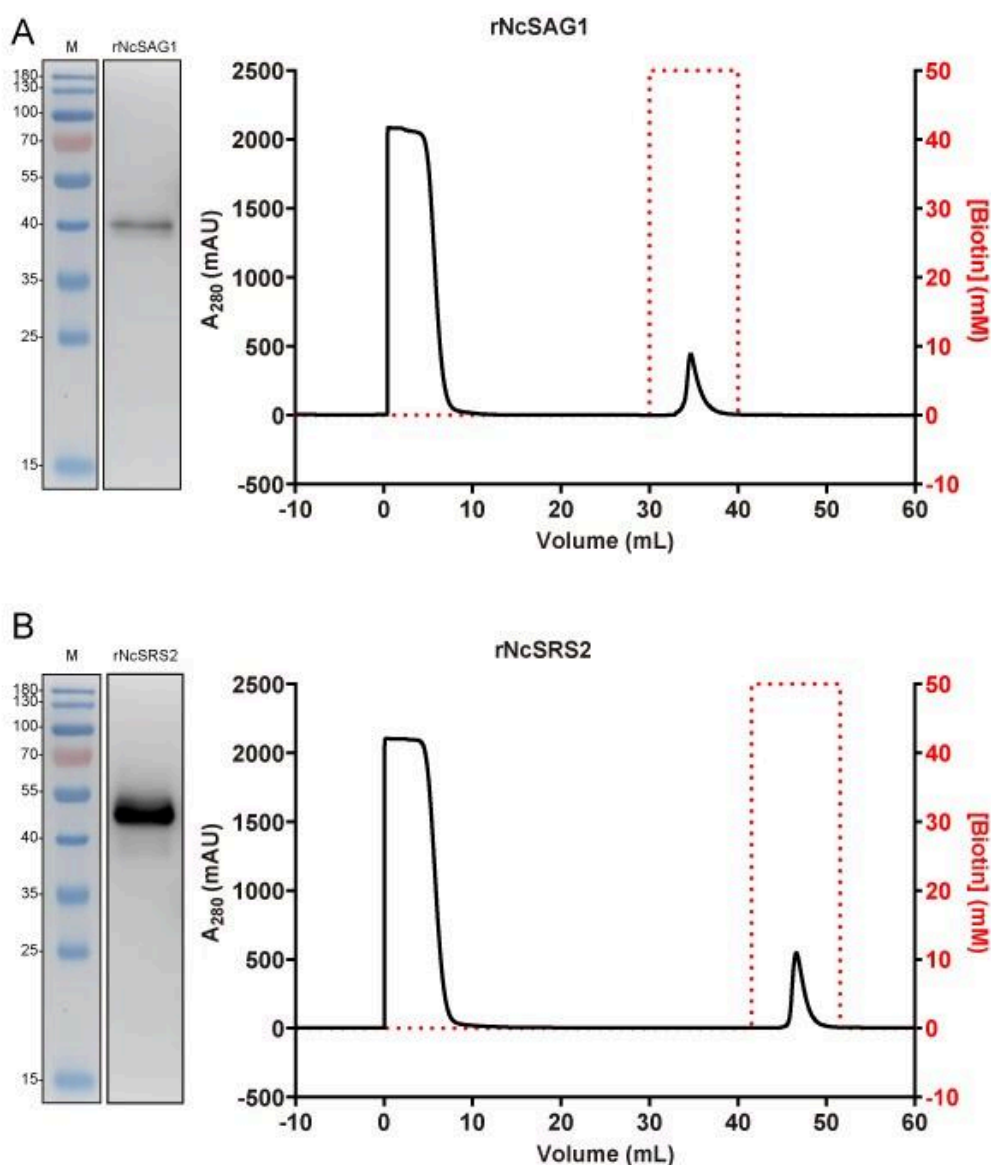


Figura 15. Obtención del pico de elución para la purificación en cromatografía de afinidad para las proteínas rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST. (A) representación gráfica para rNcSAG1-ST. (B) representación gráfica para rNcSRS2-ST.

La purificación de las proteínas se visualiza también mediante un gel de Coomassie (figura 16), donde se puede observar cómo las proteínas de interés se encuentran únicamente en la fracción correspondiente a la elución. En el caso de rNcSAG1-ST se observa una única banda mayoritaria, mientras que en rNcSRS2-ST se observan dos bandas.

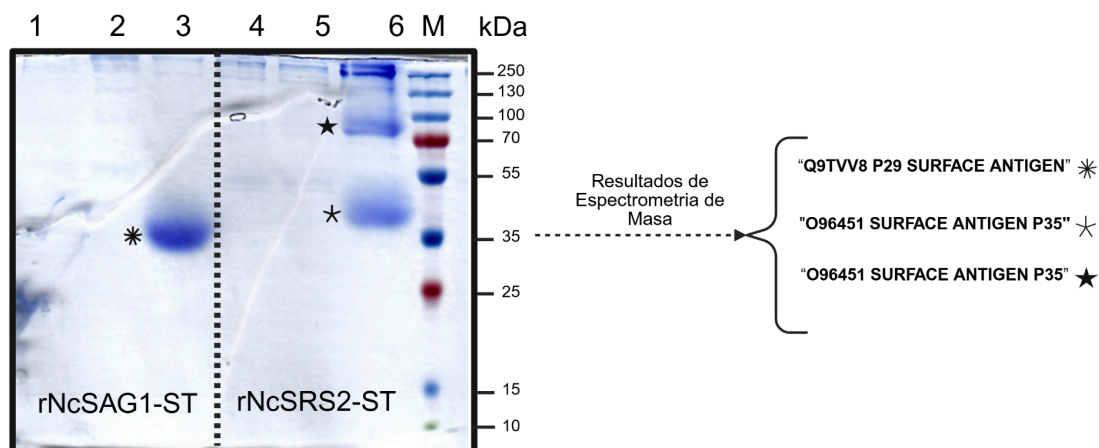


Figura 16. Gel de Coomassie de la purificación de las proteínas rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST y resumen de los resultados obtenidos para la espectrometría de masa. Los pocillos 1 y 4 corresponden a la fracción medio previo a la purificación, los pocillos 2 y 5 a la fracción de lavado de la columna y los pocillos 3 y 6 a las fracción de elución. El marcador de peso molecular corresponde al MW1.

Dado que para la proteína rNcSRS2-ST se observaba una doble banda, se procedió a cortar las bandas mayoritarias observadas en el gel para ser analizadas por espectrometría de masa, según se detalla en la sección 3.3.7 (Tabla 3). Este análisis se realizó para verificar la identidad de ambas proteínas.

Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos de la espectrometría de masa.

Proteínas	Peso Molecular en Gel (kDa)	Péptidos Únicos	Identificación por MALDI-TOF	Masa teórica (kDa)	Score
rNcSAG1-ST	35	1	"CF940886.1 NcESTqab73f06.y1 Nc-1 Tachyzoite cDNA Library 2 Neospora caninum cDNA 5' similar to TR:Q9TVV8 Q9TVV8 P29 SURFACE ANTIGEN, mRNA sequence."	21	74
rNcSRS2-ST	40	2	"CF967478.1 NcESTqab63f12.y1 Nc-1 Tachyzoite cDNA Library 2 Neospora caninum cDNA 5' similar to TR:O96451 O96451 SURFACE ANTIGEN P35, mRNA sequence."	20	56
			"CF598497.1 NcEST3e17a01.y1 Nc-LIV Tachyzoite cDNA Library Neospora caninum cDNA 5' similar to TR:O96451 O96451 SURFACE ANTIGEN P35, mRNA sequence."	24	60

Como se puede observar en la tabla 3 y en la figura 16, para la única banda presente de rNcSAG1-ST se identificó que pertenecía al antígeno de superficie p29, que corresponde a la proteína NcSAG1. En el caso de rNcSRS2-ST, ambas bandas presentes en el gel fueron identificadas como el antígeno de superficie p35, que corresponde a NcSRS2.

Se calculó el rendimiento de proteínas obtenidas tomando como referencia la cantidad de proteína recuperada tras la purificación. Como este rendimiento varía según el volumen de medio procesado, los resultados se expresan en rangos de rendimiento. Habiendo obtenido un rango de 22-65 mg/L para rNcSAG1-ST y 37-85 mg/L para rNcSRS2-ST.

4.1.3 Capacidad inmunogénica y antigénica de las proteínas rNcSAG1 y rNcSRS2

Una vez purificadas las proteínas, se evaluó su capacidad antigénica en un modelo murino, que permite evaluarlas para futuras aplicaciones en la producción de vacunas, así como para desarrollar anticuerpos específicos que se utilizarán en estudios posteriores.

En la Figura 17 se presenta el esquema de producción de los anticuerpos en este modelo, junto con los resultados del western blot. En este análisis se observa que los anticuerpos generados en ratones reconocen las proteínas nativas en los extractos proteicos de las cepas NcURU1 y NcLiv. Como se aprecia en el western blot, ambas proteínas muestran una única banda, lo que indica la ausencia de reactividad cruzada entre ellas o con otras proteínas SRS presentes en los extractos.

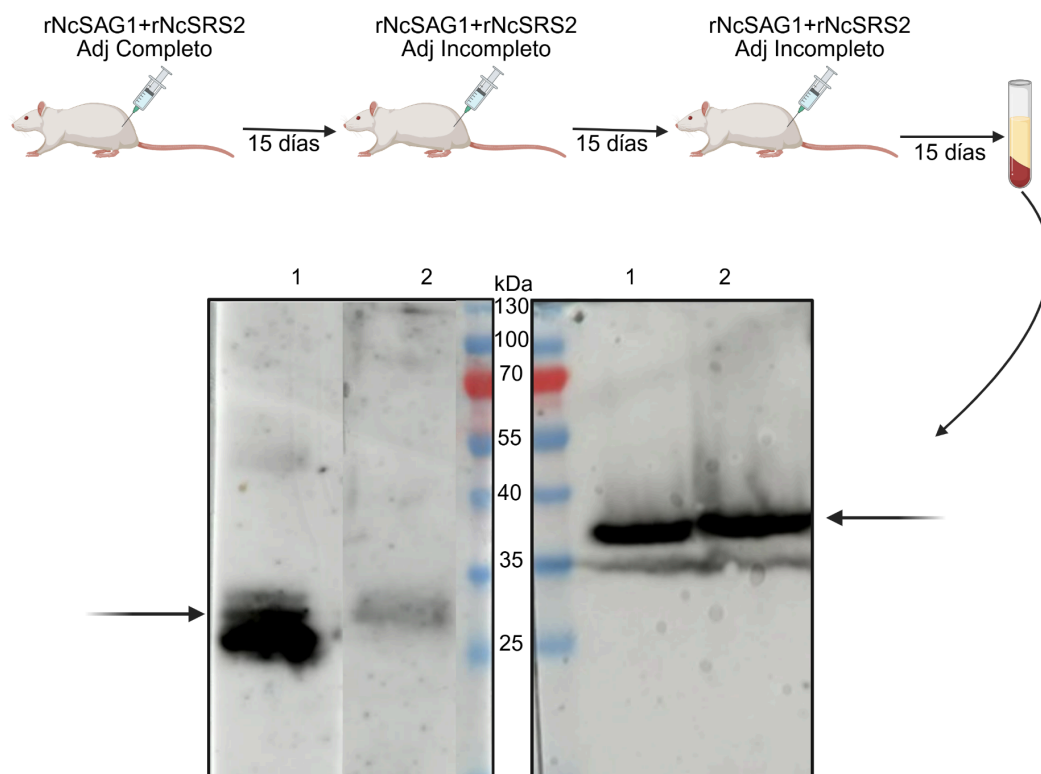


Figura 17. Esquema de producción de anticuerpos contra las proteínas rNcSAG1 (izquierda) y rNcSRS2 (derecha) y su evaluación mediante *Western blot*. Los carriles 1 y 2 corresponden a extractos proteicos de las cepas NcURU1 y NcLiv, respectivamente.

Paralelamente, se evaluó la antigenicidad, la capacidad de las proteínas recombinantes de ser reconocidas por anticuerpos producidos por animales naturalmente infectados, así como por ratones infectados en el laboratorio. Como se muestra en la Figura 18, los sueros provenientes de animales naturalmente infectados (ciervo, perro y bovino), así como los de ratones infectados experimentalmente, reconocieron las proteínas recombinantes.

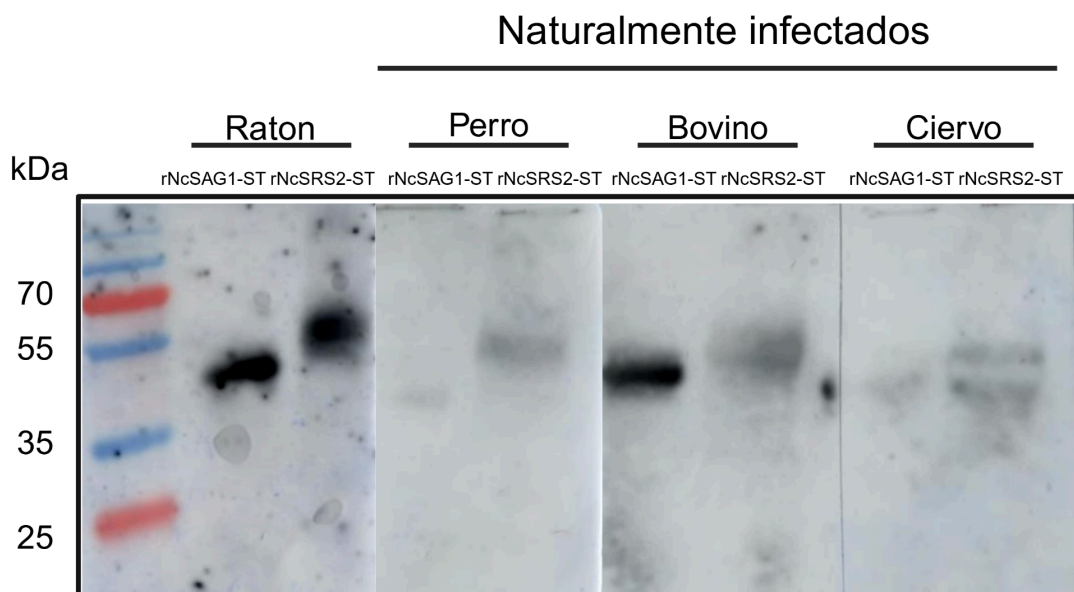


Figura 18. Western blot de las proteínas recombinantes rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST contra los sueros de animales infectados naturalmente y ratones infectados experimentalmente.

Estos resultados indican que las proteínas analizadas son inmunogénicas y, por lo tanto, podrían emplearse en el desarrollo de pruebas diagnósticas. Además, los anticuerpos generados reconocen las proteínas nativas, lo que respalda su uso en futuros estudios funcionales.

4.1.4 Caracterización fisicoquímica de rNcSAG1 y rNcSRS2

Una vez purificadas las proteínas, se realizó un siguiente paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC), para la cual se obtuvieron fracciones con diferentes estados de oligomerización (figuras 19A y 19B). Este paso se repite para diferentes batches de expresión, en los cuales aislamos ambas proteínas como un pico principal precedido por agregados de alto peso molecular (figura 19A y 19B).

Se estimaron los pesos moleculares en solución para las proteínas, mediante una SEC analítica, obteniendo para ambas en la elución picos únicos con pesos moleculares estimados de 105,5 y 76,6 kDa, para rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST, respectivamente (figura 19C y 19D). Este resultado sugiere que ambas proteínas forman dímeros estables. La termoestabilidad de rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST se evaluó mediante nanoDSF, como se describe en la sección 3.3.4. Se observó que ambas proteínas comienzan a desnaturalizarse con una T_m por encima de 50 °C (T_m = 58,6 °C para rNcSAG1-ST y T_m = 53,1 °C para rNcSRS2-ST), no observándose la formación de agregados en un paso de enfriamiento posterior a ser calentado hasta 90 °C (figuras 19E y 19F).

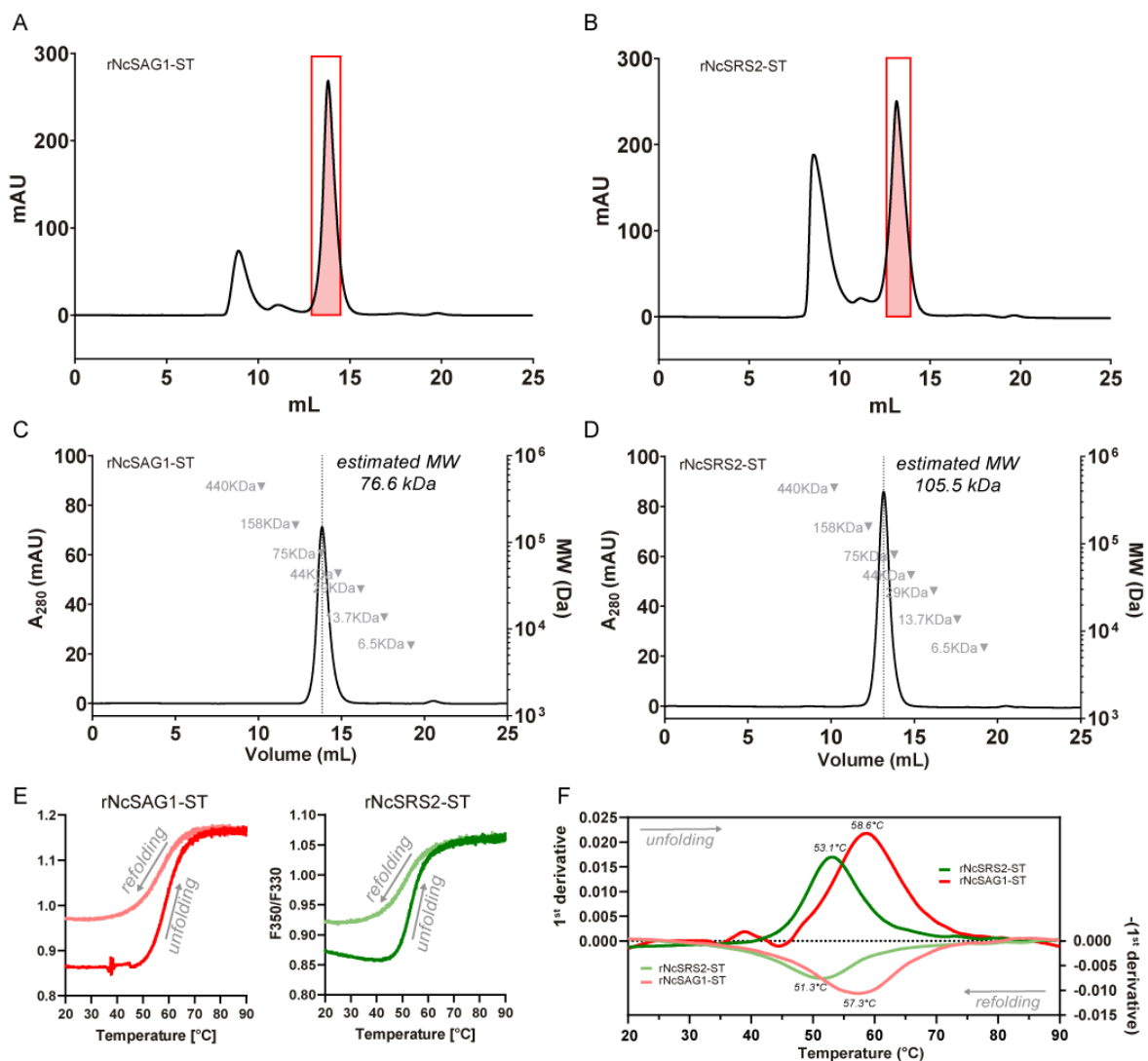


Figura 19. Estudios fisicoquímicos de las proteínas rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST. (A) y (B) son las gráficas provenientes de la lectura de la absorbancia a 280 nm de la elución de la purificación mediante SEC, para rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST, respectivamente. (C) y (D) son las gráficas obtenidas de la purificación por SEC analítica donde se observa la relación del volumen de elución y peso molecular. (E) muestra la temperatura de melting (T_m), y (F) es la primera derivada de la curva E, donde el pico corresponde a la transición de la proteína del estado nativo a la desnaturalización.

Mediante la incubación con enteroquinasa se eliminó la etiqueta Twin-Strep-tag®, tanto de rNcSAG1-ST como de rNcSRS2-ST, previamente purificadas mediante SEC preparativa. Posteriormente, las proteínas pretratadas (rNcSAG1* y rNcSRS2*) se reinyectaron en un SEC preparativo, mostrando un pico único con un ligero desplazamiento del volumen de exclusión hacia tamaños más pequeños, como consecuencia de la eliminación de la etiqueta Twin-Strep-tag® (Figura 20).

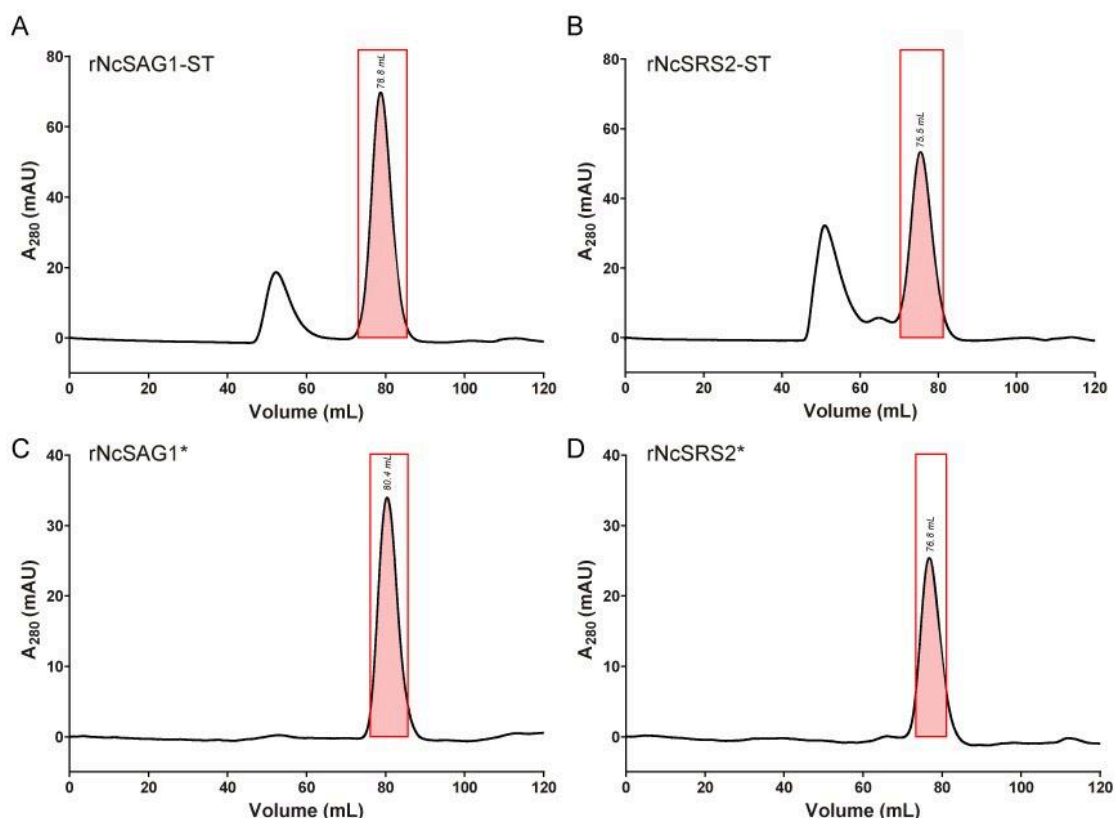


Figura 20. Gráficas del resultado de SEC para las proteínas rNcSAG1 y rNcSRS2. (A) y (B) corresponden a la SEC analítica de las proteínas con la etiqueta Twin-Strep-tag®. (C) y (D) corresponden a la SEC analítica de las proteínas sin la etiqueta Twin-Strep-tag® (rNcSAG1* y rNcSRS2*, respectivamente).

El pico principal se recolectó y se concentró a 1 mg/mL. Una vez concentradas las proteínas rNcSAG1* y rNcSRS2* se analizaron mediante DLS para evaluar su comportamiento en solución después de la eliminación de la etiqueta Twin-Strep-tag® y del concentrado de la muestra. Ambas proteínas mostraron distribuciones de tamaño por intensidad, con una población principal con un radio hidrodinámico (RH) promedio de 3,40 nm para rNcSAG1* y 3,53 nm para rNcSRS2*, y agregados de gran tamaño, insignificantes, como se observa en las distribuciones de tamaño por volumen (figura 21).

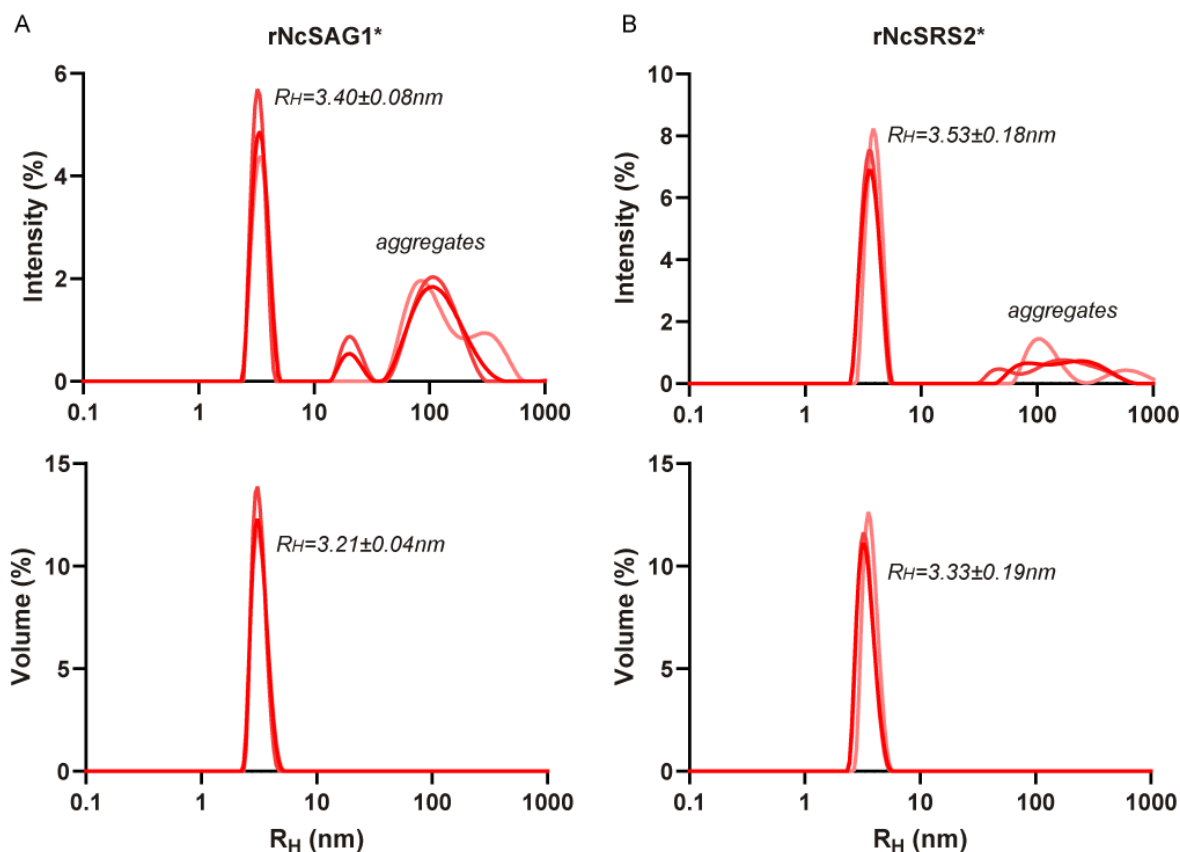


Figura 21. Evaluación del comportamiento de rNcSAG1* y rNcSRS2* en solución. (A) Se observa el radio hidrodinámico (RH) de rNcSAG1* y en (B) el RH de rNcSRS2*, medido mediante DLS tras el tratamiento con enteroquinasa bovina para eliminar la etiqueta Twin-Strep-tag®. Las distribuciones calculadas por intensidad (paneles superiores) muestran un pico principal a 3,53 y 3,40 nm, respectivamente, acompañado de agregados de alto peso molecular, que no se detectan en las distribuciones medidas por volumen (paneles inferiores). Los sufijos con asterisco indican que se eliminó la etiqueta Twin-Strep-tag®.

Estos resultados muestran que ambas proteínas permanecen de forma dimérica en solución y que la eliminación de la etiqueta, así como el concentrar la muestra, no generan agregación de las proteínas (Figuras 20 y 21).

4.1.5 Estudio de la estructura secundaria de las proteínas rNcSAG1 y rNcSRS2

Se estudió la estructura secundaria de las proteínas rNcSAG1* y rNcSRS2* mediante dicroísmo circular (CD) en UV lejano. Ambas proteínas resultaron ser muy similares en su espectro, lo que sugiere que ambas proteínas presentan una composición estructural secundaria comparable. Para interpretar el espectro, se realizó la deconvolución mediante BeStSel. Esto nos permitió identificar un contenido estructural secundario de aproximadamente el 30 % de hebras β (principalmente hebras β antiparalelas relajadas y retorcidas a la derecha), seguido de un 14 %–15,3 % de giros y un 8,2 %–5,3 % de hélices α (principalmente hélices α distorsionadas), como se observa en la figura 22.

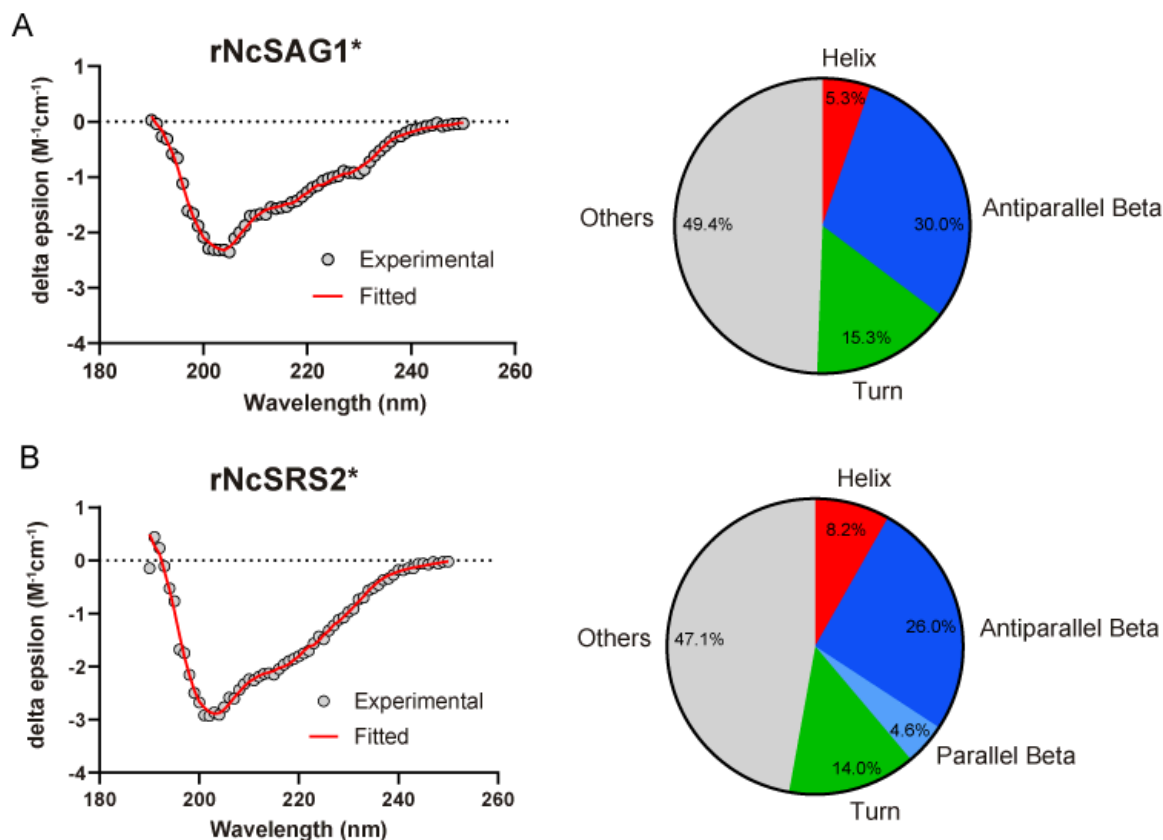


Figura 22. Análisis de la estructura secundaria mediante dicroísmo circular. (A) y (B) representan los datos espectrales y la interpretación por deconvolución del programa BeStSel para rNcSAG1* y rNcSRS2*, respectivamente.

Para validar nuestra interpretación estructural de los espectros de CD mediante BeStSel, se realizó el proceso inverso, alimentando al programa con las estructuras PDB de proteínas relacionadas, como TgSAG1, TgBSR4 y TgSporoSAG de *T. gondii*, obteniéndose porcentajes de composición estructural secundaria bastante similares para todas ellas (figura 23).

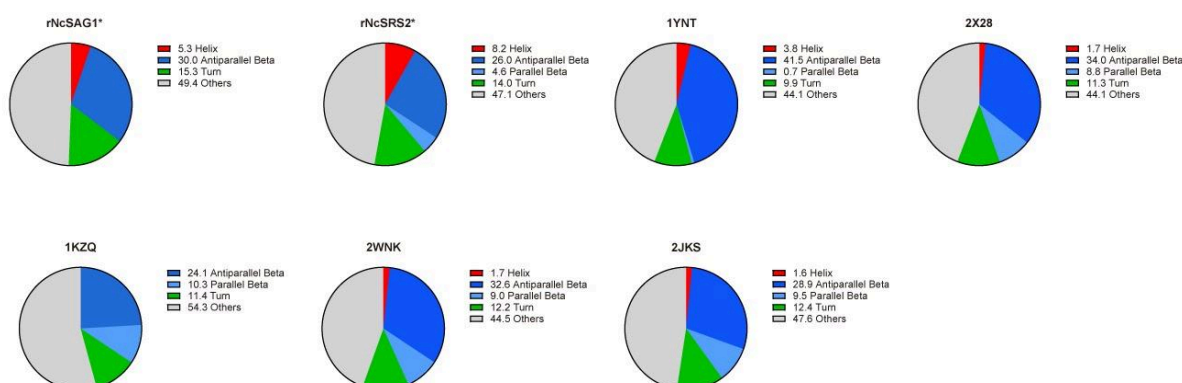


Figura 23. Representación gráfica de la interpretación del programa BeStSel, para las estructuras cristalográficas de TgSAG1 (1KZQ y 1YNT) TgBSR4 (2JKS) y TgSporoSAG (2X28 y 2WVK), así como los resultados obtenidos para rNcSAG1* y rNcSRS2*.

4.1.6 Modelado de las SRS y comparación estructura de las proteínas

Dado que las estructuras obtenidas por AlphaFold para las proteínas NcSAG1 y NcSRS2, decidimos modelar por esta técnica las estructuras de todos los genes SRS de *N. caninum*. Para esto, se realizó un análisis BLAST de proteínas del genoma traducido de *N. caninum*, lo que permitió obtener 219 secuencias pertenecientes a la familia SRS (Apéndice II). Las secuencias elegidas conservan características clave del dominio SAG, como cisteínas y prolinas conservadas, así como el triptófano característico.

De forma de realizar un estudio de la comparación estructural de esta familia, se utilizó DALI para la comparación estructural, lo que permitió una exploración sistemática de sus características y relaciones estructurales. DALI generó una matriz de similitud para las 219 estructuras proteicas predichas, cuantificadas mediante puntuaciones Z que indican el grado de similitud estructural entre pares de proteínas. Las puntuaciones Z más altas indican una mayor similitud. El mapa de calor triangular (figura 24A) ilustra esta matriz, en la que el amarillo indica alta similitud y el azul, divergencia. La agrupación jerárquica a lo largo de los ejes agrupa las proteínas con características estructurales similares, revelando grupos distintos dentro de la familia SRS. En particular, se recuperan los dos grandes grupos ya reportados en los árboles filogenéticos de *T. gondii*. En la figura 24B se representa el árbol resultante del alineamiento de las estructuras, donde también se observan los dos grandes grupos previamente identificados.

Se resaltan las estructuras representativas de los grupos clave, ilustrando los motivos conservados y las variables. Se destacan en rojo, azul, naranja y morado proteínas que incluyen a Ncaninum_LIV_000104000 (un ortólogo de SporoSAG), Ncaninum_LIV_000061800 (NcSAG1), Ncaninum_LIV_000678300 (NcBSR4) y Ncaninum_LIV_000533300 (NcSAG4), respectivamente (figura 24A y 24B).

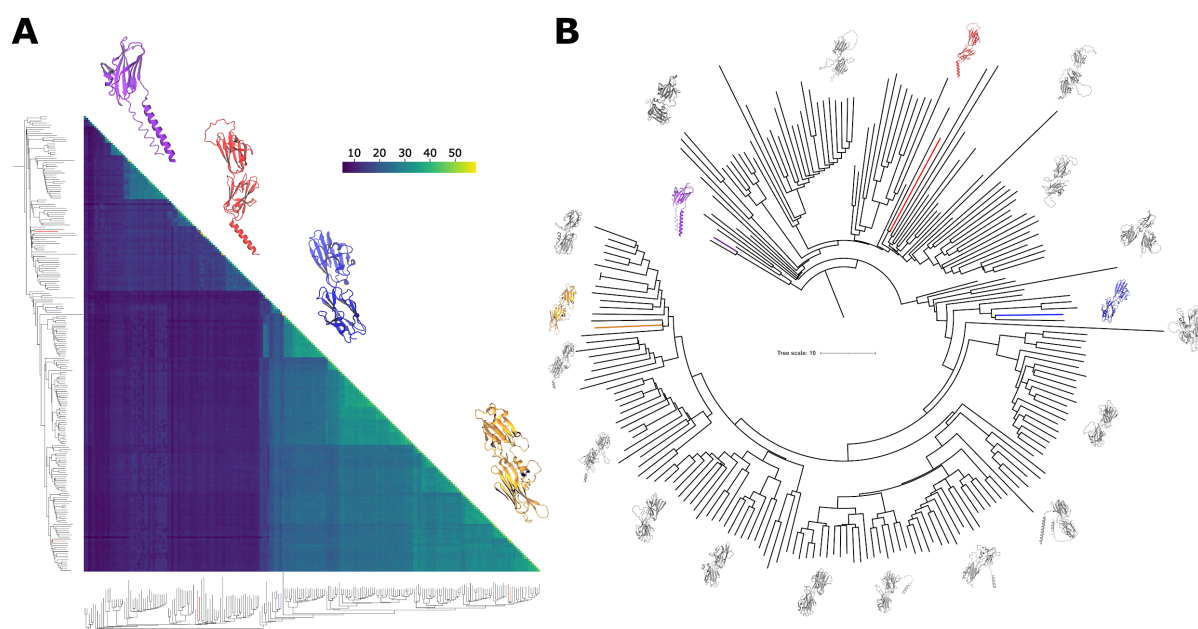


Figura 24. Análisis integral de la similitud estructural mediante un mapa de calor y un dendrograma. (A) El mapa de calor muestra la similitud estructural entre las proteínas mediante un gradiente de color que va del azul al amarillo, donde el azul indica baja similitud y el amarillo, alta. Este mapa muestra la región triangular inferior de la matriz de similitud. A lo largo de los ejes del mapa de calor se representa un dendrograma que ilustra el agrupamiento jerárquico de estas estructuras. Se destacan de forma diferenciada las estructuras clave relevantes para este estudio: Ncaninum000533300 (SAG4) en color violeta, Ncaninum000104000 (un ortólogo de SporoSAG) en rojo, Ncaninum000061800 (SAG1) en azul y Ncaninum000678300 (BSR4) en amarillo. (B) El

dendrograma en forma de estrella, derivado de la matriz de similitud estructural, representa eficazmente las relaciones estructurales y la diversidad entre las proteínas analizadas. Cada clado del dendrograma está representado por una estructura única, seleccionada aleatoriamente y coloreada en plateado, con el fin de ejemplificar la variación y las similitudes dentro de los grupos. Esta representación destaca la amplitud de la diversidad estructural y facilita la identificación de similitudes y diferencias significativas en el conjunto de datos. Las estructuras proteicas relevantes resaltadas en este estudio están coloreadas como en el panel (A).

En la figura 25 se ven de forma más claras las estructuras que se eligieron como referentes mostradas en el mapa de calor. Estas son de importancia ya que NcSAG4 y NcBSR4 ambas pertenecen al estadio de bradizoíto y se encuentran en diferentes zonas del árbol de estructuras.

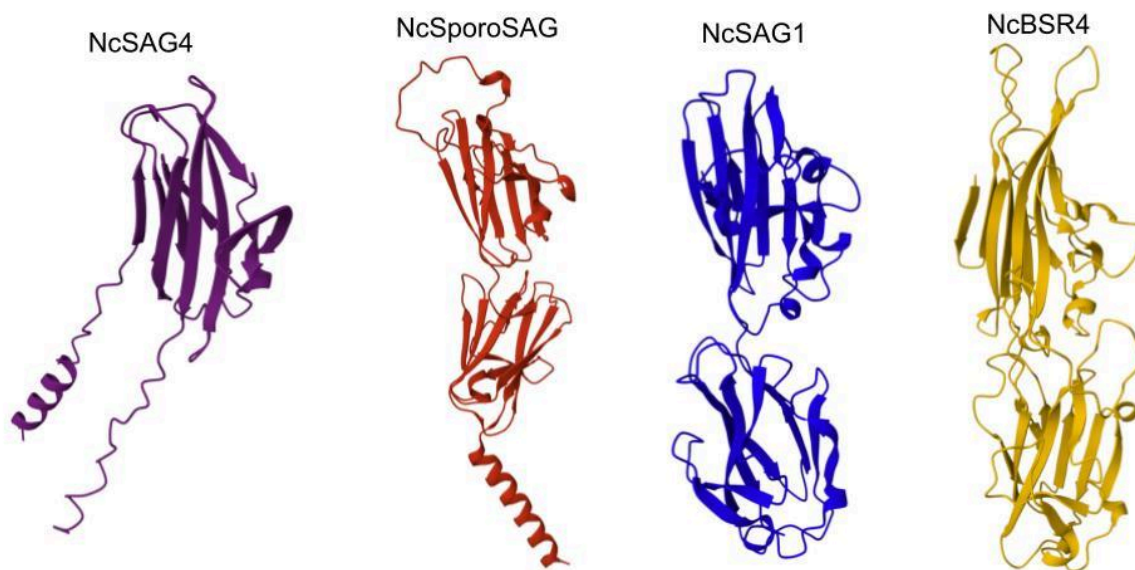


Figura 25. Estructura modelada en AlphaFold de las proteínas que representan los diferentes grupos. Se mantiene el código de colores utilizado previamente.

Se procedió a realizar la medida de las hélices presentes en NcSporoSAG y NcSAG4 que podrían tratarse de hélices de anclaje a la membrana y ver si presentan el largo necesario para tratarse de una porción transmembrana. Para la hélice de NcSporoSAG se obtuvo una medida de 27 Å lo que indicaría que, podría ser una porción transmembrana de la proteína. En el caso de NcSAG4 la porción estructurada como hélice, midió 16 Å, lo que es más pequeño que un membrana, pero podría tratarse de un anclaje a la membrana que no necesariamente sea transmembrana.

4.2 Localización y efectos en la infección de NcSAG1 y NcSRS2

4.2.1 Localización celular de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2

Los anticuerpos producidos en el apartado 3.4.1 se utilizaron para realizar IFI y determinar la localización celular de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2. Como se observa, ambas proteínas se encontraron en la superficie del parásito (figuras 26A y 26B).

Como se puede observar en las figuras 26A y 26B, se marca con flechas blancas la formación de protuberancias en la superficie celular encontradas tanto para NcSAG1 como para NcSRS2. Estas protuberancias pueden indicar la secreción de estas proteínas o la formación de vesículas que las presentan en su superficie.

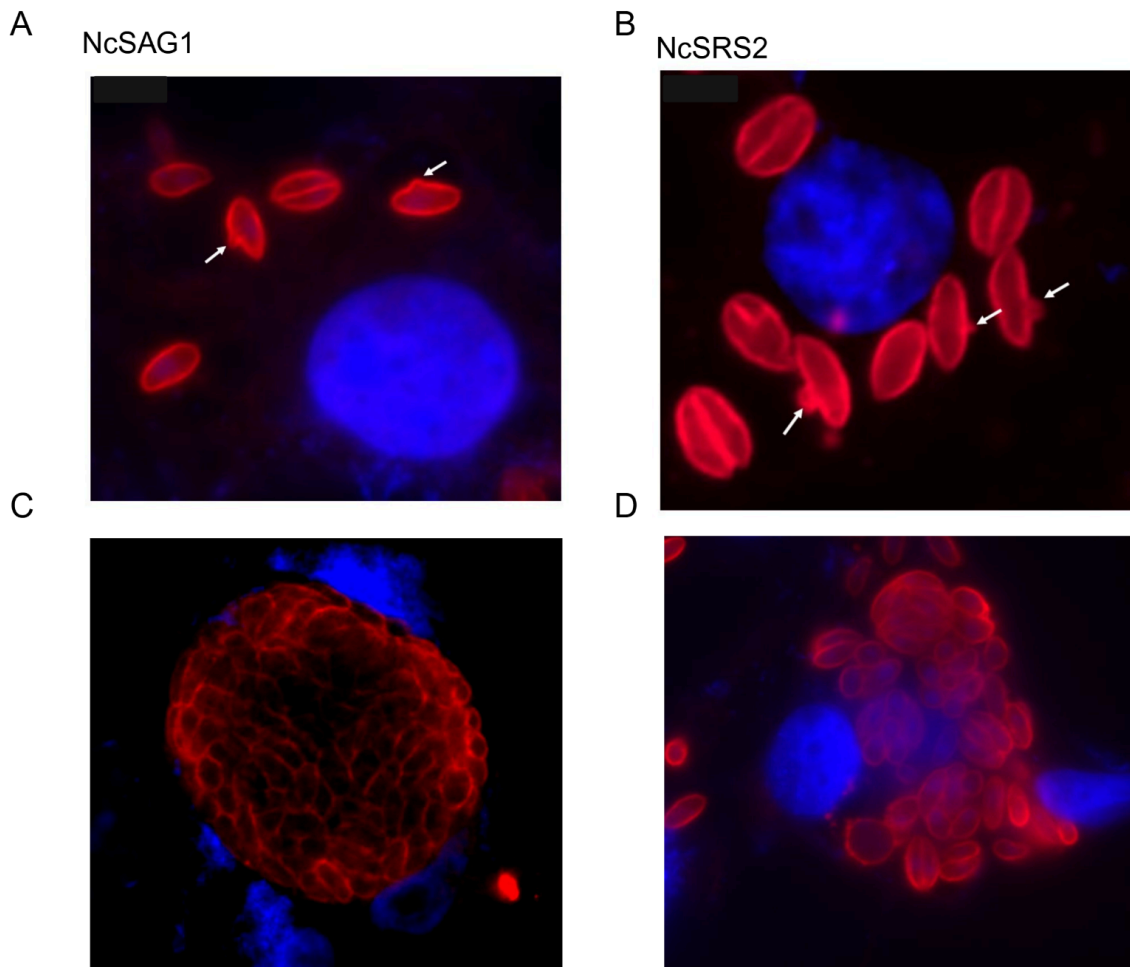


Figura 26. Inmunofluorescencia indirecta para marcar NcSAG1 y NcSRS2. En los paneles (A) y (B) se encuentran imágenes de IFI clásica, mientras que en los paneles (C) y (D) se realiza con técnica de microscopía de expansión e IFI. Los paneles (A) y (C) corresponden al marcado de NcSAG1 y los paneles (B) y (D) al marcado de NcSRS2.

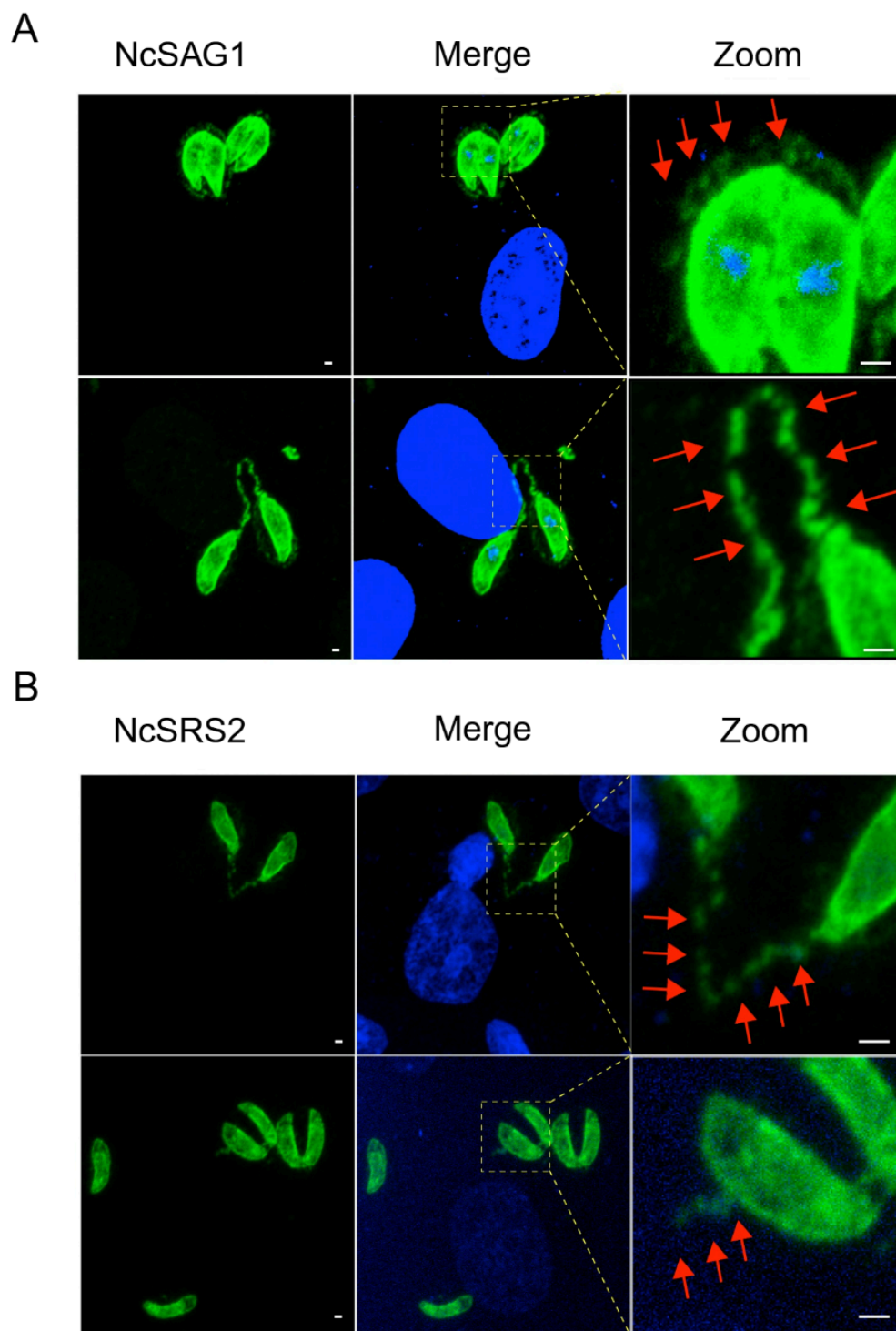


Figura 27: Localización celular de las proteínas NcSAG1 (A) y NcSRS2 (B) utilizando técnica de microscopía confocal e inmunofluorescencia indirecta, las flechas rojas señalan lo que parece ser la secreción de las proteínas.

Para mejorar la resolución de estas estructuras, se procedió a realizar microscopía de expansión (figuras 27A y 27B), en la que se observa que ambas proteínas salen del parásito (señaladas con la flecha roja).

Como ambas proteínas se encuentran en la superficie celular, se procedió a realizar, utilizando el protocolo de microscopía de expansión, una IFI de colocalización de ambas proteínas que se puede observar en la figura 28.

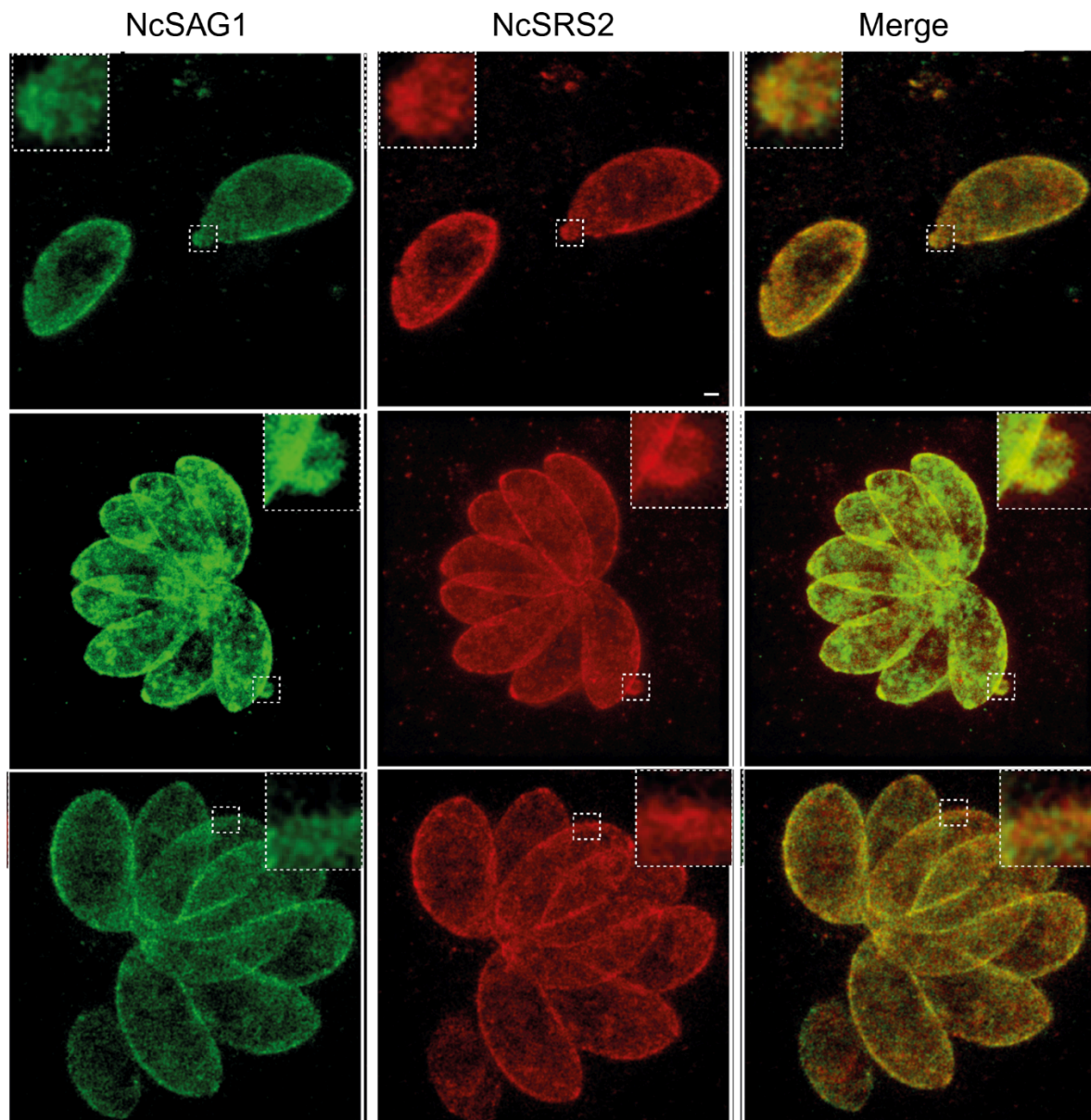


Figura 28. Colocalización de NcSAG1 y NcSRS2. Microscopía de expansión donde en verde se marca NcSAG1, en rojo NcSRS2 y en amarillo aparece la superposición de ambas.

Como se observa en la figura 28, ambas proteínas se encuentran efectivamente en la superficie celular y vuelven a encontrarse en protuberancias, lo que sugiere su secreción. También se observa que, al superponer las imágenes, ambas proteínas parecen colocalizarse en algunas secciones del parásito. Esto podría deberse a que interactúan entre sí.

4.2.2 Presencia de NcSAG1 y NcSRS2 en vesículas extracelulares y medio de cultivo

Se procedió a aislar, mediante pasos de ultracentrifugación, las vesículas presente en el sobrenadante de células Vero infectadas por *N. caninum*, como se describe en la sección 3.1.5.

Una vez obtenidas las vesículas, se realizó un Western blot para verificar la presencia de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 (figura 28).

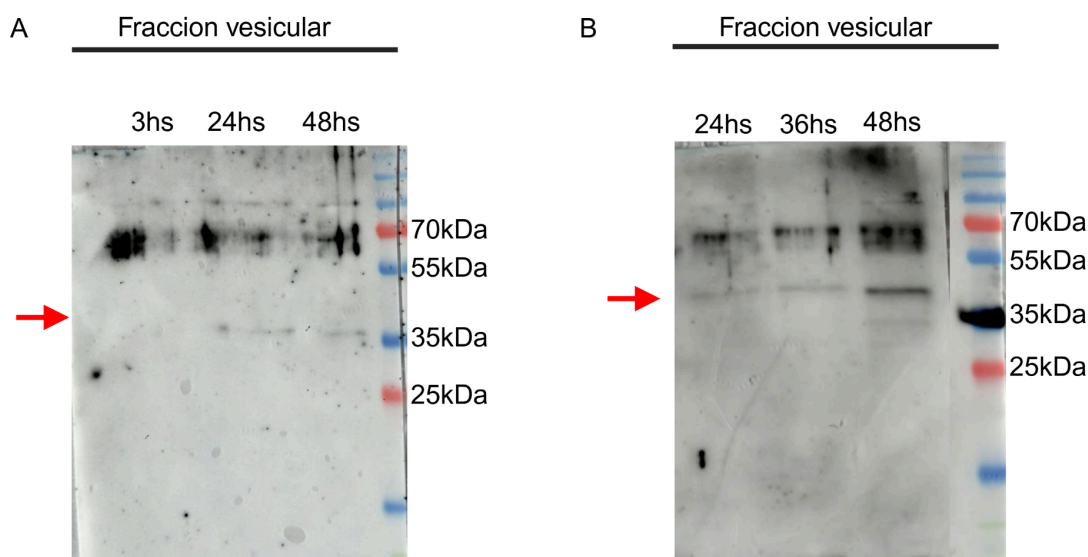


Figura 29. Visualización por Western blot de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 presentes en la fracción vesicular. (A) es el western blot para NcSAG1, (B) es el western blot para NcSRS2. Las horas que aparecen en los carriles indican las horas en que se incuban los parásitos con las células VERO, a excepción de las 3 h, en las que se incuban los parásitos solos.

En la figura 29 se puede observar marcada con las flechas rojas la presencia de una banda de peso molecular esperado para NcSAG1 y NcSRS2 (29A y 29B, respectivamente). En este resultado mostramos el western obtenido en el tratamiento A (sección 3.1.5), en el que, mediante digestión con proteinasa K, se eliminaron las proteínas de superficie de la vesícula, por lo que se sugiere que ambas proteínas se encuentran en el interior de las vesículas.

Para verificar esto se aplicó la estrategia B (sección 3.1.5) donde se trata el asilado de vesículas con tritón y proteinasa K de forma de que la enzima puede entrar a las vesículas y digerir tanto lo que se encuentra dentro como lo que se encuentra fuera. Como se puede visualizar en la figura 30, luego de este tratamiento no se observó señal para las proteínas en el Western blot, indicando que las mismas se encontraban en la parte interna de la vesícula.

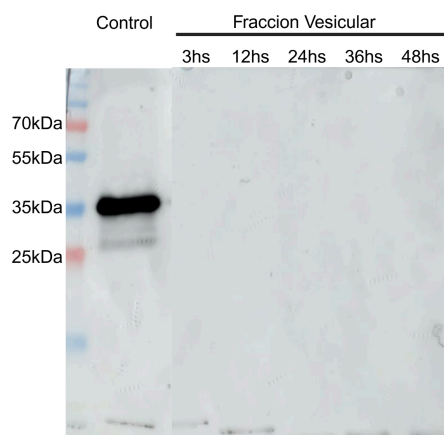


Figura 30. Visualización del Western blot para NcSRS2 de la fracción vesicular tratada con tritón y proteinasa K. En el carril que dice control se encuentra sembrada la proteína rNcSRS2 como control positivo. Las horas que aparecen en los carriles indican las horas en que se incuban los parásitos con las células VERO, a excepción de las 3 h, en las que se incuban los parásitos solos.

Durante los ensayos de separación de vesículas, al correr y visualizar la fracción correspondiente al medio libre de vesículas, fue posible observar bandas que fueron reconocidas por los anticuerpos específicos para NcSAG1 y NcSRS2 (figura 31).

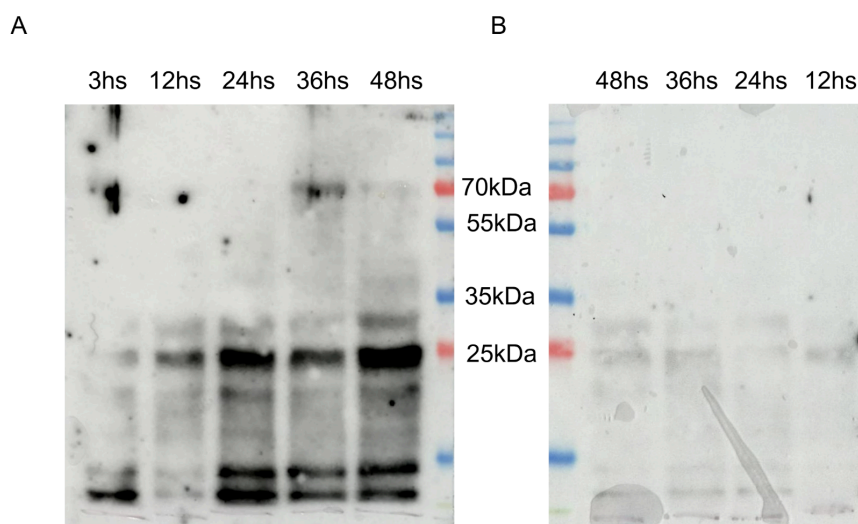


Figura 31. Western blot de la fracción medio para las proteínas NcSAG1 y NcSRS2. (A) corresponde al western para la proteínas NcSAG1 y (B) para la proteínas NcSRS2. Los tiempos indicados en los carriles corresponden a las horas de incubación de los parásitos con células VERO, excepto el carril de 3 h, que corresponde a parásitos incubados en ausencia de células.

Como se puede observar en las figura 31 las bandas que reaccionan en la fracción medio con los anticuerpos específicos para NcSAG1 y NcSRS2 (figura 31A y 31B, respectivamente) son de menor peso molecular a las identificadas en el extracto de *N. caninum*, así como a las que se identifican en la fracción vesicular. Siendo la banda que presenta reactividad menor a 25 kDa. Esto puede deberse a un proceso de proteólisis.

De los resultados obtenidos podemos resaltar que las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 están presentes en las vesículas que se encuentran en el medio de células VERO infectadas con *N. caninum* y que están en la parte interior de estas vesículas. También que estas proteínas se encuentran en forma soluble en el medio de cultivo, tanto de células VERO infectadas como de parásitos solos.

4.2.3 Búsqueda de interactores de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2

Para determinar si las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 podían formar heterodímeros, se realizó un *crosslinking* de las proteínas de la superficie del parásito. Esta técnica también nos permitiría identificar posibles proteínas con las que estén interaccionando. Para visualizar el resultado se realiza un Western blot con los anticuerpos específicos de cada una de las proteínas (figura 32).

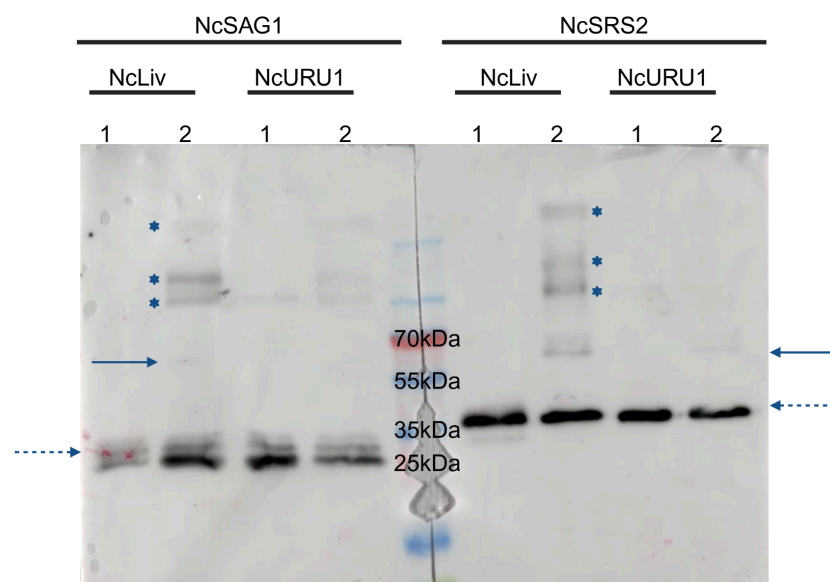


Figura 32. Western blot de los extractos de *N. caninum* con y sin *crosslinking* químico. 1 es el extracto sin tratamiento y 2 el extracto con el *crosslinking*. Las flechas punteadas marcan el monómero de las proteínas. La flecha sólida y los asteriscos son bandas de proteínas que se recuperan posteriormente al *crosslinking*. NcLiv y NcURU1 indican la cepa de la que proviene el extracto proteico. El marcado de peso molecular corresponde al MW1.

En la figura 32 se puede observar que para NcSAG1 se recuperan 4 bandas, que no se encuentran presentes en la fracción sin *crosslinking*, también se recuperan 4 bandas para NcSRS2, donde la banda señalada con la flecha sólida parece estar presente tanto en NcSAG1 como NcSRS2. Este resultado podría sugerir que las proteínas forman un heterodímero. La flecha punteada señala el monómero de cada proteína. Con asteriscos se señalan otras tres bandas que solo están presentes en las fracciones tratadas. No parece haber diferencias entre las bandas recuperadas de ambas cepas. Si bien para la fracción de NcURU1, en el caso del anticuerpo para NcSRS2, se observa poca señal, sería necesario realizar más ensayos para validar si se debe a cambios en los interactores o a un problema de concentración de la muestra.

Para poder identificar qué proteínas están interactuando con NcSAG1 y NcSRS2, se realizó un gel de Coomassie y se cortaron aquellas bandas visibles para su identificación por espectrometría de masa.

Sin embargo, como las bandas provenían de un gel de una dimensión los resultados obtenidos presentaban una gran variedad de proteínas por lo que no fue posible identificar los interactores de las proteínas en esta instancia. Es posible que el número de proteínas obtenido en la espectrometría de masa se debiera a la presencia de más de una proteína del mismo peso molecular en la banda cortada del gel.

4.2.4 Capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-NcSAG1 y anti-NcSRS2

Para ensayar la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados en la sección 4.1.3, se realizó el protocolo descrito previamente (sección 3.4.4) y se contaron las placas de lisis generadas utilizando el programa ImageJ (sección 3.5.6). En la figura 33 se muestra el resultado obtenido.

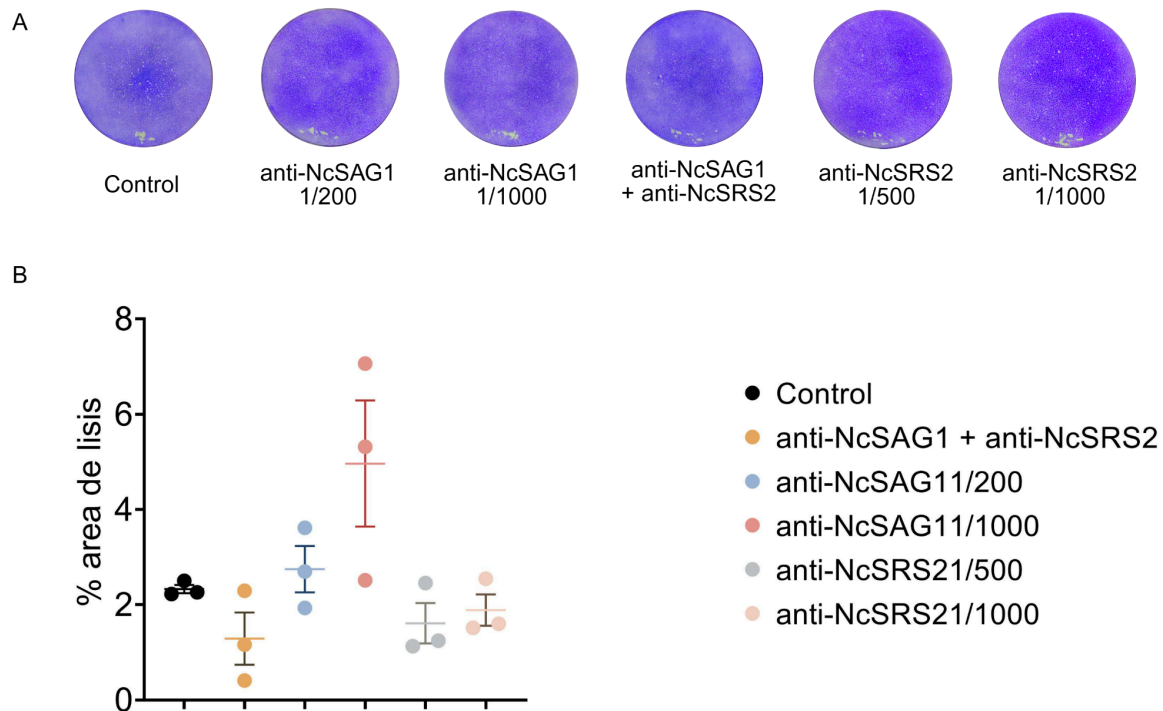


Figura 33. Resultados de la seroneutralización con los anticuerpos generados en ratón. (A) Fotos representativas de los resultados de Giemsa en las diferentes diluciones. (B) Gráfica del porcentaje de área correspondiente a placas de lisis.

Como se puede observar en la figura 33, no se obtuvo una diferencia significativa en la disminución de las infecciones por parte de los parásitos a las células Vero en las condiciones ensayadas. Si bien se puede observar una cierta tendencia a que haya menor cantidad de placas de lisis cuando se combinan ambos anticuerpos no llega a tener una diferencia significativa, en forma estadística. Estos resultados pueden deberse a que la cantidad de anticuerpos utilizados fue menor al necesario o a que si bien los anticuerpos que se generaron tienen buena capacidad de reconocimiento de las proteínas, no son tan eficientes para neutralizar la infección por el parásito.

4.2.5 Efectos de las proteínas en la infección por *N. caninum*

Se realizó un primer acercamiento para conocer si las proteínas podrían tener un efecto en fomentar la infección por parte del parásito en las células Vero. Para esto se realiza en el ensayo descrito anteriormente (3.1.4).

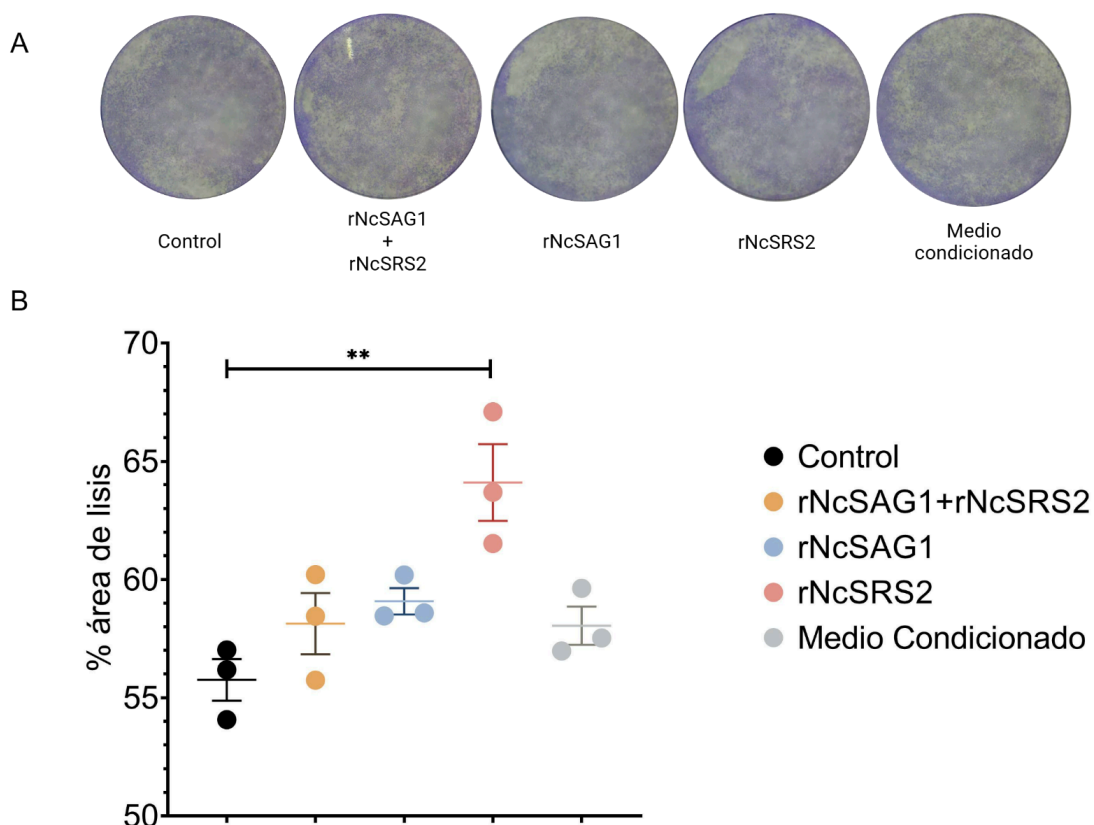


Figura 34. Resultados del conteo de placas de lisis. (A) Fotos representativas de los resultados del Giemsa. (B) Gráfica de los resultados del recuento del porcentaje de área de lisis en las distintas muestras.

Como se puede observar en la figura 34, se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de área de lisis de las células previamente incubadas con la proteína rNcSRS2. Si bien la diferencia no es significativa en las demás condiciones, se observa un leve aumento del área de lisis con respecto al control. Por otra parte, se realizó IFI de este mismo tratamiento para poder visualizar la cantidad de células infectadas y si había diferencia en el tamaño de las vacuolas formadas y qué tan infectadas se encontraban las células Vero (figura 35).

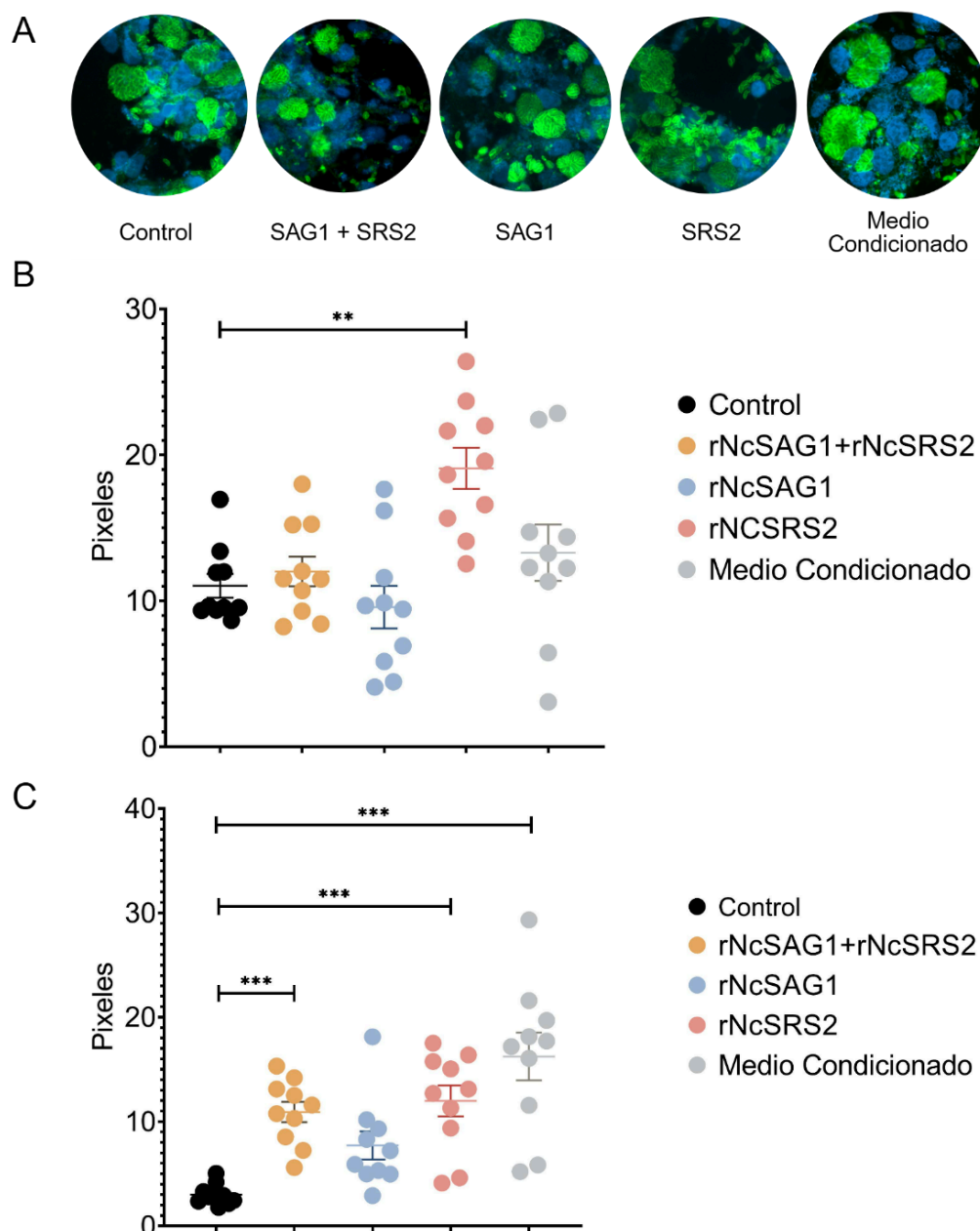


Figura 35. Resultados de los tamaños de las vacuolas y el área de ocupación de los parásitos. (A) Imágenes representativas de los resultados de las IFI. (B) Gráfica del porcentaje de área ocupada por parásitos en las distintas condiciones. (C) Gráfica de los tamaños promedio de las vacuolas parásitas en las diferentes condiciones.

Como se puede observar en la figura 35B, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en el área ocupada por parásitos, lo que se puede traducir como cantidad de células infectadas, para las células incubadas con rNcSRS2, no así con el resto de las condiciones. En el caso de la figura 35C se observa que los tamaños promedio de vacuolas es significativamente mayor tanto en las presencia de rNcSRS2, como en las células incubadas con medio condicionado. Esto podría indicar que la proteína rNcSRS2 favorece la infección y la proliferación de los parásitos en las células hospederas, un efecto que no se observó en este trabajo ni en las condiciones ensayadas para rNcSAG1. Los datos de los p-valores obtenidos y el análisis estadístico realizado se encuentran en el Apéndice III.

4.3 Ensayos de atenuación de *N. caninum*

Con el fin de estudiar la expresión diferencial entre taquizoíto y bradizoíto se procedió a realizar ensayos que permitieran generar el viraje de los parásitos de un estadio a otro. Para evaluar este cambio se utilizaron, en primera instancia, ensayos de invasión de las células Vero. El resumen de los resultados se muestra en la figura 36.

Como se detalla en la sección 3.1.1, las células fueron infectadas utilizando una relación célula/parásito conocida. No obstante, dicha relación varió entre ensayos debido a que la cantidad de parásitos recuperados fluctuó en cada repetición. Por este motivo, en cada experimento se incluyó un control con parásitos no sometidos a estrés, lo que permitió realizar las comparaciones correspondientes. Finalmente, los resultados se expresaron como porcentajes (como se describe en la sección 3.1.1), normalizados según la relación parásito/célula empleada en cada caso.

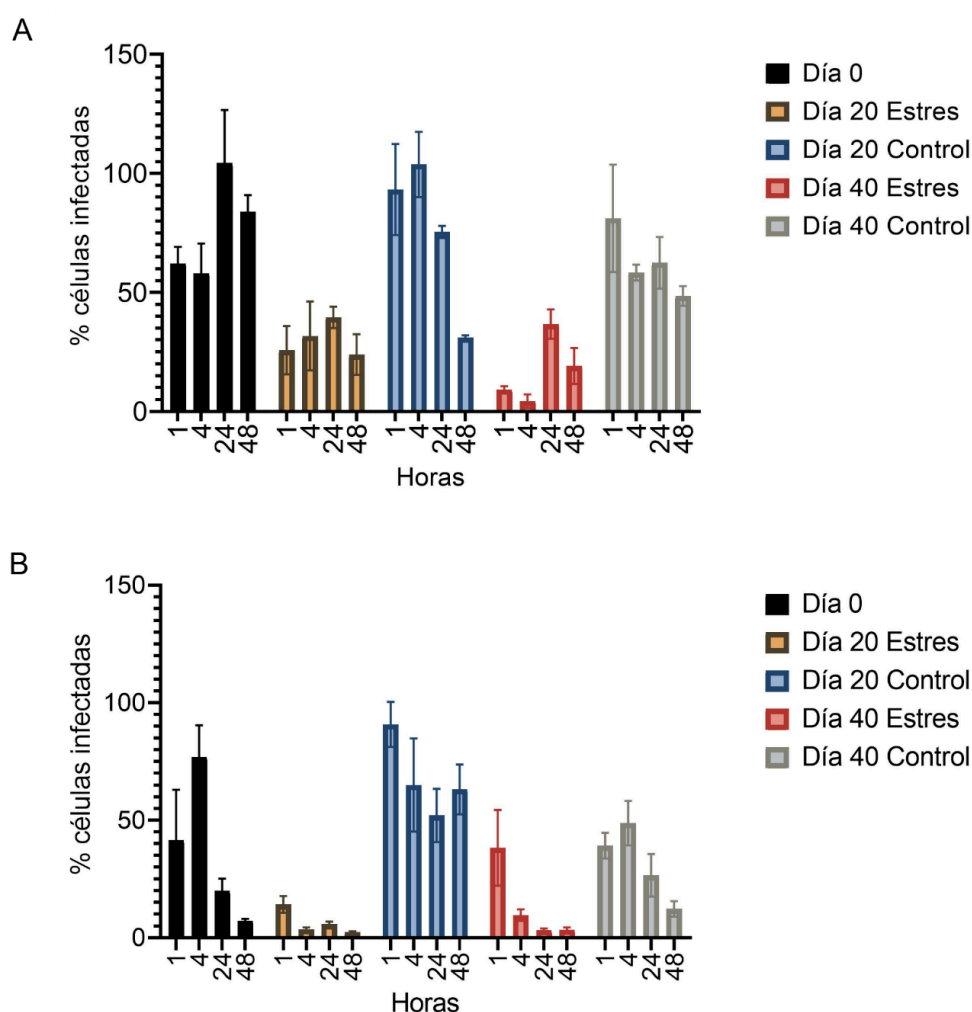


Figura 36. Resultados de ensayos de invasión de *N. caninum* para las cepas NcLiv y NcURU1. (A) Resultados generales de porcentajes de células infectadas en diferentes horas de exposición al parásito, expuesto a distintos días de estrés, para la cepa NcLiv. (B) Resultados generales de porcentajes de células infectadas en diferentes horas de exposición al parásito, expuesto a distintos días de estrés, para la cepa NcURU1.

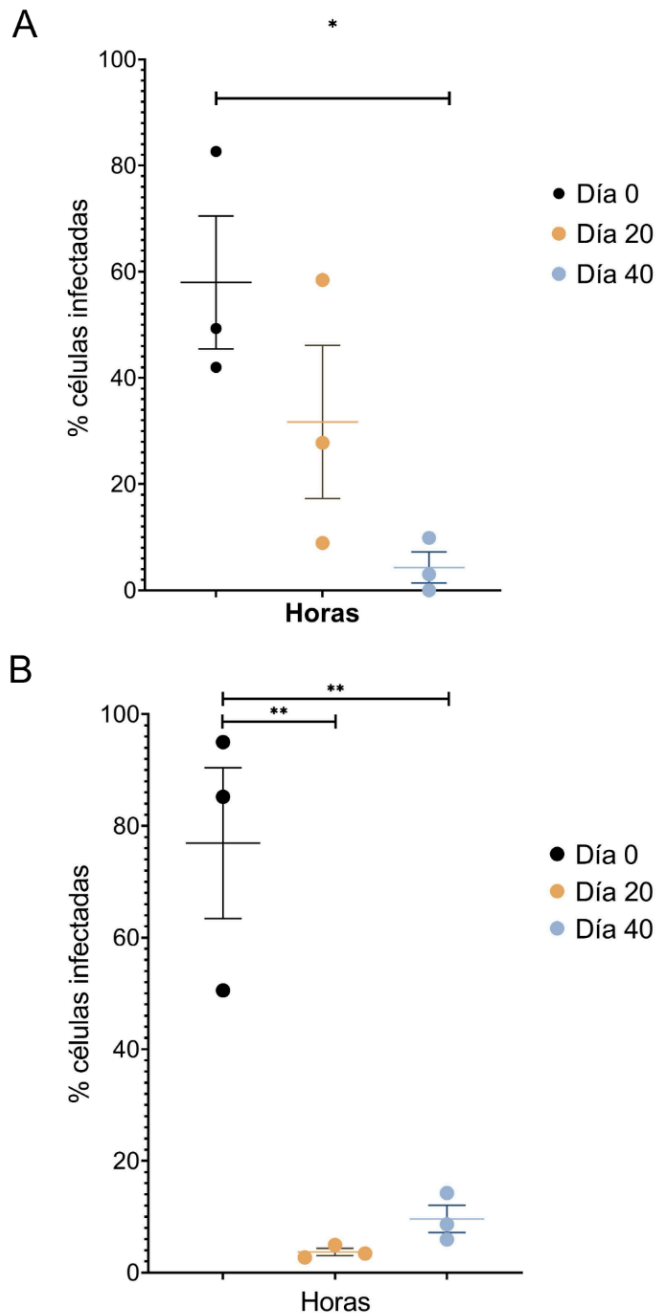


Figura 37: Resultados de ensayos de invasión en incubación por 4 horas de *N. caninum* para las cepas NcLiv y NcURU1. (A) Resultados a las 4 horas post infección del porcentaje de células infectadas, con parásitos provenientes de distintos días de estrés, para la cepa NcLiv. (B) Resultados a las 4 horas post infección del porcentaje de células infectadas, con parásitos provenientes de distintos días de estrés, para la cepa NcURU1.

Como se observa en la figura 36, se logró disminuir la capacidad infectiva de las distintas cepas a lo largo de los días posteriores al estrés. Como se puede observar en la figura 37A se encuentra diferencia significativa en la capacidad infectiva recién en el día 40 post estrés para la cepa NcLiv, en el caso de la cepa NcURU1 se encuentra diferencia significativa a partir del día 20 post estrés (figura 37B).

Se extrajo ARN de los diferentes días y se estudió la expresión relativa de los genes Ncsag1 y Ncsrs2 durante el estrés. Las figuras 38 y 39 resumen los resultados obtenidos.

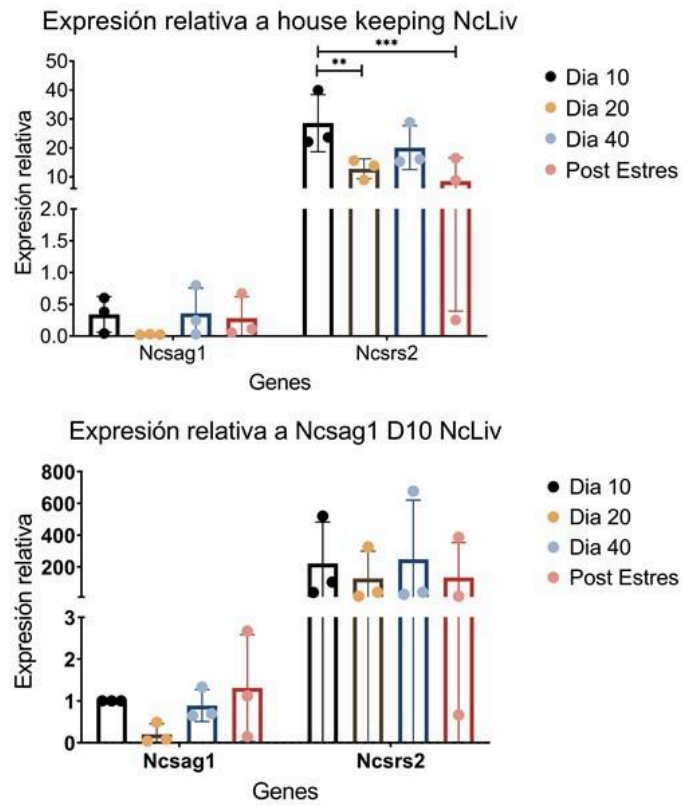
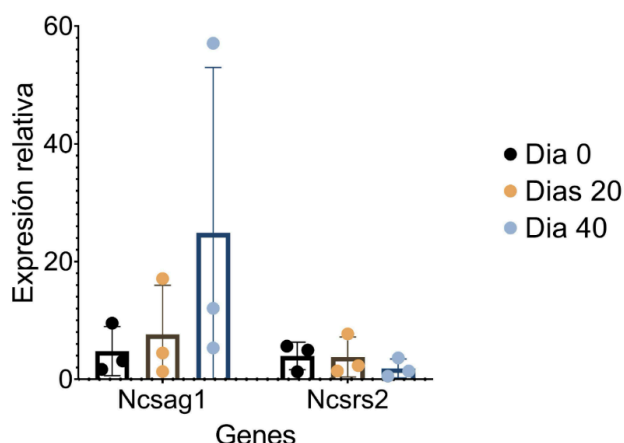


Figura 38. Expresión relativa de los genes de Ncsag1 y Ncsrs2 para la cepa NcLiv durante el proceso de estrés. (A) representan la expresión relativa de los genes respecto del gen de referencia Ncs28. (B) corresponden a la expresión relativa de los genes con respecto al gen Ncsag1 en el día 10.

A Expresión relativa a s28 NcURU1



B Expresión relativa a Ncsag1 día 0 NcURU1

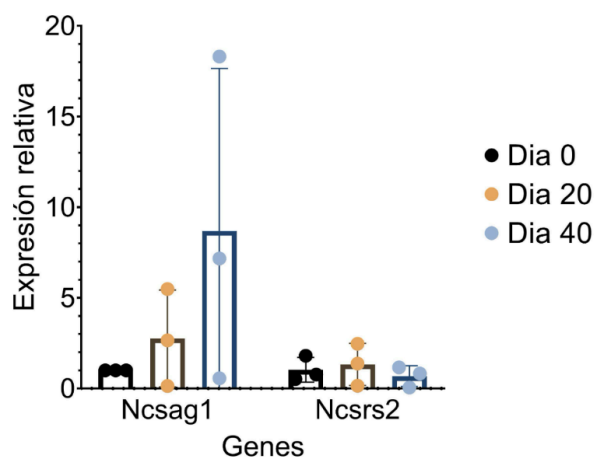


Figura 39: Expresión relativa de los genes de Ncsag1 y Ncsrs2 para la cepa NcURU1 durante el proceso de estrés. (A) representa la expresión relativa de los genes respecto del gen de referencia Ncs28. (B) corresponde a la expresión relativa de los genes con respecto al gen Ncsag1 en el día 0.

Como se puede observar comparando las figuras 38 y 39, en el caso de NcLiv parecería que el gen Ncsrs2 está más expresado que para NcURU1, por otra parte no se observa en ninguno de los dos casos una disminución en la expresión de Ncsag1 significativa durante el estrés. Lo que, de hecho, se observa para NcURU1 es, al contrario, que parece aumentar su expresión (figuras 39A y 39B). En el caso de NcLiv, cuando se observa la expresión relativa con respecto al gen de Ncs28 (figura 38A), se observa una diferencia significativa en el cambio de expresión del gen de Ncsrs2, disminuyendo en los días 20 y post estrés. Si bien los resultados de la expresión de los genes no parecen indicar la presencia de bradizoitos, la disminución de la capacidad infectiva en ambas cepas (figuras 36 y 37), parecen indicar que sí se logró atenuar. Los resultados de los cálculos estadísticos se encuentran en el Apéndice III.

5. Discusión

En esta tesis se logró la expresión, la purificación y la caracterización de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2. Para ello se seleccionó el sistema de expresión en células S2 de *D. melanogaster* debido a sus ventajas comprobadas, que incluyen una producción eficiente de proteínas secretadas, así como una purificación y una escalabilidad simplificadas (72,89). Además, este sistema permitió superar las limitaciones comúnmente asociadas a los sistemas procarióticos, tales como la insolubilidad y los bajos niveles de expresión, al tiempo que se logró la correcta formación de los puentes disulfuro, condición esencial para preservar la integridad estructural y funcional de estas proteínas, como se ha descrito previamente para las proteínas SRS de *T. gondii* (54,56,90).

Dado que se trata de glicoproteínas, resulta esencial incorporar dichas modificaciones postraduccionales. No obstante, debe señalarse que el patrón de glicosilación en las células S2 puede no reproducir exactamente el de *N. caninum*, lo que podría influir en el reconocimiento de epítomos y en la modulación de la respuesta inmune. Ambas proteínas recombinantes, rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST, se obtuvieron en forma soluble, alcanzando rendimientos comparables a los de los sistemas procarióticos más eficientes, lo que sugiere que la combinación de las células S2 con los vectores pMT/V5-His y pCoPuro, es una estrategia que posiciona a este sistema de expresión como una opción altamente recomendable para la expresión de proteínas de origen eucariota. La producción estable y soluble de rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST permitió complementar los estudios estructurales con una caracterización físico-química detallada, como se discutirá más adelante.

Analizando las secuencias aminoacídicas de estas proteínas comprobamos que ambas proteínas presentan las características distintivas de la familia SRS, incluyendo una secuencia señal en el extremo N-terminal, una señal de anclaje GPI en el extremo C-terminal, dos dominios (D1 y D2) conectados por una unión flexible (región bisagra) y doce cisteínas conservadas que forman los puentes disulfuro característicos (figura 9). A pesar de su baja identidad global de secuencia, NcSAG1 y NcSRS2 comparten una alta similitud estructural, evidenciada al comparar ambas estructuras utilizando el programa *Pairwise Structure Alignment*, como se puede observar en la figura 13 (según se explica en la sección 3.5.2). En esta comparación, obtuvimos valores de TM de 86% para las proteínas completas y de 83% para los dominios D1 (tabla 2). Estos valores indican una alta identidad estructural, pudiendo deberse sus diferencias a las regiones no estructuradas como los loops y la zona bisagra. Estos resultados sugieren que la conservación estructural podría ser esencial para mantener la integridad funcional. Los dominios D1, con una mayor identidad de secuencia que los D2, podrían contribuir a una función central conservada, mientras que los dominios D2, más divergentes, favorecen funciones especializadas o diferenciadas. Si consideramos su función en la adhesión a la superficie de la célula, la conservación de las secuencias en los dominios D1 podría sugerir que se están uniendo al mismo receptor o a receptores muy similares.

Las estructuras predichas mediante AlphaFold resaltan la importancia de los patrones de puentes disulfuro en la estabilización de la arquitectura proteica. Aunque la posición relativa de estos puentes difiere entre NcSAG1, NcSRS2 y la proteína TgSAG1 (estructuralmente resuelta), el orden general de los enlaces disulfuro mantiene el mismo patrón: C1-C6, C2-C5 y C3-C4 (figuras 3 y 11). A esto se suma, que según nuestros resultados

experimentales de caracterización fisicoquímica, las estructuras más estables parecen ser los dímeros de las proteínas, como fue previamente reportado para TgSAG1(56). En los modelados de AlphaFold, podemos observar que el homodímero obtenido para NcSAG1 presenta similitud con la estructura cristalizada para TgSAG1. Esta similitud estructural, en la que se mantiene la presencia de una “hendidura” en la interfaz entre los dominios D1 de ambas proteínas, podría ser esencial para funciones biológicas como la adhesión a las células hospederas, como ha sido reportado para otras proteínas SRS (91). Las estructuras más estables predichas corresponden a formas diméricas, cuya similitud con el dímero cristalizado de TgSAG1 sugiere que esta organización podría ser esencial para funciones biológicas como la adhesión a la célula hospedadora o la evasión inmune, tal como se ha reportado para otras proteínas SRS (92). Esta hipótesis es respaldada por los ensayos experimentales presentados posteriormente, como lo son los resultados de la cromatografía de gel filtración y el CD. La comparación de las estructuras se realizó (según se explica en la sección 3.5.2) utilizando el programa *Pairwise Structure Alignment*, en la comparación estructural entre NcSAG1 y TgSAG1 el puntaje obtenido fue de 61% (tabla 2), este es un TM moderado, que indica que la similitud entre las estructura es alta, pero existen zonas de divergencia estructural. La divergencia estructural puede deberse a la adaptación a diferentes hospederos, en los que la presión inmunológica puede estar actuando en su selección.

Los datos obtenidos mediante predicciones estructurales fueron confirmados por estudios bioquímicos y biofísicos. En la primera etapa de purificación, ambas proteínas se eluyeron en un pico principal compatible con la formación de dímeros. La inclusión de un paso adicional de cromatografía de exclusión molecular (SEC) mejoró significativamente la pureza y la resolución de los estados oligoméricos, lo que permitió aislar rNcSAG1-ST y rNcSRS2-ST como dímeros estables (figura 19). Esta estabilidad se corroboró mediante los altos valores de temperatura de fusión determinados por nanoDSF: 58,6 °C para rNcSAG1-ST y 53,1 °C para rNcSRS2-ST. Estos valores de temperatura son elevados para proteínas recombinantes, lo que refleja un plegamiento correcto y una notable estabilidad intrínseca. La capacidad de ambas proteínas de replegarse tras la exposición a temperaturas de hasta 90 °C, sin evidencia de agregación, demuestra una integridad estructural robusta, adecuada para estudios experimentales avanzados. Se puede inferir que el dímero representa la unidad funcional en ambos casos, con implicancias directas para futuros estudios sobre posibles ligandos e inhibidores. Asimismo, la termorresistencia observada podría reflejar adaptaciones evolutivas que aseguran la funcionalidad en ambientes de temperatura variable, aspecto que merece una exploración más profunda en el contexto de sus funciones biológicas nativas.

En este sentido, el análisis de dicroísmo circular (CD) de rNcSAG1* y rNcSRS2* aportó información valiosa sobre su estructura secundaria y reforzó la solidez de los modelos generados por AlphaFold. La estrecha concordancia entre las estimaciones de estructura secundaria obtenidas por CD para rNcSAG1* y rNcSRS2* y las derivadas de las proteínas TgSAG1, TgBSR4 y TgSporoSAG sugiere la presencia de un motivo arquitectónico conservado en esta familia proteica (figura 23). Esta conservación refleja una presión evolutiva orientada a mantener elementos estructurales esenciales para la función, tales como la unión a ligandos o las interacciones hospedador-parásito. La predominancia de hebras β antiparalelas relajadas y con torsión dextrógira indica una preferencia estructural que podría ser clave para su estabilidad y sus interacciones moleculares. La presencia de

α -hélices distorsionadas y giros sugiere, además, una versatilidad estructural que facilita los cambios conformacionales dinámicos requeridos para su función. Estos resultados indican que las hebras β constituyen el esqueleto estructural de la familia SRS, aportando estabilidad y conservación, reforzadas por los puentes disulfuro entre las seis cisteínas conservadas en cada dominio, mientras que las hélices y giros aportarían variabilidad bajo presión evolutiva, lo que posibilitaría diversidad estructural y funcional. Finalmente, la región bisagra no presenta una estructura ordenada, siendo principalmente formada por loops, lo cual está en línea con la flexibilidad que se requiere entre D1 y D2.

En suma, los análisis bioquímicos y fisicoquímicos demuestran que las proteínas recombinantes obtenidas son de alta calidad y, por tanto, aptas para su uso como herramientas en el desarrollo de técnicas diagnósticas avanzadas y de vacunas. Se espera que las proteínas que reproducen fielmente el plegamiento y las modificaciones postraduccionales nativas optimicen el reconocimiento por el sistema inmune, lo cual es crítico para la eficacia tanto de los ensayos diagnósticos como de las formulaciones vacunales. Estudios previos de vacunación utilizaron fragmentos proteicos o formas insolubles, lo que limitó el reconocimiento antigénico a secuencias específicas (39,68,93). La ausencia de NcSAG1 disminuye la infectividad del parásito, lo que sugiere que la neutralización mediada por anticuerpos contra esta proteína podría reducir significativamente la capacidad infectiva. No obstante, la redundancia dentro de la familia SRS podría requerir la inclusión de múltiples antígenos para lograr una inhibición completa (62). Un estudio reciente, en el que se utilizó NcSAG1 recombinante expresada en *E. coli*, demostró eficacia protectora en bovinos, con fuertes respuestas humorales y activación de las PBMC (94). La incorporación de NcSAG1 y NcSRS2 en sus formas más cercanas a sus estructuras nativas podría potenciar estos resultados. En este sentido, se generaron anticuerpos en modelo murino contra ambas proteínas recombinantes, y cada uno reconoció específicamente las bandas del tamaño esperado, cuando se los enfrentó a lisados de *N. caninum*, tanto de cepas de referencia como de cepas locales. Asimismo, los sueros de diferentes animales infectados naturalmente reconocieron dichas proteínas, lo que confirma su especificidad. La ausencia de reactividad cruzada entre anticuerpos dirigidos a diferentes proteínas recombinantes refuerza, además, su potencial diagnóstico (figura 17). La combinación de múltiples antígenos podría incrementar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas serológicas (95).

La sólida correlación entre los modelos estructurales y los datos experimentales de dicroísmo circular permitió la construcción del primer árbol filogenético basado en la estructura para la familia de proteínas SRS. Este análisis integrador, sustentado en modelos monoméricos generados por AlphaFold y comparaciones estructurales mediante DALI, ofrece una visión global del paisaje estructural y las relaciones evolutivas de la familia (figura 24). Cabe destacar que todos los análisis computacionales —incluyendo predicción estructural, agrupamiento y reconstrucción filogenética— se realizaron empleando las formas monoméricas, por lo que los resultados deben interpretarse como hipótesis estructurales más que como conclusiones definitivas.

Nuestros resultados revelaron clados estructurales diferenciados que coinciden con agrupamientos basados en secuencia y respaldan hipótesis sobre una posible especialización funcional. En *T. gondii*, las proteínas SRS se agrupan en dos clases bien caracterizadas (SAG1 y SAG2A) (36); un patrón similar se observó en *N. caninum*, donde

NcSAG1 y NcSRS2 conforman un subclado dentro del grupo SAG1-like, lo que posiblemente refleje adaptaciones específicas de especie. A diferencia de estudios previos que reportaron una agrupación dependiente del estadio en *T. gondii* (36,54), nuestro árbol estructural (figura 24B) no mostró segregación por etapa del ciclo, lo que sugiere que la similitud estructural podría relacionarse más con características funcionales que con la expresión temporal, aunque esta hipótesis requiere validación adicional.

Por otra parte, es importante mencionar que las proteínas NcSAG1 y NcSRS2, tanto en el árbol filogenético por secuencia como en el árbol por identidad estructural, se encuentran en el mismo clado, incluso conservando las secuencias vecinas. Si bien en el árbol estructural hay reordenamientos con respecto al filogenético, este grupo de proteínas coincide en ambos árboles. Esto nos puede sugerir que este grupo de proteínas tiene una función similar y está estrechamente relacionado, no solo a nivel de secuencia aminoacídica, sino también en estructura. Cabe destacar que si bien estamos comparando estructuras teóricas, generadas por AlphaFold, los estudios de CD realizados en este trabajo coinciden estrechamente con las características estructurales predichas por AlphaFold, lo que respalda la validez de los modelos.

Tomando en cuenta que para hacer los modelados de las proteínas se tomaron las secuencias aminoacídicas presentes en ToxoDB y considerando que las estructuras representativas mostradas en la figura 25 abarcan entre 180 y 420 aminoácidos. Los modelos más cortos presentan un único dominio tipo β -sándwich, que podría corresponder a isoformas naturales o a truncamientos derivados de *splicing* alternativo. La presencia de un solo dominio plantea la posibilidad de que esta unidad estructural, por sí sola, cumpla funciones biológicas esenciales, hipótesis que es necesario evaluar experimentalmente. Además, varios modelos presentan hélices α extendidas que sobresalen del pliegue central. Es posible que por su orientación y carácter hidrofóbico, estas hélices puedan corresponder a regiones de anclaje a membrana o a dominios transmembrana. Si bien NcSAG1 y NcSRS2 son claramente proteínas solubles y presentan el anclaje a GPI, dentro de la familia de las SRS, es posible que estas hélices puedan presentar dos posibles funciones. Una de ellas es la conexión con proteínas del citoplasma que actúan como activadores de señal, ya que al estar involucradas en el anclaje a la membrana del hospedero, es necesaria la transducción de la señal. En una segunda hipótesis, teniendo en cuenta que con fosfolipasas específicas es posible liberar las proteínas ancladas a GPI, la presencia de un segundo anclaje mediante una porción proteica puede asegurar el mantener en la superficie del parásito aquellas proteínas que son necesarias, por ejemplo, en procesos de reconocimiento de receptores. Al tomar en cuenta que esta familia presenta una estructura muy conservada, y se ha considerado la posibilidad de las funciones redundantes, quizás algunas de las proteínas puedan ser liberadas mediante el corte del anclaje GPI, mientras otra permanecen en la superficie, haciendo que la liberación al medio sea selectiva y pudiendo servir como una “cortina de humo” para el sistema inmune. Si bien los análisis topológicos detallados exceden el alcance de este trabajo, estas observaciones constituyen líneas de investigación prometedoras para dilucidar su relevancia funcional.

Como se reportó previamente, ambas proteínas se localizan en la superficie celular (figuras 26-28). Si bien esto no sorprende, dado que en otros trabajos ya se había observado (61,64), la colocalización de ambas proteínas en la microscopía de expansión puede sugerir la existencia de heterodímeros. Si bien, como se puede observar en la figura 28, no existe

una distribución homogénea de la señal, viendo en la superposición de los canales para las diferentes proteínas espacios donde las señales se cruzan (dando amarillo) y otros donde aun se mantiene la señal individual de las proteínas (zonas verdes y rojas). Esto, como ya se mencionó, puede sugerir la presencia de heterodímeros entre ambas moléculas, así como de homodímeros, aunque no podemos descartar que también pueda deberse a la superposición de la señal en el espacio tridimensional. La presencia de protuberancias en las figuras 26A y 26B (microscopía), junto con las estructuras compatibles con vesículas o liberación de proteínas de superficie hacia el medio (indicadas con flechas rojas en las figuras 27A y 27B en la microscopía de expansión), evidencia de manera clara la liberación de estas proteínas al entorno extracelular. Esto también lo pudimos observar y confirmar a partir de la separación de vesículas en el medio, así como la presencia de estas proteínas en forma soluble (figuras 29 y 31).

Por otra parte, la estructura que se ve uniéndose ambos parásitos en las figuras 27A y 27B recuerda a la microscopía de barrido del trabajo de Hemphill et al., 2013 (96), que se muestra en la figura 40. En la figura se puede observar cómo, en la parte apical del parásito se forma lo que se conoce como unión móvil, en la que, como se describe, estaban presentes las proteínas de superficie de la familia de las SRS. En nuestras microscopías se confirma la presencia tanto de NcSAG1 como de NcSRS2. A diferencia de lo descrito por Hemphill et al., 2013 (96), las imágenes de microscopía muestran no sólo la liberación de estas proteínas como resultado del movimiento del parásito hacia el interior de la célula, sino que parece haber una liberación activa, principalmente de NcSRS2, cual se observa en la figura 27B marcado con la flecha roja, se puede observar liberación por un espacio discreto del parásito. Por su parte, NcSAG1 parece ser liberada de toda la superficie del parásito; esto podría sugerir la liberación de esta proteína al medio de forma activa, quizás mediada por enzimas como se ha descrito anteriormente para *Eimeria tenella* (97), aunque el sitio de corte descrito para EtSAG1 no está presente en NcSAG1.

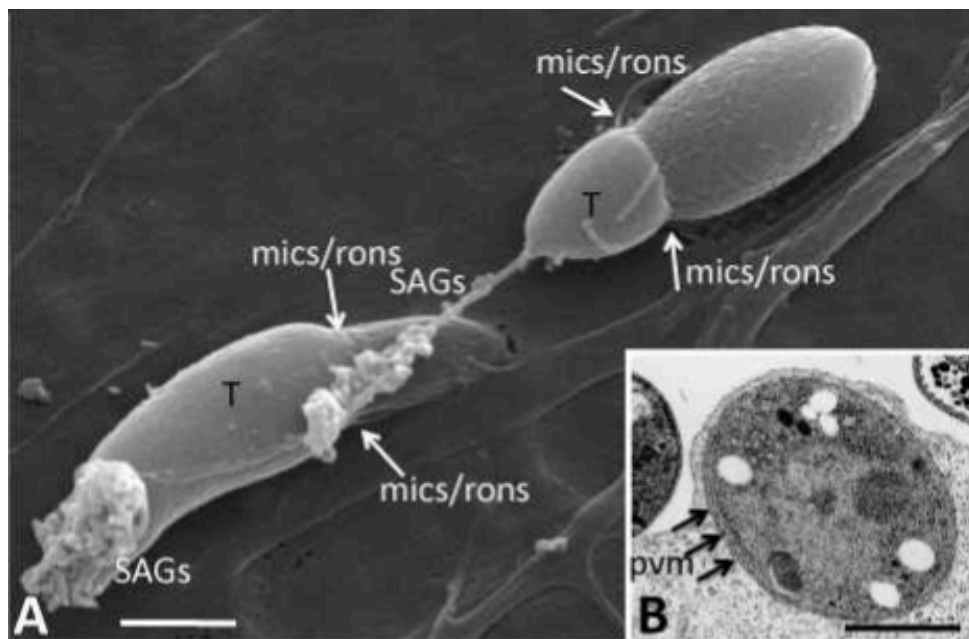


Figura 40. Microscopía por SEM y TEM del proceso de invasión de la célula hospedadora. (A) Dos taquizoítos (T) de *Neospora caninum* invadiendo in vitro un fibroblasto humano, desplazándose hacia el citoplasma de la célula hospedadora de izquierda a derecha. Se observa la formación de la unión móvil (moving junction,

flechas), probablemente compuesta por un complejo de proteínas de micronemas (mics) y del cuello de las roptrias (rons), similar a lo descrito para *Toxoplasma gondii*. (B) Tras la invasión, los parásitos quedan contenidos dentro de una vacuola parasitófora, delimitada por su correspondiente membrana (flechas). Extraído de Hemphill et al., 2013 (96).

Por otra parte, la presencia de estas proteínas, tanto en vesículas como libres en el medio, sugiere que podrían desempeñar un rol funcional. En general, a estas proteínas se les atribuye una participación en la evasión de la respuesta inmune (98). Su liberación masiva al entorno extracelular podría actuar como un mecanismo de distracción, funcionando como un “cebo” que diluye los anticuerpos circulantes y permite que el parásito ingrese a la célula hospedera, favoreciendo así la evasión del sistema inmune.

Por otra parte, se puede observar en la figura 32 el resultado del *crosslink* obtenido para las proteínas en la superficie del parásito. En este se observan bandas reconocidas por los anticuerpos que parecen tener el mismo peso molecular, lo que podría sugerir que ambas proteínas están interaccionando en la membrana del parásito. Si a este resultado le sumamos que en la microscopía de la figura 28 hay superposición de la señal para ambos anticuerpos, podría sugerir que o bien son capaces de formar heterodímeros, o están interaccionando entre sí. En el resultado de Western blot de la figura 32, también se observan bandas de mayor peso molecular, teniendo en cuenta que estas proteínas están en la superficie y que pueden estar formando estructuras con otras proteínas que participan de la unión móvil, aunque aún se desconoce cuál es el rol de las SRS en este proceso.

Si bien, en la purificación de vesículas no separamos específicamente las vesículas del parásito de las vesículas de las células Vero, por lo que se trata de una fracción vesicular total del medio de cultivo. La presencia en el interior de las vesículas de las proteínas NcSAG1 y NcSRS2 (figuras 29 y 30) podría deberse únicamente a que se encuentran mayoritariamente en la superficie del parásito, o ser resultado del desecho de las células Vero. En el trabajo de Li et al, 2018 (74), se purificaron las vesículas extracelulares de *N. caninum* y pudieron comprobar que tenían efectos sobre macrofagos, cabe destacar que al igual que en esta tesis las vesículas eran de una fracción total, lo cual lleva a pensar que de alguna forma *N. caninum* podría estar usando la maquinaria de la célula hospedera para enviar vesículas al medio extracelular. En la figura 41, extraída del trabajo de Li et al, 2018, se puede observar la liberación activa de vesículas por parte de *N. caninum*, dentro de la célula hospedera, lo que hace pensar que estas vesículas podrían ser capaces de modificar el ambiente y generar un medio favorable para la infección. En este sentido y dados los resultados posteriores en esta tesis (secciones 4.2.4 y 4.2.5), podemos observar que ambas proteínas desempeñan un rol activo en la invasión de la célula hospedera.

Particularmente, en los ensayos de invasión y proliferación en los que las células Vero fueron preincubadas con las proteínas, se observa que, principalmente la proteína NcSRS2 potencia tanto el ingreso del parásito como su posterior replicación dentro de las células hospederas.

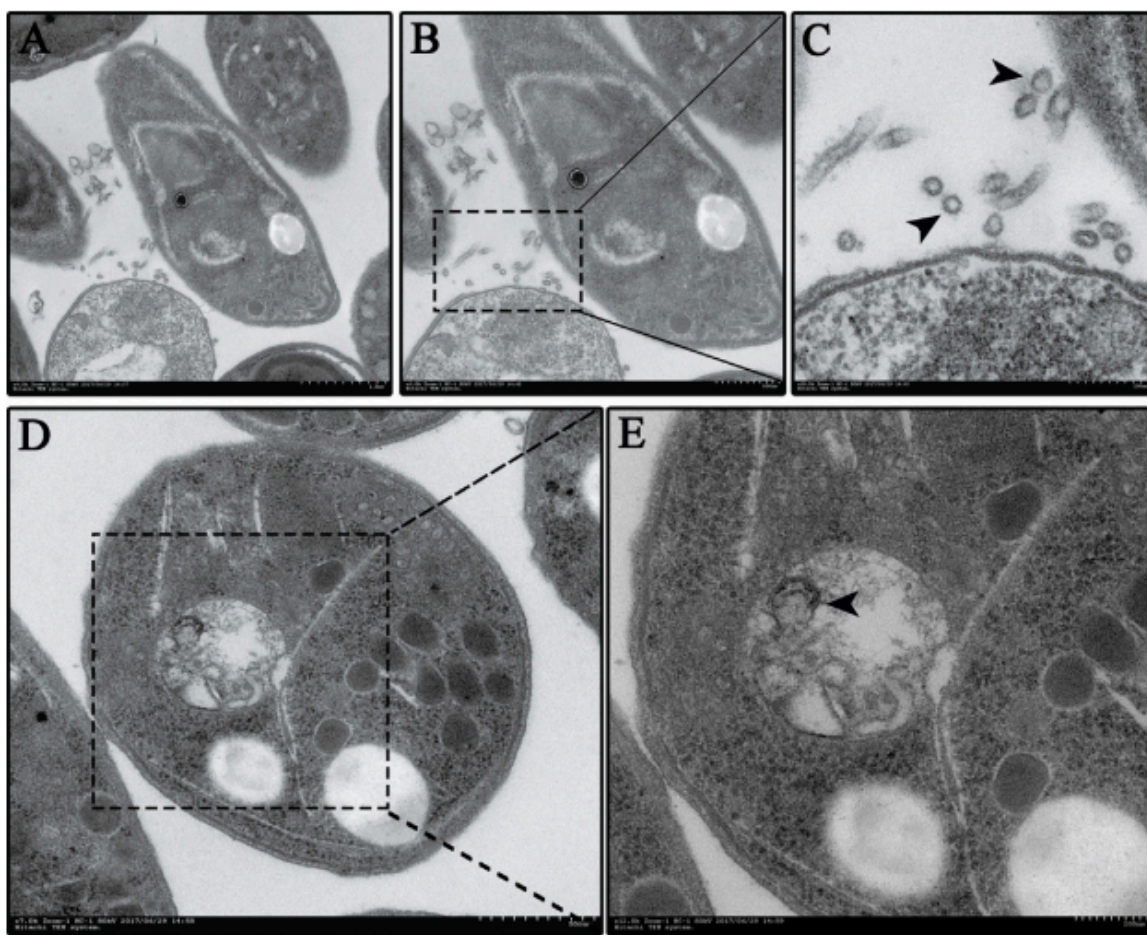


Figura 41. Liberación de vesículas (EVs) de *N. caninum* al medio extracelular. (A–C) Las EVs presentes en la superficie de *N. caninum* fueron observadas mediante TEM. Los paneles (B,C) muestran ampliaciones de la región indicada por el recuadro en el panel (A). (D,E) En el interior de *N. caninum* se observan estructuras similares a cuerpos multivesiculares. El panel (E) muestra ampliaciones de las regiones indicadas por el recuadro en el panel (D). Extraído de Li et al, 2018 (74).

La posible formación de heterodímeros entre esta proteína y otras pertenecientes a la familia SRS sugiere que podrían desempeñar funciones diferenciadas según las combinaciones, o bien generar antígenos distintos. En consideración a lo discutido previamente y al rol modulador del sistema inmune que ha sido atribuido a diversas proteínas SRS, es posible plantear la siguiente interpretación.

Dado que se observó la presencia de NcSAG1 y NcSRS2 tanto en vesículas como en forma soluble en el medio de infección, y que la microscopía evidencia claramente su liberación por parte del parásito, puede proponerse que estas proteínas cumplen un doble rol. Por un lado, podrían favorecer la infección; su empaquetamiento en vesículas permitiría protegerlas de potenciales procesos de proteólisis o de la neutralización por anticuerpos. Por otro lado, su liberación en forma soluble concuerda con su marcada inmunogenicidad y sugiere una función adicional como posible señuelo inmunológico. En este sentido, cuando ambas proteínas se encuentran en la superficie del parásito, cumplirían funciones asociadas al primer contacto con la célula hospedera; mientras que, como ya se mencionó anteriormente, una vez liberadas al medio, podrían actuar disminuyendo la eficacia de una respuesta de anticuerpos neutralizantes y favoreciendo un perfil humoral incapaz de

eliminar a los parásitos intracelulares. Paralelamente, aquellas proteínas que permanecen resguardadas dentro de vesículas podrían alcanzar células vecinas y contribuir tanto a facilitar nuevas infecciones como a promover la proliferación parasitaria.

Si bien aún es necesario profundizar en el estudio de las funciones específicas de estas proteínas, los resultados presentados en esta sección permiten proponer que ambas participan de manera relevante en los procesos de invasión y proliferación del parásito. Queda por dilucidar, sin embargo, los mecanismos precisos mediante los cuales actúan y las interacciones que establecen con otras moléculas.

Durante el proceso de atenuación, logramos obtener parásitos menos infectivos; si bien no podemos asegurar que se trate del estadio bradizoíto, sí es posible observar una disminución en la capacidad de infección. La disminución en la capacidad de infección (figura 36) probablemente se deba a un cambio a nivel del parásito más que a favorecer a una población de estos, debido a que en este experimento generamos condiciones de estrés, que esperamos que activen los procesos de diferenciación de estadio. Si bien se trata tanto en nuestros resultados como en la partida de poblaciones mixtas, dado que no hubo separación intencional de parásitos por ningún marcador, si no que lo que se realiza fue una presión constante, es más probable pensar que se trata de poblaciones de parásito que fueron cambiando su perfil de expresión hacia un estadio más bradizoito-like.

Particularmente la disminución de la infectividad se ve mucho más marcada en la cepa NcURU1 que en la cepa NcLiv, lo cual no es de sorprender, dado que la cepa NcURU1 se trata de una cepa de menor virulencia, lo que hace pensar que probablemente presente una población de parásito con perfil de expresión bradizoito-like, como ya se ha reportado para otras cepas de baja virulencia (38). También es probable que la cepa NcURU1 esté desde el inicio del experimento enriquecida en estas poblaciones de parásitos, menos infectivos, lo que acelera la transición; no ocurre con la cepa NcLiv, la cual está ampliamente adaptada a los sistemas de cultivo y presenta mayor virulencia.

Considerando lo discutido anteriormente con respecto a los cambios en la expresión de los genes Ncsag1 y Ncsrs2, podemos observar cómo disminuye la expresión relativa del gen Ncsrs2 con respecto al gen Ncs28, durante el proceso de estrés (figuras 38A y 39A), principalmente en la cepa NcLiv. Se puede observar una mayor expresión relativa del gen Ncsrs2 en NcLiv que en NcURU1 (figuras 38A y 39A). También es importante tener en cuenta que NcLiv es una cepa ampliamente adaptada al cultivo celular, lo que puede generar cambios a nivel del genoma del parásito (99), cambios que no estarían presentes en NcURU1, ya que se trata de una cepa con un bajo número de pasajes en cultivo.

En suma, considerando todo lo discutido en este trabajo y los resultados obtenidos, puede plantearse que esta familia de proteínas no solo presenta roles redundantes entre sus distintos miembros (36,98), sino que, además, una misma proteína podría cumplir múltiples funciones a lo largo del proceso de infección, contribuyendo así a asegurar la persistencia y la prevalencia del parásito. Lo anterior se ve reforzado por un trabajo previo en el que se generan parásitos *knockout* para TgSAG1 en *T. gondii* (100), donde se observó un claro corrimiento en las proporciones de expresión de distintos miembros de la familia SRS. Esto podría sugerir que las proteínas de esta familia presentan funciones redundantes; si bien el parásito pierde virulencia, es capaz de continuar infectando, lo cual concuerda con lo reportado para cepas menos virulentas. Es decir, hay una compensación en el perfil de expresión de las SRS que hacen del parásito menos virulento. Considerando lo presentado

en este trabajo y si bien nos limitamos solo a dos miembros de esta familia, podemos pensar que la disminución en la expresión de NcSRS2, que se observa en NcURU1 con respecto a NcLiv, puede hacer que la cepa sea menos virulenta, pero probablemente si estudiamos las distintas SRS expresadas en NcURU1 el abanico de las mismas sea mayor en comparación con NcLiv. Por otra parte está la potencial doble función de estas proteínas involucradas tanto en procesos de infección como en inmunomodulación. En el casos de los resultados aquí presentados podríamos sugerir que NcSAG1 estaría interviniendo (como ya ha sido previamente reportado) en el proceso de adhesión a la célula huésped y de señuelo para el sistema inmune (99), mientras que NcSRS2, esté interactuando con las células vecinas a la infección o con las células previo a ser infectada, preparando de alguna forma el ambiente para facilitar la entrada y proliferación del parásito, sin perder su rol de señuelo al sistema inmune. Este panorama se complejiza al considerar que, aunque en menor medida, otras proteínas de esta familia también se encuentran presentes en la superficie del parásito. Algunas de ellas pueden ser liberadas al medio extracelular como consecuencia del clivaje del anclaje GPI mediado por fosfolipasa, mientras que otras permanecerían asociadas a la membrana debido a la presencia de regiones transmembrana o dominios de anclaje. Estas distintas modalidades de asociación con la superficie parasitaria sugieren funciones diferenciadas, probablemente vinculadas a procesos de adhesión y al ingreso del parásito en la célula hospedadora, tal como se resume en el modelo esquemático propuesto en la Figura 42.

En conjunto, estos elementos permiten plantear que esta familia de proteínas no solo habría evolucionado y se habría diversificado en *N. caninum* para facilitar la infección de un amplio espectro de hospederos, sino también para optimizar la persistencia y permanencia del parásito a lo largo de su ciclo biológico.

A

Diagram A illustrates the cell membrane and associated proteins. The membrane is shown as a lipid bilayer. Various proteins are depicted, including a purple protein on the left, a blue protein with a yellow tag, a red protein with a yellow tag, a blue protein with a yellow tag, and a yellow protein with a yellow tag. An inset shows a circular view of the membrane. Labels include 'Espacio extracelular', 'Membrana celular', and 'Espacio Intracelular'.

B

Diagram illustrating the structure of a cell membrane and associated proteins. The membrane is shown as a phospholipid bilayer. Various proteins are embedded or attached to the membrane, including a purple protein on the left, a red protein in the center, and a yellow protein on the right. A blue Y-shaped protein is shown above the membrane. A vesicle containing a blue Y-shaped protein is shown on the right. Labels indicate the extracellular space (Espacio extracelular), the cell membrane (Membrana celular), and the intracellular space (Espacio intracelular).

Figura 42. Modelo esquemático de la organización y la dinámica de las proteínas de la familia SRS en la superficie de *N. caninum*. (A) Representación de proteínas SRS asociadas a la membrana del parásito mediante anclaje GPI, así como de proteínas que permanecen unidas a la superficie por dominios transmembrana o por regiones de anclaje. (B) Liberación de proteínas SRS al medio extracelular como consecuencia del clivaje del anclaje GPI mediado por una actividad fosfolipasa y su potencial reconocimiento por anticuerpos del hospedador. El esquema resume los distintos modos de asociación de estas proteínas con la superficie parasitaria y sus posibles roles en los procesos de adhesión, invasión celular e interacción con el sistema inmune del hospedador.

6. Conclusiones y perspectivas

En esta tesis logramos producir de forma recombinante y soluble las proteínas NcSAG1 y NcSRS2.

Realizamos el primer árbol basado en estructuras para esta familia de proteínas, que podría ayudar en estudios posteriores a encontrar una relación funcional entre los integrantes de la familia de proteínas SRS.

Comprobamos que NcSRS2 está involucrada y favorece la infección y la proliferación del parásito en la célula hospedera.

Observamos que ambas proteínas se encuentran tanto solubles en el medio de cultivo como asociadas a vesículas, lo que podría estar implicado en su función biológica.

Este trabajo generó las herramientas para continuar estudiando el rol de las SRS en el parásito, como por ejemplo la búsqueda de los interactores y como están regulando a la célula hospedera para favorecer la infección y proliferación de los parásitos.

Se plantea en futuros trabajos continuar con la caracterización estructural y funcional de estas proteínas, tanto en el estadio de taquizoíto como en el de bradizoíto.

7. Aportes en otros trabajos

Las proteínas producidas en este trabajo se utilizaron en el desarrollo de un test de ELISA desarrollado por nuestro laboratorio que formó parte del trabajo de tesis de maestría de Florencia Ruppel y de la tesis de grado de Tatiana Hundewat.

El desarrollo del test de ELISA se enmarcó en dos proyectos, el FSSA_1_2019_1_160691, en el cual tuvo lugar el desarrollo del test y FPTA 488, en el que se está realizando la validación del mismo.

Paralelamente, estas proteínas también se están utilizando en el desarrollo de potenciales vacunas para la prevención de la neosporosis en bovinos, trabajo en vías de publicación.

Referencias bibliográficas

1. Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LFP, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion dollar question. *Int J Parasitol.* febrero de 2013;43(2):133-42.
2. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2007;20(2):323-67.
3. Guamán Ramírez MA. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos en el cantón Guamate. 2022 [citado 23 de julio de 2025]; Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/9822>
4. Ojeda-Carrasco JJ, Espinosa-Ayala E, Hernández-García PA, Rojas-Martínez C, Álvarez-Martínez JA, Ojeda-Carrasco JJ, et al. Seroprevalencia de enfermedades que afectan la reproducción de bovinos para leche con énfasis en neosporosis. *Ecosistemas Recur Agropecu.* agosto de 2016;3(8):243-9.
5. Puray Ch. N, Chávez V. A, Casas A. E, Falcón P N, Casas V. G. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Rev Investig Vet Perú.* julio de 2006;17(2):189-94.
6. Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet Rec.* 22 de agosto de 1998;143(8):228-9.
7. Gondim LF, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet Parasitol.* 15 de septiembre de 1999;86(1):71-5.
8. Ribeiro CM, Soares IR, Mendes RG, de Santis Bastos PA, Katagiri S, Zavilenski RB, et al. Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. *Trop Anim Health Prod.* septiembre de 2019;51(7):1783-800.
9. Bañales P, Easton C, Haritani M, Kashiwazaki Y, Paullier C, Pizzorno M. Aborto bovino por *Neospora caninum* en el Uruguay: primeros diagnósticos. *Vet Montev.* 1 de julio de 1998;34(139-140):28-32.
10. Piaggio DJ, Delucchi DL, Bañales DP, Easton DC. ACTUALIZACIÓN EN NEOSPOROSIS.
11. da Silva Silveira C, Armendano JI, Moore DP, Cantón GJ, Macías-Rioseco M, Riet-Correa F, et al. Comparación de ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos en la investigación diagnóstica del aborto asociado a *Neospora caninum* en rodeos lecheros de Uruguay. *Rev Argent Microbiol.* 1 de abril de 2020;52(2):107-14.
12. Carrillo Parraguez M, Ponssa E, Caffarena D, Artagaveytia J, Sotelo F, Fariña S, et al. Estimation of direct economic and productive losses due to abortions caused by *Neospora caninum* in the primary dairy sector of Uruguay. *Front Vet Sci.* 26 de marzo de 2025;12:1502742.
13. Macchi MV. Estudio epidemiológico de la neosporosis bovina del rodeo lechero en el Uruguay. 2019;
14. Cabrera A, Fresia P, Berná L, Silveira C, Macías-Rioseco M, Arevalo AP, et al. Isolation and molecular characterization of four novel *Neospora caninum* strains. *Parasitol*

Res. diciembre de 2019;118(12):3535-42.

15. Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd Berl Ger.* 1984;70(2):271-4.
16. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1 de mayo de 1988;192(9):1269-85.
17. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* diciembre de 1996;67(1-2):1-59.
18. Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, et al. Detection of Serum Antibody Responses in Cattle with Natural or Experimental *Neospora* Infections. *J Vet Diagn Invest.* 1 de octubre de 1993;5(4):572-8.
19. Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, et al. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. 1 de marzo de 1996 [citado 23 de julio de 2025]; Disponible en: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/57/3/ajvr.1996.57.03.329.xml>
20. Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, et al. A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimization, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* julio de 1998;5(4):467-73.
21. Hemphill A, Gottstein B. *Neospora caninum* and neosporosis - Recent achievements in host and parasite cell biology and treatment. *Acta Parasitol.* 1 de marzo de 2006;51:15-25.
22. Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology.* septiembre de 2006;133(Pt 3):261-78.
23. Horcajo P, Regidor-Cerrillo J, Aguado-Martínez A, Hemphill A, Ortega-Mora LM. Vaccines for bovine neosporosis: current status and key aspects for development. *Parasite Immunol.* diciembre de 2016;38(12):709-23.
24. Fereig RM, Abdelbaky HH, Nishikawa Y. Vaccination with *Neospora* GRA6 Interrupts the Vertical Transmission and Partially Protects Dams and Offspring against *Neospora caninum* Infection in Mice. *Vaccines.* febrero de 2021;9(2):155.
25. Imhof D, Pownall WR, Schlange C, Monney C, Ortega-Mora LM, Ojo KK, et al. Vaccine-Linked Chemotherapy Approach: Additive Effects of Combining the *Listeria monocytogenes*-Based Vaccine Lm3Dx_NcSAG1 With the Bumped Kinase Inhibitor BKL-1748 Against *Neospora caninum* Infection in Mice. *Front Vet Sci* [Internet]. 27 de junio de 2022 [citado 23 de julio de 2025];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2022.901056/full>
26. Imhof D, Pownall W, Hänggeli KPA, Monney C, Román LRS, Ortega-Mora LM, et al. Immunization with a Multivalent *Listeria monocytogenes* Vaccine Leads to a Strong Reduction in Vertical Transmission and Cerebral Parasite Burden in Pregnant and Non-Pregnant Mice Infected with *Neospora caninum*. *Vaccines.* enero de 2023;11(1):156.
27. Yu G, Liang W, Yang Q, Wang J, Wang Y, Zhang T, et al. Immune Protective

- Evaluation Elicited by DNA Vaccination With *Neospora caninum* Dense Granules Proteins in Mice. *Front Vet Sci* [Internet]. 26 de febrero de 2021 [citado 23 de julio de 2025];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2021.638067/full>
28. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals—The last five years. *Vet Parasitol.* 4 de agosto de 2011;180(1):90-108.
 29. Peters M, Lütkefels E, Heckerroth AR, Schares G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol.* agosto de 2001;31(10):1144-8.
 30. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* septiembre de 1998;28(9):1473-8.
 31. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* enero de 2013;13:133-50.
 32. Berná L, Marquez P, Cabrera A, Greif G, Francia ME, Robello C. Reevaluation of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. *Genome Res.* mayo de 2021;31(5):823-33.
 33. Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Könen-Waisman S, et al. Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: *Coccidia* Differing in Host Range and Transmission Strategy. *PLoS Pathog.* 22 de marzo de 2012;8(3):e1002567.
 34. Wasmuth JD, Pszenny V, Haile S, Jansen EM, Gast AT, Sher A, et al. Integrated Bioinformatic and Targeted Deletion Analyses of the SRS Gene Superfamily Identify SRS29C as a Negative Regulator of *Toxoplasma* Virulence. Weiss LM, editor. *mBio* [Internet]. 31 de diciembre de 2012 [citado 23 de julio de 2025];3(6). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00321-12>
 35. Horcajo P, Xia D, Randle N, Collantes-Fernández E, Wastling J, Ortega-Mora LM, et al. Integrative transcriptome and proteome analyses define marked differences between *Neospora caninum* isolates throughout the tachyzoite lytic cycle. *J Proteomics.* mayo de 2018;180:108-19.
 36. Jung C, Lee CYF, Grigg ME. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int J Parasitol.* marzo de 2004;34(3):285-96.
 37. Kim SK, Karasov A, Boothroyd JC. Bradyzoite-Specific Surface Antigen SRS9 Plays a Role in Maintaining *Toxoplasma gondii* Persistence in the Brain and in Host Control of Parasite Replication in the Intestine. *Infect Immun.* abril de 2007;75(4):1626-34.
 38. Rico-San Román L, Horcajo P, Regidor-Cerrillo J, Fernández-Escobar M, Collantes-Fernández E, Gutiérrez-Blázquez D, et al. Comparative tachyzoite proteome analyses among six *Neospora caninum* isolates with different virulence. *Int J Parasitol.* mayo de 2020;50(5):377-88.
 39. Cho JH, Chung WS, Song KJ, Na BK, Kang SW, Song CY, et al. Protective efficacy

- of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. *Korean J Parasitol.* marzo de 2005;43(1):19-25.
40. Carruthers VB, Håkansson S, Giddings OK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Uses Sulfated Proteoglycans for Substrate and Host Cell Attachment. *Infect Immun.* julio de 2000;68(7):4005-11.
 41. Frénal K, Polonais V, Marq JB, Stratmann R, Limenitakis J, Soldati-Favre D. Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. *Cell Host Microbe.* 21 de octubre de 2010;8(4):343-57.
 42. Portes J, Barrias E, Travassos R, Attias M, de Souza W. *Toxoplasma gondii* Mechanisms of Entry Into Host Cells. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 30 de junio de 2020 [citado 10 de agosto de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.00294/full>
 43. Mercier C, Adjogble KDZ, Däubener W, Delauw MFC. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol.* julio de 2005;35(8):829-49.
 44. Bezerra MA, Pereira LM, Baroni L, Yatsuda AP. The soluble fraction of *Neospora caninum* treated with PI-PLC is dominated by NcSRS29B and NcSRS29C. *Exp Parasitol.* septiembre de 2019;204:107731.
 45. Wang P, Wang X, Wang W, Gong P, Zhang N, Zhang R, et al. Evaluation of Protective Immune Responses Induced in BALB/c Mice and Goats by the *Neospora caninum* Surface SRS Proteins and Interleukin-18. *Animals.* enero de 2022;12(21):2952.
 46. Couvreur G, Sadak A, Fortier B, Dubremetz JF. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* agosto de 1988;97 (Pt 1):1-10.
 47. Hemphill A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect Immun.* octubre de 1996;64(10):4279-87.
 48. Howe DK, Crawford AC, Lindsay D, Sibley LD. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* noviembre de 1998;66(11):5322-8.
 49. Sibley LD, Pfefferkorn ER, Boothroyd JC. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today Pers Ed.* diciembre de 1991;7(12):327-8.
 50. Manger ID, Hehl AB, Boothroyd JC. The Surface of *Toxoplasma* Tachyzoites Is Dominated by a Family of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Antigens Related to SAG1. *Infect Immun.* mayo de 1998;66(5):2237-44.
 51. Tomavo S. The Major Surface Proteins of *Toxoplasma gondii*: Structures and Functions. En: Gross U, editor. *Toxoplasma gondii* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996 [citado 10 de agosto de 2025]. p. 45-54. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-51014-4_4
 52. Lekutis C, Ferguson D, Grigg M, Camps M, Boothroyd J. Surface antigens of

Toxoplasma gondii: Variations on a theme. Int J Parasitol. 1 de noviembre de 2001;31:1285-92.

53. García-Sánchez M, Jiménez-Pelayo L, Horcajo P, Regidor-Cerrillo J, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. Gene Expression Profiling of Neospora caninum in Bovine Macrophages Reveals Differences Between Isolates Associated With Key Parasite Functions. Front Cell Infect Microbiol. 15 de octubre de 2019;9:354.
54. Crawford J, Grujic O, Bruic E, Czjzek M, Grigg ME, Boulanger MJ. Structural Characterization of the Bradyzoite Surface Antigen (BSR4) from Toxoplasma gondii, a Unique Addition to the Surface Antigen Glycoprotein 1-related Superfamily *. J Biol Chem. 3 de abril de 2009;284(14):9192-8.
55. Crawford J, Lamb E, Wasmuth J, Grujic O, Grigg ME, Boulanger MJ. Structural and Functional Characterization of SporoSAG: A SAG2-RELATED SURFACE ANTIGEN FROM TOXOPLASMA GONDII*. J Biol Chem. 16 de abril de 2010;285(16):12063-70.
56. He X lin, Grigg ME, Boothroyd JC, Garcia KC. Structure of the immunodominant surface antigen from the Toxoplasma gondii SRS superfamily. Nat Struct Biol. agosto de 2002;9(8):606-11.
57. Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hemphill A. Differential Expression of Cell Surface- and Dense Granule-Associated Neospora caninum Proteins in Tachyzoites and Bradyzoites. J Parasitol. agosto de 1998;84(4):753.
58. Nishikawa Y, Kousaka Y, Fukumoto S, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, et al. Delivery of Neospora caninum surface protein, NcSRS2 (Nc-p43), to mouse using recombinant vaccinia virus. Parasitol Res. noviembre de 2000;86(11):934-9.
59. Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, Igarashi I, Fujisaki K, Otsuka H, et al. Monoclonal antibody inhibition of Neospora caninum tachyzoite invasion into host cells. Int J Parasitol. enero de 2000;30(1):51-8.
60. Sonda S, Fuchs N, Connolly B, Fernandez P, Gottstein B, Hemphill A. The major 36 kDa Neospora caninum tachyzoite surface protein is closely related to the major Toxoplasma gondii surface antigen.
61. Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hentrich B. Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on Neospora caninum tachyzoites. Parasitology. octubre de 1997;115(4):371-80.
62. Abdelbaky HH, Rahman MdM, Shimoda N, Chen Y, Hasan T, Ushio N, et al. Neospora caninum surface antigen 1 is a major determinant of the pathogenesis of neosporosis in nonpregnant and pregnant mice. Front Microbiol. 8 de enero de 2024;14:1334447.
63. Bengoa-Luoni SA, Corigliano MG, Sánchez-López E, Albarracín RM, Legarralde A, Ganuza A, et al. The potential of a DIVA-like recombinant vaccine composed by rNcSAG1 and rAtHsp81.2 against vertical transmission in a mouse model of congenital neosporosis. Acta Trop. octubre de 2019;198:105094.
64. Hemphill A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major Neospora caninum tachyzoite surface protein. Infect Immun. octubre de 1996;64(10):4279-87.

65. Haldorson GJ, Stanton JB, Mathison BA, Suarez CE, Baszler TV. Neospora caninum: antibodies directed against tachyzoite surface protein NcSRS2 inhibit parasite attachment and invasion of placental trophoblasts in vitro. *Exp Parasitol.* marzo de 2006;112(3):172-8.
66. Ahn HJ, Kim S, Kim DY, Nam HW. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of Neospora caninum in bovine sera. *Korean J Parasitol.* septiembre de 2003;41(3):175-7.
67. Cannas A, Naguleswaran A, Müller N, Eperon S, Gottstein B, Hemphill A. Vaccination of mice against experimental Neospora caninum infection using NcSAG1- and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology.* abril de 2003;126(Pt 4):303-12.
68. Haldorson GJ, Mathison BA, Wenberg K, Conrad PA, Dubey JP, Trees AJ, et al. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital Neospora caninum transmission in mice. *Int J Parasitol.* noviembre de 2005;35(13):1407-15.
69. Lei Y, Davey M, Ellis J. Autofluorescence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum cysts in vitro. *J Parasitol.* febrero de 2005;91(1):17-23.
70. Tunev SS, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Weiss LM. Neospora caninum in vitro: evidence that the destiny of a parasitophorous vacuole depends on the phenotype of the progenitor zoite. *J Parasitol.* diciembre de 2002;88(6):1095-9.
71. Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol.* abril de 1972;27(2):353-65.
72. Carrión F, Rammauro F, Olivero-Deibe N, Fló M, Portela MM, Lima A, et al. Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in Drosophila S2 cells show functions evoking virus–cell interface. *Protein Sci.* 2023;32(8):e4721.
73. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis | Nature Methods [Internet]. [citado 26 de septiembre de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2089>
74. Li S, Gong P, Tai L, Li X, Wang X, Zhao C, et al. Extracellular Vesicles Secreted by Neospora caninum Are Recognized by Toll-Like Receptor 2 and Modulate Host Cell Innate Immunity Through the MAPK Signaling Pathway. *Front Immunol* [Internet]. 24 de julio de 2018 [citado 8 de diciembre de 2025];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01633/full>
75. Atayde VD, Aslan H, Townsend S, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M. Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan Leishmania within the Sand Fly Midgut. *Cell Rep.* 3 de noviembre de 2015;13(5):957-67.
76. Huang Y, Wang S, Cai Q, Jin H. Effective methods for isolation and purification of extracellular vesicles from plants. *J Integr Plant Biol.* diciembre de 2021;63(12):2020-30.
77. Micsonai A, Moussong É, Wien F, Boros E, Vadász H, Murvai N, et al. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 5 de julio de 2022;50(W1):W90-8.
78. Rossello J, Lima A, Gil M, Rodríguez Duarte J, Correa A, Carvalho PC, et al. The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in

- Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism. *Sci Rep.* 31 de agosto de 2017;7(1):10281.
79. Dos Santos Pacheco N, Soldati-Favre D. Coupling Auxin-Inducible Degron System with Ultrastructure Expansion Microscopy to Accelerate the Discovery of Gene Function in *Toxoplasma gondii*. En: de Pablos LM, Sotillo J, editores. *Parasite Genomics: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [citado 19 de agosto de 2025]. p. 121-37. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9_8
 80. ALLEN CELL EXPLORER [Internet]. [citado 19 de agosto de 2025]. AGAVE 3D pathtrace image viewer. Disponible en: <https://www.allencell.org/pathtrace-rendering.html>
 81. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. agosto de 2021;596(7873):583-9.
 82. Bittrich S, Segura J, Duarte JM, Burley SK, Rose Y. RCSB protein Data Bank: exploring protein 3D similarities via comprehensive structural alignments. *Bioinformatics*. 3 de junio de 2024;40(6):btac370.
 83. Holm L. DALI and the persistence of protein shape. *Protein Sci.* 2020;29(1):128-40.
 84. Holm L, Laiho A, Törönen P, Salgado M. DALI shines a light on remote homologs: One hundred discoveries. *Protein Sci.* 2023;32(1):e4519.
 85. Talavera G, Castresana J. Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Syst Biol.* 1 de agosto de 2007;56(4):564-77.
 86. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 1 de julio de 2021;38(7):3022-7.
 87. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1 de febrero de 1996;14(1):33-8.
 88. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* julio de 2012;9(7):676-82.
 89. Tomé-Poderti L, Olivero-Deibe N, Carrión F, Portela MM, Obal G, Cabrera G, et al. Characterization and application of recombinant Bovine Leukemia Virus Env protein. *Sci Rep.* 28 de mayo de 2024;14(1):12190.
 90. Crawford J, Lamb E, Wasmuth J, Grujic O, Grigg ME, Boulanger MJ. Structural and Functional Characterization of SporoSAG. *J Biol Chem.* abril de 2010;285(16):12063-70.
 91. Son ES, Ahn HJ, Kim JH, Kim DY, Nam HW. Determination of antigenic domain in GST fused major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum*. *Korean J Parasitol.* septiembre de 2001;39(3):241-6.
 92. Pszenny V, Sikorski PM, Ramaswamy R, Parker ML, Adedoyin G, Boulanger MJ, et al. *Toxoplasma* surface coat protein TgSRS57 (TgSAG3) regulates complement deposition, Factor H recruitment, and promotes parasite persistence [Internet]. *Microbiology*; 2022 [citado 26 de mayo de 2025]. Disponible en: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.10.17.512461>

93. Pownall WR, Imhof D, Trigo NF, Ganai-Vonarburg SC, Plattet P, Monney C, et al. Safety of a Novel *Listeria monocytogenes*-Based Vaccine Vector Expressing NcSAG1 (*Neospora caninum* Surface Antigen 1). *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 25 de agosto de 2021 [citado 23 de julio de 2025];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.675219/full>
94. Mendoza-Morales LF, Fiorani F, Morán KD, Hecker YP, Cirone KM, Sánchez-López EF, et al. Immunogenicity, safety and dual DIVA-like character of a recombinant candidate vaccine against neosporosis in cattle. *Acta Trop*. septiembre de 2024;257:107293.
95. Mendoza-Morales LF, Fiorani F, Morán KD, Hecker YP, Cirone KM, Sánchez-López EF, et al. Immunogenicity, safety and dual DIVA-like character of a recombinant candidate vaccine against neosporosis in cattle. *Acta Trop*. 1 de septiembre de 2024;257:107293.
96. Hemphill A, Debache K, Monney T, Schorer M, Guionaud C, Alaeddine F, et al. Proteins mediating the *Neospora caninum*-host cell interaction as targets for vaccination. *Front Biosci Elite Ed*. 1 de enero de 2013;5(1):23-36.
97. Britez JD, Rodriguez AE, Di Ciaccio L, Marugán-Hernandez V, Tomazic ML. What Do We Know about Surface Proteins of Chicken Parasites *Eimeria*? *Life*. 31 de mayo de 2023;13(6):1295.
98. Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol*. 1 de enero de 1998;28(1):3-9.
99. Gohar Y, Neumann M, Hülse L, Wind D, Mock J, Buchholz K, et al. Intra-strain genetic heterogeneity in *Toxoplasma gondii* ME49: Oxford Nanopore long-read sequencing reveals copy number variation in the ROP8-ROP2A locus. *BMC Genomics* [Internet]. 3 de diciembre de 2025 [citado 5 de diciembre de 2025]; Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12864-025-12372-5>
100. Hänggeli KPA, Hemphill A, Müller N, Heller M, Uldry AC, Braga-Lagache S, et al. Comparative Proteomic Analysis of *Toxoplasma gondii* RH Wild-Type and Four SRS29B (SAG1) Knock-Out Clones Reveals Significant Differences between Individual Strains. *Int J Mol Sci*. 21 de junio de 2023;24(13):10454.

Apéndice I: Cebadores utilizados para la realización de la qPCR

En este apéndice se presenta la tabla 4 en la que se enlista la secuencia, nombre y temperatura de melting teórica de los cebadores diseñados para la utilización en el desarrollo de la qPCR.

Tabla 4. Datos de los cebadores utilizados en la realización de la qPCR

Nombre	Secuencia	Largo (pb)	Inicio	Fin	Tm (°C)	%GC	Largo del producto (pb)	Unión a exon
Nc28S_R	CCGTGTTTCAAGACGGGTC	19			56.2	57.9		NO
Nc28S_F	TCTCTCTCACCAGGTTTAGG	20			53.1	50		
Ncsrs2Rv	ACGAAGGCAACTCGTCACAT	20	987	1006	56.9	50	167	NO
Ncsrs2Fw	CGACGGGGAACAGGTAAACA	20	1153	1134	57.2	55		
Ncsag1Rv	ACCGTAAGAGCACATTGCGA	20	398	417	56.9	50	131	NO
Ncsag1Fw	TCCCCACAACATCCAAGTCG	20	528	509	57.3	55		

Apéndice II: Lista de ID de las secuencias pertenecientes a proteínas de la familia SRS

En este apéndice se enlistan los nombre de identificación de las secuencias de aminoácidos identificadas como pertenecientes a la familia de proteínas SRS. Estos números fueron obtenidos de la página ToxoDb, mediante blast por homología como se describe previamente en materiales y métodos.

Tabla 5. Lista de números de identificación de las secuencias utilizadas para el modelado en AlphaFold de las proteínas SRS.

Numero de identificacion en ToxoDb		
Ncaninum_LIV_000748800	Ncaninum_LIV_000533300	Ncaninum_LIV_000461100
Ncaninum_LIV_000511100	Ncaninum_LIV_000678800	Ncaninum_LIV_000106800
Ncaninum_LIV_000304800	Ncaninum_LIV_000238700	Ncaninum_LIV_000737400
Ncaninum_LIV_000111700	Ncaninum_LIV_000460200	Ncaninum_LIV_000677500
Ncaninum_LIV_000510600	Ncaninum_LIV_000362400	Ncaninum_LIV_000510900
Ncaninum_LIV_000462200	Ncaninum_LIV_000049400	Ncaninum_LIV_000706000
Ncaninum_LIV_000771900	Ncaninum_LIV_000642400	Ncaninum_LIV_000361900
Ncaninum_LIV_000642500	Ncaninum_LIV_000509400	Ncaninum_LIV_000461700
Ncaninum_LIV_000048300	Ncaninum_LIV_000511300	Ncaninum_LIV_000510100
Ncaninum_LIV_000182300	Ncaninum_LIV_000737300	Ncaninum_LIV_000362700
Ncaninum_LIV_000318000	Ncaninum_LIV_000509700	Ncaninum_LIV_000685500
Ncaninum_LIV_000044300	Ncaninum_LIV_000495600	Ncaninum_LIV_000491600
Ncaninum_LIV_000182100	Ncaninum_LIV_000461300	Ncaninum_LIV_000528500
Ncaninum_LIV_000488200	Ncaninum_LIV_000677300	Ncaninum_LIV_000317900
Ncaninum_LIV_000181800	Ncaninum_LIV_000528600	Ncaninum_LIV_000040100
Ncaninum_LIV_000677000	Ncaninum_LIV_000330800	Ncaninum_LIV_000462600
Ncaninum_LIV_000509600	Ncaninum_LIV_000182200	Ncaninum_LIV_000461800
Ncaninum_LIV_000182600	Ncaninum_LIV_000510200	Ncaninum_LIV_000104000
Ncaninum_LIV_000106700	Ncaninum_LIV_000491500	Ncaninum_LIV_000735700
Ncaninum_LIV_000362100	Ncaninum_LIV_000720000	Ncaninum_LIV_000362300
Ncaninum_LIV_000362800	Ncaninum_LIV_000513900	Ncaninum_LIV_000463400
Ncaninum_LIV_000048000	Ncaninum_LIV_000048800	Ncaninum_LIV_000705400
Ncaninum_LIV_000361300	Ncaninum_LIV_000362600	Ncaninum_LIV_000676700
Ncaninum_LIV_000737200	Ncaninum_LIV_000182900	Ncaninum_LIV_000461600
Ncaninum_LIV_000363300	Ncaninum_LIV_000509800	Ncaninum_LIV_000488100
Ncaninum_LIV_000238900	Ncaninum_LIV_000048200	Ncaninum_LIV_000676600
Ncaninum_LIV_000049000	Ncaninum_LIV_000685800	Ncaninum_LIV_000462400
Ncaninum_LIV_000621700	Ncaninum_LIV_000462700	Ncaninum_LIV_000511200
Ncaninum_LIV_000318100	Ncaninum_LIV_000705500	Ncaninum_LIV_000047800
Ncaninum_LIV_000736600	Ncaninum_LIV_000361400	Ncaninum_LIV_000238000
Ncaninum_LIV_000692700	Ncaninum_LIV_000037700	Ncaninum_LIV_000774100
Ncaninum_LIV_000362200	Ncaninum_LIV_000488500	Ncaninum_LIV_000705600

Ncaninum_LIV_000677400	Ncaninum_LIV_000044600	Ncaninum_LIV_000533400
Ncaninum_LIV_000510400	Ncaninum_LIV_000460100	Ncaninum_LIV_000511400
Ncaninum_LIV_000460500	Ncaninum_LIV_000462100	Ncaninum_LIV_000182800
Ncaninum_LIV_000462300	Ncaninum_LIV_000514000	Ncaninum_LIV_000047500
Ncaninum_LIV_000677700	Ncaninum_LIV_000044200	Ncaninum_LIV_000462500
Ncaninum_LIV_000737500	Ncaninum_LIV_000528700	Ncaninum_LIV_000363400
Ncaninum_LIV_000677100	Ncaninum_LIV_000200000	Ncaninum_LIV_000134000
Ncaninum_LIV_000705900	Ncaninum_LIV_000033600	Ncaninum_LIV_000735600
Ncaninum_LIV_000458100	Ncaninum_LIV_000642600	Ncaninum_LIV_000676900
Ncaninum_LIV_000461500	Ncaninum_LIV_000363500	Ncaninum_LIV_000393100
Ncaninum_LIV_000495900	Ncaninum_LIV_000238600	Ncaninum_LIV_000495800
Ncaninum_LIV_000106900	Ncaninum_LIV_000182700	Ncaninum_LIV_000238500
Ncaninum_LIV_000044500	Ncaninum_LIV_000411800	Ncaninum_LIV_000488400
Ncaninum_LIV_000430100	Ncaninum_LIV_000736500	Ncaninum_LIV_000362500
Ncaninum_LIV_000528800	Ncaninum_LIV_000678300	Ncaninum_LIV_000238100
Ncaninum_LIV_000677600	Ncaninum_LIV_000049200	Ncaninum_LIV_000571600
Ncaninum_LIV_000361800	Ncaninum_LIV_000735400	Ncaninum_LIV_000133500
Ncaninum_LIV_000495500	Ncaninum_LIV_000363100	Ncaninum_LIV_000361700
Ncaninum_LIV_000363200	Ncaninum_LIV_000238800	Ncaninum_LIV_000460300
Ncaninum_LIV_000736000	Ncaninum_LIV_000416100	Ncaninum_LIV_000461200
Ncaninum_LIV_000454900	Ncaninum_LIV_000183200	Ncaninum_LIV_000678600
Ncaninum_LIV_000049300	Ncaninum_LIV_000318300	Ncaninum_LIV_000510700
Ncaninum_LIV_000047600	Ncaninum_LIV_000642900	Ncaninum_LIV_000488300
Ncaninum_LIV_000264200	Ncaninum_LIV_000510000	Ncaninum_LIV_000047900
Ncaninum_LIV_000678500	Ncaninum_LIV_000182500	Ncaninum_LIV_000362900
Ncaninum_LIV_000048900	Ncaninum_LIV_000061600	Ncaninum_LIV_000736200
Ncaninum_LIV_000491400	Ncaninum_LIV_000181900	Ncaninum_LIV_000735500
Ncaninum_LIV_000107000	Ncaninum_LIV_000182000	Ncaninum_LIV_000736400
Ncaninum_LIV_000736800	Ncaninum_LIV_000642700	Ncaninum_LIV_000737600
Ncaninum_LIV_000183000	Ncaninum_LIV_000678400	Ncaninum_LIV_000033500
Ncaninum_LIV_000475400	Ncaninum_LIV_000318200	Ncaninum_LIV_000706100
Ncaninum_LIV_000737100	Ncaninum_LIV_000461900	Ncaninum_LIV_000048100
Ncaninum_LIV_000735900	Ncaninum_LIV_000049100	Ncaninum_LIV_000459000
Ncaninum_LIV_000496100	Ncaninum_LIV_000182400	Ncaninum_LIV_000511000
Ncaninum_LIV_000528900	Ncaninum_LIV_000685600	Ncaninum_LIV_000509900
Ncaninum_LIV_000331200	Ncaninum_LIV_000642800	Ncaninum_LIV_000318400
Ncaninum_LIV_000462000	Ncaninum_LIV_000047700	Ncaninum_LIV_000735800
Ncaninum_LIV_000643000	Ncaninum_LIV_000676800	Ncaninum_LIV_000736100
Ncaninum_LIV_000061800	Ncaninum_LIV_000460400	Ncaninum_LIV_000510800
Ncaninum_LIV_000496000	Ncaninum_LIV_000509500	Ncaninum_LIV_000705800
Ncaninum_LIV_000238400	Ncaninum_LIV_000363000	Ncaninum_LIV_000361500

Apéndice III: Datos estadísticos

En este apéndice se resumen las tablas con los diferentes análisis estadísticos llevados a cabo durante este trabajo.

Tabla 6. Resumen de datos estadísticos del estudio de seroneutralización que se representa en la figura 33.

Tabla de Análisis de seroneutralización								
Two-way ANOVA					Ordinary			
Alpha					0,05			
Source of Variation	% of total variation			P value	P value summary		Significante	
Row Factor	0,08091			0,9891	ns		No	
Column Factor	62,96			0,0469	*		Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)			P value	
Row Factor	0,03391	2	0,01696	F (2, 10) = 0,01095			P=0,9891	
Column Factor	26,38	5	5,277	F (5, 10) = 3,406			P=0,0469	
Residual	15,49	10	1,549					
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significante	Summary		Adjusted P Value	
Control vs. anti-NcSAG1 + anti-NcSRS2	1,042	-1,997 to 4,081		No	ns		0,7595	
Control vs. anti-NcSAG11/200	-0,4177	-3,457 to 2,621		No	ns		0,9914	
Control vs. anti-NcSAG11/1000	-2,634	-5,673 to 0,4049		No	ns		0,0949	
Control vs. anti-NcSRS21/500	0,7207	-2,318 to 3,760		No	ns		0,9225	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
Control vs. anti-NcSAG1 + anti-NcSRS2	2,329	1,287	1,042	1,016	3	3	1,025	10
Control vs. anti-NcSAG1 1/200	2,329	2,747	-0,4177	1,016	3	3	0,411	10
Control vs. anti-NcSAG1 1/1000	2,329	4,963	-2,634	1,016	3	3	2,592	10
Control vs. anti-NcSRS2 1/500	2,329	1,609	0,7207	1,016	3	3	0,7091	10
Control vs. anti-NcSRS2 1/1000	2,329	1,886	0,4433	1,016	3	3	0,4362	10

Tabla 7. Resumen de los datos estadísticos de los resultados del efecto de las proteínas en la infección para la tinción con Giemsa de la figura 34.

Tabla de Análisis de placa de lisis											
Two-way ANOVA						Ordinary					
Alpha						0,05					
Source of Variation	% of total variation			P value	P value summary			Significante			
Row Factor	2,985			0,5884	ns			No			
Column Factor	75,97			0,0092	**			Yes			
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)		P value					
Row Factor	4,503	2	2,251	F (2, 8) = 0,5672		P=0,5884					
Column Factor	114,6	4	28,65	F (4, 8) = 7,219		P=0,0092					
Residual	31,75	8	3,969								
Dunnett's multiple comparisons test		Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significante	Summary		Adjusted P Value			
Control vs. rNcSAG1+rNcSRS2		-2,378	-7,295 to 2,539		No	ns		0,4448			
Control vs. rNcSAG1		-3,324	-8,241 to 1,593		No	ns		0,2068			
Control vs. rNcSRS2		-8,344	-13,26 to -3,427		Yes	**		0,0029			
Control vs. Medio Condicionado		-2,29	-7,207 to 2,627		No	ns		0,4742			
Test details		Mean 1	Mean 2	Mean Diff,		SE of diff,		N1	N2	q	DF
Control vs. rNcSAG1+rNcSRS2		55,76	58,13	-2,378		1,627		3	3	1,462	8
Control vs. rNcSAG1		55,76	59,08	-3,324		1,627		3	3	2,043	8
Control vs. rNcSRS2		55,76	64,1	-8,344		1,627		3	3	5,13	8
Control vs. Medio Condicionado		55,76	58,05	-2,29		1,627		3	3	1,408	8

Tabla 8. Resumen de los datos estadísticos del % de área ocupada por parásitos de la representación gráfica de la figura 35B

Tabla de Análisis del % Área Ocupada por parásitos					
Two-way ANOVA			Ordinary		
Alpha			0,05		
Fuente de variación	% total de variación	P value	P value resumen	Significado	
Interaction	23,38	0,9372	ns	No	
Row Factor	5,484	0,8113	ns	No	
Column Factor	18,13	0,0047	**	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	1385	36	38,47	F (36, 50) = 0,6125	P=0,9372
Row Factor	324,8	9	36,09	F (9, 50) = 0,5746	P=0,8113
Column Factor	1074	4	268,4	F (4, 50) = 4,274	P=0,0047
Residual	3141	50	62,81		
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff,	Significante	Summary	Adjusted P Value
Control vs. rNcSAG1+rNcSRS2	-0,9785	-7,300 to 5,343	No	ns	0,9852
Control vs. rNcSAG1	1,465	-4,856 to 7,787	No	ns	0,9391
Control vs. rNcSRS2	-8,047	-14,37 to -1,726	Yes	**	0,0084
Control vs. Medio Condicionado	-2,267	-8,589 to 4,054	No	ns	0,7759

Tabla 9. Resumen de datos estadísticos del análisis del tamaño promedio de las vacuolas del gráfico representado en la figura 35C

Tabla de Análisis del Tamaño promedio de Vacuolas								
Two-way ANOVA				Ordinary				
Alpha				0,05				
Source of Variation		% of total variation		P value	P value summary		Significante	
Interaction		28,17		0,251	ns		No	
Row Factor		4,967		0,563	ns		No	
Column Factor		34,91		<,001	***		Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)			P value	
Interaction	1579	36	43,87	F (36, 50) = 1,224			P=,251	
Row Factor	278,5	9	30,95	F (9, 50) = 0,8637			P=,563	
Column Factor	1958	4	489,4	F (4, 50) = 13,66			P<,001	
Residual	1792	50	35,83					
Dunnett's multiple comparisons test		Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significante	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. rNcSAG1+rNcSRS2		-7,915	-12,69 to -3,140		Yes	***	<,001	
Control vs. rNcSAG1		-4,717	-9,491 to 0,05787		No	ns	0,054	
Control vs. rNcSRS2		-8,994	-13,77 to -4,219		Yes	***	<,001	
Control vs. Medio Condicionado		-13,23	-18,01 to -8,459		Yes	***	<,001	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
Control vs. rNcSAG1+rNcSRS2	3	10,91	-7,915	1,893	20	20	4,181	50
Control vs. rNcSAG1	3	7,716	-4,717	1,893	20	20	2,492	50
Control vs. rNcSRS2	3	11,99	-8,994	1,893	20	20	4,751	50
Control vs. Medio Condicionado	3	16,23	-13,23	1,893	20	20	6,991	50

Tabla 10. Resumen de datos estadísticos del análisis del ensayo de invasión a las 4hs de los parásitos estresados gráfico de la figura 37.

Tabla de Análisis del ensayo de Invasión 4hs NcLiv								
ANOVA summary								
F	5,793		Significant diff. among means (P < 0.05)				Yes	
P value	0,0397		R squared				0,6588	
P value summary	*							
Brown-Forsythe test								
F (DFn, DFd)		0,7755 (2, 6)		P value summary			ns	
P value		0,5017		Are SDs significantly different (P < 0.05)?			No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)		P value		
Treatment (between columns)	4325	2	2163	F (2, 6) = 5,793		P=0,0397		
Residual (within columns)	2240	6	373,3					
Total	6565	8						
Holm-Sidak's multiple comparisons test			Mean Diff,	Significante	Summary	Adjusted P Value		
Día 0 vs. Día 20			26,28	No	ns	0,1467	A-B	
Día 0 vs. Día 40			53,69	Yes	*	0,0287	A-C	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
Día 0 vs. Día 20	58	31,72	26,28	15,78	3	3	1,666	6
Día 0 vs. Día 40	58	4,307	53,69	15,78	3	3	3,403	6

Tabla 11. Resumen de datos estadísticos del análisis de la variación en la expresión de los genes *Ncsag1* y *Ncsrs2* durante la atenuación de la cepa *NcLiv*.

Tabla de Análisis de la Expresión relativa a s28 en NcLiv								
Two-way ANOVA					Ordinary			
Alpha					0,05			
Source of Variation		% of total variation		P value	P value summary		Significante	
Interaction		11,62		0,0284	*		Yes	
Row Factor		60,5		<0,0001	****		Yes	
Column Factor		12,05		0,0254	*		Yes	
ANOVA table		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)		P value	
Interaction		342,5	3	114,2	F (3, 16) = 3,916		P=0,0284	
Row Factor		1783	1	1783	F (1, 16) = 61,15		P<0,0001	
Column Factor		354,9	3	118,3	F (3, 16) = 4,059		P=0,0254	
Residual		466,4	16	29,15				
Difference between row means								
Mean of Ncsag1			0,2515		SE of difference		2,204	
Mean of Ncsrs2			17,49		95% CI of difference		21,91 to -12,56	
Difference between means			-17,24					
Sidak's multiple comparisons test		Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significante	Summary	Adjusted P Value	
Día 10 vs. Día 20 Ncsag1		0,3164	-11,43 to 12,06		No	ns	0,9998	
Día 10 vs. Día 40 Ncsag1		-0,01677	-11,76 to 11,73		No	ns	>0,9999	
Día 10 vs. Post Estrés Ncsag1		0,06169	-11,69 to 11,81		No	ns	>0,9999	
Día 10 vs. Día 20 Ncsrs2		15,77	4,021 to 27,52		Yes	**	0,0075	
Día 10 vs. Día 40 Ncsrs2		8,471	-3,276 to 20,22		No	ns	0,2025	
Día 10 vs. Post Estrés Ncsrs2		20,07	8,324 to 31,82		Yes	***	0,001	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
Día 10 vs. Día 20 Ncsag1	0,3419	0,02546	0,3164	4,408	3	3	0,07178	16
Día 10 vs. Día 40 Ncsag1	0,3419	0,3587	-0,01677	4,408	3	3	0,003803	16
Día 10 vs. Post Estrés Ncsag1	0,3419	0,2802	0,06169	4,408	3	3	0,01399	16

Día 10 vs. Día 20 Ncsrs2	28,57	12,8	15,77	4,408	3	3	3,577	16
Día 10 vs. Día 40 Ncsrs2	28,57	20,09	8,471	4,408	3	3	1,922	16
Día 10 vs. Post Estrés Ncsrs2	28,57	8,494	20,07	4,408	3	3	4,553	16

Tabla 12. Resumen de datos estadísticos del análisis de la variación en la expresión de los genes *Ncsag1* y *Ncsrs2* durante la atenuación de la cepa *NcURU1*.

Tabla de análisis de la Expresión relativa a s28 NcURU1								
Two-way ANOVA					Ordinary			
Alpha					0,05			
Source of Variation	% of total variation		P value		P value summary		Significante	
Interaction	14,98		0,2737		ns		No	
Row Factor	13,19		0,1365		ns		No	
Column Factor	9,703		0,4187		ns		No	
ANOVA table	SS	DF	MS		F (DFn, DFd)		P value	
Interaction	433,1	2	216,6		F (2, 12) = 1,446		P=0,2737	
Row Factor	381,4	1	381,4		F (1, 12) = 2,547		P=0,1365	
Column Factor	280,7	2	140,3		F (2, 12) = 0,9370		P=0,4187	
Residual	1797	12	149,8					
Difference between row means								
Mean of Ncsag1		12,4		SE of difference		5,769		
Mean of Ncsrs2		3,199		95% CI of difference		-3,363 to 21,78		
Difference between means		9,206						
Dunnett's multiple comparisons test		Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significante	Summary	Adjusted P Value	
Día 0 vs. Día 20 Ncsag1		-2,843	-27,85 to 22,16		No	ns	0,9429	
Día 0 vs. Día 40 Ncsag1		-20,04	-45,05 to 4,964		No	ns	0,1188	
Día 0 vs. Día 20 Ncsrs2		0,1595	-24,85 to 25,16		No	ns	0,9998	
Día 0 vs. Día 40 Ncsrs2		2,109	-22,90 to 27,11		No	ns	0,968	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
Día 0 vs. Día 20 Ncsag1	4,777	7,62	-2,843	9,992	3	3	0,2845	12
Día 0 vs. Día 40 Ncsag1	4,777	24,82	-20,04	9,992	3	3	2,006	12
Día 0 vs. Día 20 Ncsrs2	3,955	3,795	0,1595	9,992	3	3	0,01596	12
Día 0 vs. Día 40 Ncsrs2	3,955	1,846	2,109	9,992	3	3	0,2111	12

Anexo I: Marcadores de peso molecular

En la figura 35 se muestra el marcador de peso molecular que corresponde a *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa*, número de catálogo 26619. Este fue denominado MW1, en todo el texto.

En la figura 36 se muestra el marcador de peso molecular que corresponde a *Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa*, número de catálogo 26616. Este se denomina como MW2, en todo el texto.

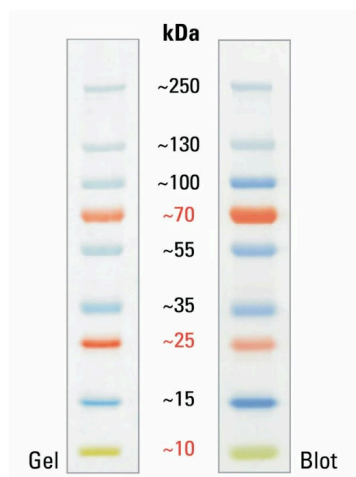


Figura 43. Marcador de peso molecular 1 (MW1).

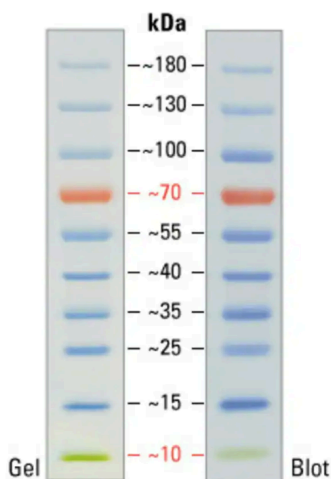


Figura 44. Marcado de peso molecular 2 (MW2).