



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

“Evaluación de la inmunorreactividad de metaloproteasas secretadas por *Toxoplasma gondii* como antígenos candidatos para estudios de inmunoprotección frente a la toxoplasmosis”

T E S I S

Que presenta

LIC. EN BBM. JESSICA BALDRICHE ACOSTA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

Directores de Tesis:

Dr. Ricardo Mondragón Flores

Dr. Edgar Morales Ríos

Ciudad de México

Agosto, 2019

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica Celular de Patógenos Intracelulares del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de los Dres. Ricardo Mondragón Flores y Edgar Morales Ríos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de crédito otorgada desde septiembre de 2017 hasta agosto de 2019 con número de becario 633157 y número de CVU 864681.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo Mondragón Flores por aceptarme en su grupo de investigación, por la dirección y financiamiento del presente trabajo, así como su asesoría, que contribuyó al cumplimiento de los objetivos de la tesis y a mi formación profesional.

Al Dr. Edgar Morales Ríos por la codirección del presente proyecto de tesis. Sus criterios y sugerencias enriquecieron el contenido de la tesis y me permitieron ganar en conocimientos que consolidan mi preparación como futura profesional.

A mis asesores, el Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes del Departamento de Bioquímica y el Dr. Marco Antonio Vega López del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, por su tiempo, comentarios y recomendaciones, que contribuyeron a mejorar la calidad del estudio.

A la Q.F.B Mónica Mondragón Castelán por su asesoría y apoyo con los experimentos realizados durante el proyecto.

Al Q.F.B Emanuel Ríos Castro de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del CINVESTAV-IPN por su apoyo con la identificación proteómica por espectrometría de masas.

Al Q.B.P Juan Manuel Carranza del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) por proporcionarnos los sueros de los pacientes con toxoplasmosis con los que se trabajó.

Al D. en C. Carlos Jorge Ramírez Flores, cuyo trabajo de maestría y doctorado constituyen los antecedentes del presente estudio y por su asesoría permanente durante el proyecto.

Al Ing. José Claudio Jiménez Vargas por siempre contribuir a que contara con el material necesario para realizar los experimentos.

A la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL), en particular a al Dr. Jorge Fernández Hernández y la M.V.Z Ma. Antonieta López López por el suministro y mantenimiento de los animales de experimentación.

A la Lic. Priscila González Ceja, secretaria de la Coordinación Académica al momento de mi ingreso a la maestría, por ayudarme con los trámites administrativos y académicos para la inscripción a la maestría y la obtención de la beca CONACYT.

A la Lic. Ma. del Rocío Arroyo Ruiz Velasco y la Lic. Leticia Gómez Sandoval que fungieron después como secretarias de la Coordinación por apoyarme con los trámites académicos en general.

Al Colegio de Profesores del Departamento de Bioquímica por lo que aprendí durante los cursos de la maestría y por sus críticas constructivas en los seminarios de presentación y avance.

Al Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN por permitirme el acceso a los diferentes equipos de experimentación.

Al CINVESTAV-IPN Zacatenco, a las unidades administrativas y académicas de LaNSE, Control Escolar, Departamento de Becas, Biblioteca y Espacios Teóricos.

A mis compañeros de generación de la maestría: Nicole, Mayra, Jesús, Vicente, Cristian y Dan por todos los momentos felices y amargos que compartimos. En especial quiero agradecer a Nicole por su amistad y apoyo en momentos muy difíciles de mi vida personal.

A mis compañeros de laboratorio: Rosalba, Mónica, Charly, Noé, Pancho, y Claudio, que en este tiempo se convirtieron en verdaderos amigos. Gracias por aguantarme, por su paciencia, por aclarar mis dudas, por enseñarme y ayudarme con las técnicas de experimentación y por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera más amena.

A toda mi familia y amigos, los de aquí y los de Cuba por su apoyo, ánimo y buenos consejos.

A Luisito, por poder contar contigo siempre y ayudarme a seguir adelante en los momentos difíciles. Gracias a ti mi estancia en México ha sido más fácil y llena de momentos felices.

A Beto, Paty, Rosa y Ely por hacerme sentir parte de ellos.

A mi esposo Luis por acompañarme en cada uno de mis triunfos y fracasos y sentirlos como suyos. Te doy infinitamente las gracias por estar en mi vida y compartir este logro conmigo.

A mis padres Liliana Acosta Alvarez y Jorge Félix Baldriche Rodríguez, primero por darme la vida, y además por estar a mi lado y apoyarme siempre en cada paso que doy.

A mis abuelos Jesús y Nancy, a ustedes que me formaron les debo lo que soy hoy en día y la determinación de luchar por mis sueños y mis metas.

Índice de contenido

Agradecimientos	III
Resumen	IX
Abstract	X
1. Introducción	1
2. Generalidades	2
2.1 <i>Taxonomía y Biología Celular</i>	2
2.1.1 <i>Complejo Apical</i>	2
2.1.2 <i>Organelos Secretores</i>	3
2.1.3 <i>Películo</i>	5
2.1.4 <i>Citoesqueleto</i>	5
2.2 <i>Formas parasitarias y ciclo de vida</i>	6
2.3 <i>Infección y respuesta inmune del hospedero</i>	7
2.4 <i>Antígenos para el desarrollo de vacunas contra T. gondii</i>	10
3. Justificación	13
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	14
5.1 <i>Objetivo general</i>	14
5.2 <i>Objetivos específicos</i>	14
6. Materiales y Métodos	15
6.1 <i>Parásitos</i>	15
6.2 <i>Animales</i>	15
6.3 <i>Obtención de PES de taquizoítos de T. gondii</i>	15
6.4 <i>Análisis bioinformático de antigenicidad</i>	16
6.5 <i>Purificación de metaloproteasas por cromatografía de afinidad</i>	17
6.6 <i>Diálisis de las fracciones colectadas de la purificación</i>	17
6.7 <i>Precipitación de las metaloproteasas por el método de metanol/cloroformo</i>	18
6.8 <i>Cuantificación de proteínas por el método de Bradford</i>	18
6.9 <i>Zimografía en gelatina</i>	19
6.10 <i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	19
6.11 <i>Electroforesis 2D</i>	20

6.12 Identificación de proteínas de PES inmunorreconocidas por Wb.	21
6.13 Identificación de proteínas de PES inmunogénicas por E-masas	22
7. Resultados.....	24
7.1 Análisis bioinformático de antigenicidad de proteasas secretadas por <i>T. gondii</i>	24
7.2 Estandarización de la purificación de metaloproteasas de <i>T. gondii</i> por cromatografía de afinidad	29
7.3 Inmunorreconocimiento de proteínas inmunogénicas en PES por Wb.34	
7.4 Identificación de proteínas inmunogénicas de PES por E- masas.	38
8. Discusión.....	42
9. Conclusiones	48
10. Perspectivas.....	49
Anexos.....	50
Anexo I: Péptidos antigénicos lineales para células B de la TLN-4 devueltos por el servidor IEDB.....	50
Anexo II: Péptidos accesibles de la TLN-4 devueltos por el servidor IEDB.	51
Anexo III: Alineamiento múltiple de secuencia de la TLN-4 de <i>T. gondii</i> con <i>Homo sapiens</i>	52
Anexo IV: Alineamiento múltiple de secuencia de la TLN-4 de <i>T. gondii</i> con <i>Mus musculus</i>	53
Referencias Bibliográficas.....	54

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que infecta a todos los animales de sangre caliente, incluyendo humanos. Los principales grupos susceptibles lo constituyen los inmunocomprometidos y las embarazadas, por el riesgo de muerte por encefalitis, así como aborto espontáneo y transmisión fetal congénita, respectivamente. Sin embargo, hasta la fecha no se cuenta con una vacuna de uso humano disponible para prevenir la infección, ni con fármacos antiparasitarios que permitan su completa curación. Las proteasas secretadas por *T. gondii* participan en la invasión a la célula hospedera, sin embargo, su papel en diseminación aún no está demostrado. En nuestro laboratorio, previamente se demostró que metaloproteasas parasitarias provocan la apertura de una monocapa de células MDCK sin afectar la viabilidad celular, lo que sugirió su posible participación en la migración transepitelial de *T. gondii* por el hospedero, convirtiéndose en antígenos atractivos para estudios de inmunoprotección. En el presente trabajo se pretendió la búsqueda de posibles proteasas inmunogénicas de PES de taquizoítos de *T. gondii*, lo cual en primera instancia se realizó mediante un análisis *in silico* de antigenicidad, que mostró la existencia de al menos 10 epítomos lineales y 7 accesibles para la activación de células B en 19 proteasas analizadas. De acuerdo con este análisis la toxolisina-4 resultó ser la más antigénica, con 78 epítomos antigénicos y 53 accesibles para células B y un total de 52 y 20 péptidos con capacidad de unión a MHC-I y MHC-II, respectivamente. Así, la toxolisina-4 se consideró un antígeno candidato para estudios contra la toxoplasmosis humana en modelos murinos, teniendo en cuenta además que con ambos organismos sólo compartió identidad de secuencia en residuos de un dominio conservado tipo insulina con la enzima degradativa de insulina, con un 31.76% o menor. Por otro lado, se estandarizó un método de purificación de proteasas a partir de PES parasitarios mediante cromatografía de afinidad en columna de sefarosa 4B acoplada a gelatina. Como producto se obtuvo una fracción enriquecida con actividad proteolítica por zimografía, sin embargo, debido a la insuficiente cantidad de proteína obtenida, no fue posible evaluar su inmunogenicidad por Wb, por lo que se decidió realizar entonces el análisis directamente en PES parasitarios. Se encontraron spots por Wb 2D que presentaron actividad proteolítica por zimografía 2D. Sin embargo, el análisis proteómico de estos no arrojó la secuencia de ninguna proteasa, lo que, en conjunto con los resultados previos, nos indicó que en el futuro será necesario producir las proteasas por vía recombinante, con el fin de obtener una cantidad suficiente de proteína para poder realizar los estudios inmunológicos pertinentes.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects all warm-blooded animals, including humans. The main susceptible groups are immunocompromised and pregnant women, due to the risk of death from encephalitis, as well as spontaneous abortion and congenital fetal transmission, respectively. However, currently there is no human vaccine available to prevent infection, or antiparasitic drugs that allow its complete cure. Some proteases secreted by *T. gondii* participate in the invasion of the host cell, however, their role in dissemination is not proven yet. In our laboratory, prior to this study, it was demonstrated that parasitic metalloproteases causes the opening of a MDCK cells monolayer, without affecting cell viability. This suggests their possible participation in epithelial transmigration of *T. gondii* and makes them attractive antigens for immunoprotection studies. In this work, we searched possible immunogenic secreted proteases of tachyzoites of *T. gondii*, which in the first instance was carried out by *in silico* analysis of antigenicity, which showed the existence of at least 10 linear epitopes and 7 accessible for B cell activation in 19 proteases analyzed. The TLN-4 showed to be the most antigenic protein, with 78 antigenic epitopes and 53 accessible epitopes for B cells, and 52 and 20 peptides able of binding to MHC-I and MHC-II, respectively. In addition, TLN-4 was considered a candidate antigen for studies against human toxoplasmosis in murine models, since with both organisms it only shared sequence identity in residues of a conserved insulin-like domain, with a percentage of identity less than 31.76%. On the other hand, the purification of proteases from parasitic ESP was standardized by affinity chromatography method in sepharose 4B column coupled to gelatin. As a product, an enriched fraction with proteolytic activity by zymography was obtained, however, due to the insufficient amount of protein obtained, it was not possible to assess its immunogenicity by Wb, which was then decided to be performed directly on parasitic ESP. We found spots by 2D Wb with proteolytic activity by 2D zymography. However, the proteomic analysis not yield any protease present in these spots, which together with the previous results indicated that in order to continue with this study in the future, it will be necessary to produce proteases by recombinant route, in order to obtain a sufficient quantity of protein to perform immunological studies.

1. Introducción

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado perteneciente al Phylum Apicomplexa que puede infectar a mamíferos y aves, incluyendo humanos. Fue aislado por primera vez en 1908 de manera simultánea en conejos de experimentación en Brasil, y en Túnez en el roedor del norte de África *Ctenodactylus gondii*¹. Inicialmente, se le denominó *Leishmania gondii*, pero al observar que el nuevo microorganismo no crecía en medios de cultivo descritos para *Leishmania* spp. se sugirió el nombre de *Toxoplasma* (del griego *Toxo*: arco) para identificar un nuevo género de parásitos².

Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *T. gondii*, aunque la prevalencia varía entre las diferentes zonas, siendo mayor en regiones con climas cálidos, húmedos y en población de estratos socioeconómicos más bajos³. En México, la mayor prevalencia se encuentra en las zonas costeras, donde puede llegar a superar el 60%⁴. Aunque en la mayoría de los individuos la infección cursa de manera asintomática debido a su control por la respuesta inmune del hospedero, la toxoplasmosis constituye una zoonosis de gran importancia médica, pues en individuos inmunocomprometidos, especialmente en aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la reactivación de la infección latente causa lesiones necróticas cerebrales que provocan encefalitis potencialmente mortal⁵. Por otra parte, en mujeres embarazadas que se infectan por primera vez durante la gestación, puede llegar a ocasionar abortos espontáneos e infección fetal congénita⁶.

2. Generalidades

2.1 Taxonomía y Biología Celular

Actualmente, *T. gondii* se clasifica de la siguiente manera desde el punto de vista taxonómico ⁷: Dominio: Eukaryota, Reino: Protistas, Phylum: Apicomplexa, Clase: Coccidia, Orden: Eucoccidiorida, Familia: Sarcocystidae, Género: *Toxoplasma*, Especie: *Toxoplasma gondii*.

T. gondii tiene forma de media luna, su extremo anterior (apical) es puntiagudo mientras el posterior es redondeado. Presenta un núcleo, una única mitocondria, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi y un apicoplasto ⁸. Este último está presente en la mayoría del grupo Apicomplexa, presenta genoma propio de 35 000 pb, está rodeado de cuatro membranas y mide entre 0.15-1.5 μm . Es homólogo al cloroplasto de los dinoflagelados, pero a diferencia de este, el apicoplasto no fotosintetiza debido a la ausencia de clorofila. Su importancia metabólica radica en la síntesis de ácido grasos (AG), isoprenoides y aminoácidos (aa) ⁹.

2.1.1 Complejo Apical

Una característica morfológica distintiva de las especies Apicomplexa, y que da nombre al *phylum* es la presencia de un complejo en la región apical, que funcionalmente se relaciona con la adherencia e invasión parasitaria a las células hospederas y está formado por las siguientes estructuras ¹⁰:

- Conoide: estructura contráctil en forma de cono hueco truncado constituido por una red de filamentos helicoidales de α -tubulina organizados en sentido contrario a las manecillas del reloj, visto desde el interior del parásito. El conoide está involucrado en los procesos de motilidad e invasión parasitarios. Así, cuando *T. gondii* se encuentra dentro de la célula hospedera, el conoide se encuentra introducido dentro del citoplasma del parásito (estado de reposo), en cambio cuando lisa la célula y sale al medio extracelular para infectar otras

células, lo protruye intermitentemente mientras avanza. Al momento de la invasión *T. gondii*, lleva a cabo la extrusión del conoide, que consiste en la proyección del extremo apical sobre la membrana de la célula hospedera, ejerciendo presión sobre la misma.

- Anillos preconoidales: dos anillos ubicados por encima del conoide, su función aún no se encuentra clara.
- Anillo polar anterior: centro organizador de microtúbulos ubicado próximo al conoide, donde se organizan 22 microtúbulos que se extienden helicoidalmente hasta aproximadamente una tercera parte de la longitud del parásito. Se cree que constituye un punto de apoyo para los microtúbulos y el conoide durante el movimiento del parásito.
- Roptrías y micronemos: organelos secretores involucrados en los procesos de motilidad, adhesión, invasión y establecimiento de la vacuola parasitófora. La secreción de proteínas por las roptrías y micronemos siguen a la extrusión del conoide durante la invasión, desestabilizando la membrana de la célula hospedera, lo que permite la penetración del parásito.

2.1.2 Organelos Secretores

Toxoplasma tiene tres organelos con características secretoras:

- Roptrías: organelos secretores en forma de sacos alargados. La parte posterior almacena las proteínas de secreción y tiene forma de bulbo, el cual se alarga para formar un conducto angosto hacia la zona apical del parásito denominado cuello. El cuello se extiende hacia el interior del conoide y es por donde ocurre la secreción, es electrodensó visto al microscopio electrónico, mientras que en el bulbo es heterogéneo y vesicular. Una de las proteínas más estudiadas es ROP1, la cual es una proteína soluble que es secretada y se detecta en la zona de penetración, sugiriendo un papel temprano en el proceso de invasión ⁸.

- Micronemos: organelos secretores en forma ovoide. Su secreción depende de incrementos de calcio intracelular y puede ser inducida *in vitro* en ausencia de células hospederas utilizando ionóforos para calcio como la ionomicina. Las proteínas secretadas por los micronemos se denominan MIC, de las cuales han sido identificadas al menos 11, y están implicadas en los procesos de adhesión y deslizamiento del parásito sobre la célula hospederas. Entre estas proteínas destacan: MIC1, MIC3 y MIC4 que poseen dominios extracelulares adhesivos, son carentes de dominio transmembranal y aparentemente se encuentran implicadas en la adhesión a moléculas aún no identificadas de la membrana de la célula hospederas; MIC 2 es movilizada desde los micronemos para ocupar la superficie apical del parásito al momento de la invasión celular y puede ser recuperada en sobrenadantes de taquizoítos expuestos a ionóforos de Ca^{2+} , sugiriendo su secreción del parásito ⁸.
- Gránulos densos: pequeños cuerpos esferoidales electrodensos que secretan proteínas al interior de la vacuola parasitófora, esto es al final del proceso de invasión. Las proteínas secretadas por los gránulos densos se denominan GRA y pueden formar parte de la membrana de la vacuola parasitófora, aunque fundamentalmente están involucradas con la maduración de la misma y en la formación del quiste ⁸. Las proteínas GRA 1, 2, 4 y 6 son secretadas en el espacio intravacuolar dando origen a la red vesículo-tubular, la cual se extiende desde la membrana del parásito, hasta la VP llenando el lumen intravacuolar, mientras que las proteínas GRA 3, 5, 7 y 8 son proteínas que constituyen parte de la membrana de la VP, confiriéndole cierta protección contra la acidificación y fusión lisosomal, de tal manera que los parásitos no son degradados por los mecanismos de defensa de la célula hospederas.

2.1.3 Películo

Complejo trimembranal que rodea al taquizoíto, sólo interrumpiéndose en el extremo anterior y posterior. Incluye la membrana plasmática que es la más externa del películo y dos membranas internas que constituyen el complejo membranal interno (siglas inglés IMC). El IMC está conformado por 11 vesículas aplanadas y fusionadas entre sí dispuestas en forma de mosaico con un arreglo helicoidal. Los 22 microtúbulos organizados a partir del anillo polar descrito previamente se relacionan con las vesículas que conforman el IMC, a razón de 2 microtúbulos asociados por cada vesícula. Por esta razón a estos microtúbulos se les denomina microtúbulos subpeliculares. El películo brinda estabilidad mecánica a *T. gondii* y el resto de los Apicomplexa^{8,10}.

2.1.4 Citoesqueleto

El citoesqueleto de *T. gondii* es una estructura única, esencial para su motilidad, replicación e invasión tisular. Está formado por diferentes estructuras como el conoide, los anillos preconoidales, el anillo polar apical, una red de 22 microtúbulos subpeliculares y el anillo polar posterior. Se ha descrito la presencia de α -tubulina formando parte del conoide, y la existencia de dos microtúbulos cortos pareados intraconoidales de función desconocida. Además, en la región del conoide existen un gran número de proteínas asociadas al citoesqueleto entre las que se destacan TgCAM1 y TgCAM2, que presentan dominios tipo manos EF de unión al Ca^{2+} . El anillo polar apical sirve como centro organizador a los 22 microtúbulos subpeliculares, los cuales se encuentran dispuestos helicoidalmente en sentido contrario a las manecillas del reloj y se extienden hasta las dos terceras partes de la longitud del parásito hacia el extremo posterior, siendo responsables de la forma de media luna del parásito y el tipo de motilidad, que consiste en un deslizamiento helicoidal sobre un sustrato (*gliding*). Asociada a los microtúbulos subpeliculares se ha descrito red subpelicular rica en actina filamentosa, constituida por múltiples

filamentos longitudinales entrecruzados que se organiza desde el anillo polar posterior, y también se asocia con el IMC ¹¹.

2.2 Formas parasitarias y ciclo de vida

Existen tres estadios parasitarios infecciosos durante el ciclo de vida de *T. gondii* ¹².

- Esporozoítos: estadio contenido dentro de los ooquistes liberados en las heces de los felinos (hospederos definitivos). Los ooquistes son estructuras esféricas que contienen una doble pared rica en quitina. Esporulan (se vuelven infecciosos) en la naturaleza en condiciones de humedad y calor entre 1-5 días, adquiriendo una forma ovoide y pueden permanecer viables incluso, ante condiciones medioambientales drásticas. El esporozoíto es similar al taquizoíto, pero presenta mayor número de micronemos y roptrías.
- Bradizoítos: forma parasitaria de lenta proliferación encontrada dentro de los quistes tisulares de mamíferos infectados. Poseen forma de media luna y miden de 7 x 1.5 μm . Difieren sutilmente de los taquizoítos pues presentan el núcleo en la parte posterior, un incremento en el número de micronemos y sus roptrías son más electrodensas. Además, se observa la presencia de gránulos de amilopectina, que se encuentran ausentes o en cantidades muy discretas en los taquizoítos
- Taquizoítos: forma altamente infecciosa intracelular que mide alrededor de 3 x 7 μm . Se caracteriza por su rápida proliferación y puede infectar prácticamente cualquier célula del organismo, alojándose en una vacuola parasitófora (VP), donde se replica asexualmente por endodiogenia.

El ciclo de vida parasitario tiene lugar en dos tipos de hospederos, los hospederos definitivos, donde ocurre la fase sexual del ciclo y son todos los miembros de la familia *Felidae*, de ellos el gato doméstico (*Felius catus*) es el más cercano al hombre; y los hospederos intermediarios que son aquellos

donde ocurre la fase asexual del ciclo y puede ser cualquier animal de sangre caliente, como las aves y los mamíferos, incluyendo al humano ¹³. El ciclo comienza cuando el gato se infecta con quistes tisulares, por ejemplo, al alimentarse de un ratón infectado. La pared de estos es disuelta por las enzimas digestivas intestinales, los bradizoítos son liberados y penetran los enterocitos, alojándose en una VP donde desarrollan numerosas rondas de división y se diferencian en cinco estadios asexuales que terminan con la formación de microgametocitos (gametos masculinos) y macrogametocitos (gametos femeninos), proceso conocido como gametogonia ¹⁴. El microgametocito es biflagelado y altamente móvil, se desplaza sobre las células intestinales para fertilizar los macrogametos femeninos y formar los cigotos, que más tarde se transforman en ooquistes. Los ooquistes inmaduros salen al lumen intestinal y al ambiente en las heces del felino. En condiciones de elevada humedad y temperaturas cálidas, los ooquistes esporulan entre 2-3 días volviéndose infectivos, conteniendo en su interior un total de 8 esporozoítos. La fase de reproducción asexual tiene lugar cuando ocurre la ingesta de los ooquistes infectivos por animales y el humano, dando como resultado la liberación de los esporozoítos que invaden el epitelio intestinal, donde rápidamente se diferencian a taquizoítos que lisan las células intestinales y alcanzan el sistema linfático y sanguíneo. Así se diseminan por todo el organismo de forma libre, o dentro de macrófagos y células dendríticas infectadas, alcanzando órganos distantes del sitio primario de infección como la retina, el SNC y la placenta. Esta última puede ser atravesada por *T. gondii* y llegar al feto, causando aborto o toxoplasmosis congénita. La infección en humanos también puede ocurrir con quistes tisulares por el consumo de carnes mal cocidas, o sea, a partir del estadio de bradizoítos ¹⁵.

2.3 Infección y respuesta inmune del hospedero

La forma más común de infección humana por *T. gondii* es por la ingestión de quistes tisulares u ooquistes esporulados ¹⁶. En ambos casos ocurre una

rápida diferenciación a taquizoítos en las células epiteliales intestinales, que alcanzan la circulación linfática y sanguínea en aproximadamente 18 h y 24 h post-infección, respectivamente ¹⁷. Existen dos formas principales de diseminación parasitaria por el organismo, la primera consiste en la invasión con proliferación y ruptura de la célula infectada, luego de lo cual los parásitos atraviesan la barrera epitelial, hematoencefálica, hemato-retiniana y la placenta, por la liberación de proteasas que modifican a los endotelios y epitelios, permitiendo el flujo paracelular del parásito ¹⁷⁻¹⁸. La segunda se refiere a la migración dentro de células dendríticas y macrófagos infectados, que migran a través de los epitelios y endotelios (modelo caballo de troya) ^{19,18}.

En las primeras horas luego de la infección con *T. gondii* tiene lugar la fase de infección aguda, con la consecuente invasión celular, proliferación parasitaria, lisis de las células infectadas y diseminación, la cual causa sintomatología por la invasión activa a nivel sistémico. Sin embargo, los mecanismos inmunológicos que actúan en un hospedero inmunocompetente ante la presencia del parásito, con la secreción de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ , conducen a la activación de respuestas Th1 que controlan la infección, limitándola a un estado latente (enquistamiento) sin que llegue a producirse enfermedad grave, típica de la infección activa en inmunocomprometidos como resultado del elevado daño tisular a nivel neurológico y sistémico ²⁰. Los mecanismos innatos de defensa que actúan a nivel de la mucosa intestinal son importantes para contener tempranamente la división descontrolada del parásito y, en consecuencia, evitar una más rápida diseminación con mayor daño al hospedero. Existen diferentes mecanismos innatos de defensa asociados al epitelio intestinal como a) los enterocitos, que constituyen una barrera física al paso del parásito y que además secretan quimiocinas y péptidos antimicrobianos; b) las células de Paneth secretoras de péptidos antimicrobianos; c) las células caliciformes y células M, especializadas en la secreción de mucus y transcitosis de antígenos (Ag) ²¹, respectivamente. No obstante a estos mecanismos innatos de defensa, los taquizoítos de *T. gondii* logran dividirse dentro de los enterocitos y atravesar la pared intestinal, siendo

los mecanismos inmunes innatos que actúan nivel de la lámina propia, fundamentalmente células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células NK, los que logran más eficientemente el control temprano de la infección ²². Es de destacar el papel de la célula dendrítica, que en respuesta al reconocimiento del parásito, secreta IL-12 vía la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88) ²³. La IL-12 es una citocina inductora de IFN- γ , que se relaciona con protección frente a la toxoplasmosis pues induce la activación de la respuesta celular Th1 y activa los mecanismos microbicidas de los macrófagos para que destruyan más eficientemente a los parásitos fagocitados. Además, las células dendríticas son un vínculo importante entre la inmunidad innata y la activación de la respuesta inmune adaptativa, pues presentan a los antígenos parasitarios tanto a los linfocitos T CD4+ como a los T CD8+ en los ganglios linfáticos mesentéricos, que en el contexto de citocinas proinflamatorias como la IL-12 y el IFN- γ se diferencian a Th1 y CTL (linfocitos citolíticos naturales), respectivamente. Al ser *T. gondii* un parásito intracelular obligado es justamente la respuesta Th1 la más relevante en el control de la infección, específicamente porque los linfocitos T CD8+ al activarse a CTL promueven la destrucción de las células infectadas, cuando estas les presentan antígenos parasitarios en el contexto de las moléculas MHC-I, mecanismo fundamental para el control del número de quistes cerebrales ²²⁻²⁴. En cerebros de individuos infectados, los linfocitos T CD8+ logran atravesar la barrera hematoencefálica producto de la activación del endotelio de la red capilar que la conforma, que conlleva a la expresión de moléculas de adhesión. La adhesión de los linfocitos T CD8+ al endotelio vascular promueve su extravasación al espacio perivascular, donde contactan con células de la microglía que expresan ligandos de quimiocinas. Esto promueve la entrada de los linfocitos al parénquima cerebral, donde lisan neuronas infectadas ²⁴. Aunque la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 es, como ya se mencionó, la más relevante en el control de la infección, los taquizoítos de *T. gondii* tienen una fase extracelular al momento que lisan las células para su diseminación a órganos distantes del sitio de infección ¹⁷. Durante esta fase, cobra importancia

la respuesta neutralizante de anticuerpos contra *T. gondii*, fundamentalmente los de tipo IgG. Así, anticuerpos IgG de memoria que circulan de por vida en individuos infectados, protegen contra reinfecciones ²⁵. De igual manera, los anticuerpos IgA que se inducen y secretan en la mucosa intestinal ante la presencia del parásito en el lumen durante la primoinfección, protegen contra infecciones secundarias en la mucosa ²⁶.

A pesar de que, como ya se mencionó en párrafos precedentes, la neurotoxoplasmosis constituye una importante causa de muerte en pacientes SIDA, y la primoinfección parasitaria causa abortos en mujeres embarazadas y malformaciones congénitas fetales, aún no se cuenta con una vacuna disponible de uso humano que permita prevenir la infección.

En relación con el tratamiento contra la toxoplasmosis, el más utilizado es una combinación de pirimetamina y sulfadiazina, aunque esta resulta muy tóxica en el caso de toxoplasmosis congénita y con pacientes inmunosuprimidos. En este sentido se han reportado otros agentes antitoxoplásmicos como: espiramicina, antibiótico del grupo de los macrólidos, especialmente en la toxoplasmosis gestacional; clindamicina; las tetraciclinas y la rifampicina. De todos los fármacos disponibles, no hay uno o combinaciones de ellos que permitan la completa eliminación del parásito. La mayoría de los tratamientos disponibles sólo ejercen acción toxoplásmica en parásitos proliferantes que han emergido de las células infectadas, es decir, en su condición transitoria extracelular, pero no tienen ningún efecto sobre parásitos intracelulares, que se encuentran al interior de una vacuola parasitófora, ni de los quistes tisulares ²⁷.

2.4 Antígenos para el desarrollo de vacunas contra *T. gondii*

A la fecha no hay vacunas disponibles en humano contra la toxoplasmosis. Las principales estrategias que se han reportado en la búsqueda de vacunas reportadas contra la infección por *T. gondii* son: a) vacunas vivas atenuadas y b) las llamadas vacunas de “nueva generación”, que incluyen: vacunas de

ADN, vacunas peptídicas y vacunas de proteínas recombinantes ²⁸. Las vacunas vivas atenuadas no se permiten emplear en humanos por el riesgo de reversión a virulencia, siendo hasta el momento la más exitosa en el caso de *T. gondii* ToxoVac, vacuna de uso veterinario para ganado ovino y que consiste en una solución liofilizada de 10⁵ taquizoítos viables de *T. gondii* de la cepa de baja virulencia S48 por dosis, que está indicada en ovejas no gestantes de al menos 4 meses de edad para reducir el aborto y la mortalidad perinatal de los corderos ²⁹. Las aproximaciones a vacunas de ADN, peptídicas y recombinantes, se han basado fundamentalmente en el hecho de que hay más de 1360 familias de proteínas especializadas descritas en *T. gondii*, aunque las más empleadas como antígenos han sido proteínas de superficie y de organelos secretores como las roptrías, los micronemos y los gránulos densos ^{28,29}. Hasta la fecha sólo se ha logrado inducir inmunidad parcial con estas aproximaciones, sin embargo, la respuesta se incrementa con el empleo de adyuvantes y en diseños de multi-antígenos ³⁰. Estos últimos se basan el uso de varias proteínas inmunogénicas o subunidades de las mismas como principio activo de la vacuna, o bien, en el caso específico de las vacunas peptídicas, la elaboración de un “core” proteico con péptidos sintetizados químicamente a partir de diferentes proteínas antigénicas ³¹. Por las ventajas que ofrecen estas vacunas de nueva generación, sobre todo desde el punto de vista de seguridad, y que han logrado incrementar la sobrevivencia en estudios preclínicos, cada vez son más numerosos los estudios al respecto, siendo el principal desafío para los investigadores la búsqueda de antígenos candidatos potenciales.

Diferentes proteínas de *T. gondii* se han estudiado como antígenos vacunales, estas pueden agruparse en: 1) antígenos de superficie, que incluyen glicoproteínas de superficie (SAGs) y proteínas de la de la membrana apical (MA); y 2) antígenos de organelos secretores como los micronemas (MIC), las roptrías (ROP) y los gránulos densos (GRAs) ³².

Las proteasas son enzimas proteolíticas que catalizan la degradación de uniones peptídicas. Son numerosas y están ampliamente distribuidas entre

virus, bacterias y células eucariotas como los protozoos parásitos patógenos para el hombre. En el caso de *T. gondii*, las proteasas participan en la invasión del parásito a la célula hospedera ³³, pero su papel en diseminación no se encuentra aún demostrado. En otros protozoarios como *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* y *Entamoeba histolytica* se ha reportado que las proteasas también participan en la diseminación parasitaria y en la evasión de la respuesta inmune ^{34,35,36}. Por ejemplo, en *Trichomonas vaginalis* se han descrito 23 cisteín-proteasas (CP) que son factores líticos esenciales en la adherencia y colonización del tracto genitourinario (TGI), pues llevan a cabo la degradación de componentes de la mucosa y células del TGI, permitiendo la penetración del parásito a capas más profundas ³⁷. En el caso del protozoo extracelular *E. histolytica*, las CP proteasas secretadas son factores importantes de virulencia y se consideran esenciales para destruir los tejidos humanos pues degradan distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina, laminina y colágeno. Además, se ha propuesto que estas enzimas pueden separar a las células facilitando la diseminación tisular así como degradar IgA, IgG y a la proteína precursora pro-IL-18 ³⁸.

En estudios previos en nuestro laboratorio se lograron identificar 19 proteasas secretadas por *T. gondii* (tabla 1), algunas de las cuales fueron responsables de la apertura de una monocapa de células MDCK a las 4 h de incubación de las células con productos de excreción-secreción (PES) parasitarios, sin afectar la viabilidad celular ³⁹. Lo anterior sugiere la posible participación de las proteasas en la diseminación de *T. gondii*, permitiéndole transmigrar epitelios en el hospedero. Estos resultados, junto al hecho de que estudios recientes han demostrado inducción de respuesta inmune humoral y celular contra proteasas de *T. gondii* en ratones previamente inmunizados, con aumento de la supervivencia frente al reto parasitario con dosis letal ⁴⁰⁻⁴⁴, convierte a las proteasas en antígenos atractivos para estudios de inmunoprotección contra la infección parasitaria, pues la exposición de las mismas ante los diferentes componentes del sistema inmune pudiera desencadenar una respuesta neutralizante que inhiba la diseminación parasitaria.

3. Justificación

Estudios previos en nuestro laboratorio han permitido la identificación de proteasas secretadas por *T. gondii* y demostrado la modificación por parte de estas sobre una monocapa de células MDCK, observándose una apertura de la misma sin afectar la viabilidad celular. Esta observación lleva a sospechar acerca de la posible participación de las proteasas en el establecimiento exitoso de la infección por *T. gondii*, permitiendo su diseminación en el hospedero a zonas distantes del sitio de infección como el cerebro, los ojos y a través de la placenta, a partir de la modificación de las uniones intercelulares. Lo anterior hace considerar a estas proteínas antígenos atractivos para estudios de inmunoprotección contra la toxoplasmosis, con el fin de inhibir la trans migración parasitaria y con ello, su diseminación.

4. Hipótesis.

Toxoplasma gondii secreta proteasas inmunogénicas que son inmunorreconocidas por sueros de pacientes infectados, por lo que pueden constituir antígenos potenciales para el desarrollo de vacunas contra la infección parasitaria.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general

Identificar metaloproteasas inmunogénicas secretadas por *T. gondii* como antígenos potenciales inductores de inmunoprotección frente a la infección parasitaria.

5.2 Objetivos específicos

1. Realizar el análisis *in silico* de antigenicidad de metaloproteasas secretadas por *T. gondii* previamente identificadas y caracterizadas en nuestro laboratorio, como un primer acercamiento a su posible potencial antigénico.
2. Obtener una fracción enriquecida de proteasas a partir de PES de taquizoítos de *T. gondii* mediante cromatografía de afinidad y evaluar su presencia por zimografía.
3. Evaluar la inmunorreactividad de sueros de pacientes con toxoplasmosis crónica sobre la fracción enriquecida de proteasas y PES parasitarios, con el fin de determinar la presencia de proteasas inmunogénicas.
4. Identificar las bandas inmunorreconocidas por espectrometría de masas.

6. Materiales y Métodos

6.1 Parásitos

Se trabajó con la cepa RH de *T. gondii* de alta virulencia y genotificada del tipo I. Esta se caracteriza por ser no cistogénica y causar infección activa en modelos murinos, siendo hipervirulenta en todas las cepas de ratones al presentar una dosis letal del 100% de un sólo parásito viable.

6.2 Animales

Para el mantenimiento de la cepa RH de *T. gondii* se emplearon ratones BALB/c de entre 6-8 semanas proporcionados por la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN, donde se mantuvieron bajo condiciones reguladas de temperatura, humedad, aire y de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.3 Obtención de PES de taquizoítos de *T. gondii*

Los taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* se obtuvieron mediante el exudado peritoneal de ratones BALB/c, previamente infectados intraperitonealmente con 1×10^6 taquizoítos en 100 μ L de PBS 1X (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.1 mM, pH 7.2; J.T Baker, México) y sacrificados de 3-4 días post-infección. Los parásitos obtenidos se lavaron 3 veces a 1800 rpm a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos, los dos primeros en PBS 1X y el último en HEPES-Salina 1X (HEPES 20 mM, SIGMA Life Science; NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.2). Luego se filtraron 3 veces a través de filtros de policarbonato de 5 μ m de diámetro (Millipore, Bedford MA) y se incubaron a 37 °C por 4 h para permitir la secreción, a razón de 1 mL de HEPES-Salina por cada 100-200 $\times 10^6$ taquizoítos. Una vez transcurrido el tiempo de secreción se eliminaron los parásitos mediante 3 centrifugaciones a 1,800 rpm a TA. El sobrenadante se consideró como los PES y fue conservado a -20 °C

hasta su uso. La obtención y manejo de los taquizoítos se realizó en condiciones de esterilidad y siguiendo las medidas de bioseguridad para el manejo de patógenos de clase II ⁴⁵.

6.4 Análisis bioinformático de antigenicidad

Para el análisis bioinformático de antigenicidad de las proteasas secretadas por *T. gondii* se utilizó el servidor Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) ⁴⁶, que se encuentra disponible online y contiene una base de datos con epítomos característicos para anticuerpos y células T en humanos y diferentes especies animales, en el contexto de enfermedades infecciosas. Estos los utiliza como referente para la búsqueda de epítomos potencialmente antigénicos a partir de la secuencia primaria de una proteína de interés, que puede ser proporcionada en formato FASTA o con el número de ID de las bases de datos NCBI ⁴⁷ o Uniprot ⁴⁸. Para realizar la predicción antigénica de epítomos lineales se seleccionó el método de Koloaskar and Tongoankar que toma en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los aa, así como su frecuencia de aparición en epítomos consenso, en base a lo cual asigna un valor de corte, por encima del cual los epítomos se consideran antigénicos ⁴⁹. Por otra parte, también con IEDB se realizó un análisis para conocer los péptidos de mayor accesibilidad de la proteína con el método Emini Surface, que utiliza una fórmula matemática basada en la escala de accesibilidad de superficie y devuelve un valor mayor o igual a 1 para péptidos accesibles en la estructura terciaria de la proteína y menor a 1 para los poco accesibles ⁵⁰. Posteriormente se realizó el análisis de predicción de epítomos para células T de la proteasa que resultó tener el mayor número de epítomos lineales y accesibles para linfocitos B. El análisis se realizó también con el servidor IEDB, empleando las herramientas de predicción de secuencias peptídicas con capacidad de unión a moléculas MHC-I y MHC-II, que pueden potencialmente ser reconocidos por el TCR de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y colaboradores (CD4+), respectivamente, provocando su activación.

6.5 Purificación de metaloproteasas por cromatografía de afinidad

La purificación de metaloproteasas de *T. gondii* se llevó a cabo en una columna de afinidad que contiene gelatina acoplada a perlas de sefarosa 4B (17095601 GE Healthcare Bio-Science). El acoplamiento de las metaloproteasas a la gelatina-sefarosa se realizó colocando 3 veces los PES con 5 mM de CaCl₂ (Sigma St. Louis, USA) en la columna a TA. Luego se colectó todo lo no acoplado en una única fracción denominada fracción no unida (NO). Con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de componentes adsorbidos inespecíficamente a la gelatina-sefarosa, se lavó la columna con buffer 1 (Tris-HCl 50 mM (Sigma Life Science, USA) pH:7.5 y CaCl₂ 5 mM) y luego con buffer 2 (Tris-HCl 50 mM pH: 7.5, NaCl 0.1 M y CaCl₂ 5 mM). Los lavados se realizaron con 3 mL del buffer correspondiente por 5 veces en cada caso. Las 5 fracciones de cada lavado se juntaron y se les denominó L1 (lavado con buffer 1) y L2 (lavado con buffer 2), respectivamente. Posteriormente, se procedió a eluir las metaloproteasas con buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH: 7.5, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM y DMSO al 5% (SIGMA-ALDRICH, France)) en un total de 5 fracciones de 3 mL cada una. A las fracciones colectadas en cada etapa del proceso de purificación se les realizó la lectura de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800, lo cual permitió graficar el cromatograma de todo el proceso y así determinar las fracciones correspondientes al pico de elución de las proteasas, que fueron dializadas inmediatamente.

6.6 Diálisis de las fracciones colectadas de la purificación

La diálisis de las fracciones eluidas se llevó a cabo en membranas Spectra/Por de tamaño de poro 6-8 KDa, las cuales fueron activadas en una solución 1 mM de EGTA (Sigma St. Louis, USA) a 60 °C por 5 minutos. Pasado ese tiempo y una vez las membranas se enfriaron, se cargaron las fracciones a dializar y se incubó en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 por 16-18 h en el agitador mecánico a 4 °C, con tres cambios sucesivos de solución a intervalos de 2 h cada uno.

Posteriormente las fracciones se almacenaron a -20 °C para su posterior precipitación.

6.7 Precipitación de las metaloproteasas por el método de metanol/cloroformo

La precipitación de las fracciones correspondientes al proceso de purificación se llevó a cabo por el método de metanol/cloroformo con el objetivo de concentrar la muestra para poder evaluar la presencia de metaloproteasas activas en las diferentes fracciones por zimografía y el patrón electroforético correspondiente en un gel SDS-PAGE de tinción con plata, ambos constituyen un control a lo largo del proceso de purificación. Por cada 1 mL de muestra se añadieron 4 mL de metanol (J.T Baker, Trinidad y Tobago), 1 mL de cloroformo (J.T Baker, México) y 3 mL de agua, respectivamente. Luego se centrifugó a 4,500 rpm por 10 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante hasta la fase donde se encontraban las proteínas precipitadas y se añadieron 3 mL de metanol por cada 1 mL de muestra inicial. Se volvió a centrifugar a 4,500 rpm por 10 minutos a 4 °C y se decantó prácticamente la totalidad del sobrenadante, dejando un volumen de alrededor de 500 µL que se colocó en un eppendorf de 1.5 mL, donde se centrifugó por última vez a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Finalmente se decantó todo el sobrenadante quedando sólo las proteínas precipitadas, que se conservaron a -20 °C hasta su uso.

6.8 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se cuantificó la concentración de proteínas totales de los PES y para cada etapa de la purificación por el método de Bradford. Para ello se construyó una curva de calibración de absorbancia vs concentración de BSA (Sigma Life Science, USA) de 0.05-0.1-0.2-0.3-0.4-0.5 µg/µL en PBS 1X y las muestras fueron diluidas 1/50 y 1/100 en PBS 1X. Tanto de la curva como de las muestras se agregaron 10 µL por pozo en una placa de ELISA de 96 pozos (Thermo-Scientific NUNC-MaxiSorp) por triplicado. Se añadieron después 200

μ L del reactivo de Bradford (BIO-RAD, USA) previamente diluido 1/5. Se incubó por 5 minutos en la oscuridad y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas MicroPlate Reader S80XR, BioRad. Los resultados obtenidos se procesaron en Microsoft Excell 2013.

6.9 Zimografía en gelatina

Se corrieron 10 μ g de proteínas de los PES y de cada una de las fracciones de la purificación en un gel de zimografía al 7.5% de acrilamida/bis acrilamida (BIO-RAD, China) y 0.1% de gelatina (BIO-RAD, USA). La corrida se realizó primero a 80 V hasta que la muestra sobrepasó el gel concentrador y luego a 120 V hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior de los cristales de electroforesis. Terminada la corrida, el gel se lavó con 50 mL de buffer de renaturalización (Tris HCl 100 mM, 2.5% de Tritón x-100 (SIGMA-ALDRICH, USA) y 1 mM CaCl₂) por 15 minutos a TA en agitación. Posteriormente, se le realizó un cambio del mismo buffer y se dejó lavando por 18 h a 4 °C en agitación. Concluido el tiempo, se retiró el buffer de renaturalización y se lavó 2 veces con 50 mL H₂O desionizada por 15 minutos en agitación a TA. Luego se agregaron 50 mL del Buffer de activación (Tris HCl 100 mM y 1 mM de CaCl₂) y se incubó a 37 °C por 24 h. Terminando el tiempo, se retiró el buffer y se dejó en 50 mL de la solución de tinción azul de coomassie (BIO-RAD, United Kingdom) por 2 h. Finalmente se destiñó el gel con 50 mL de solución de metanol, ácido acético (J.T Baker, México) y agua al 10%, 10% y 80% respectivamente, hasta que fueron evidentes bandas blancas en un fondo azul. El gel fue fotografiado en el fotodocumentador GelDoc BioRad.

6.10 Electroforesis SDS-PAGE

Se corrieron 10 μ g de proteínas de los PES y de cada una de las fracciones del proceso de purificación en un gel al 7.5 % de acrilamida-bis acrilamida en condiciones no reductoras (sin β -mercaptoetanol). Al igual que como se

describió para la zimografía, la corrida se realizó a 80 V hasta que el frente de corrida sobrepasara el gel concentrador y después a 120 V hasta que el frente de corrida alcanzara el borde inferior de los cristales de electroforesis. Terminada la corrida, el gel se lavó con 50 mL de H₂O desionizada por 15 min en agitación y luego se colocó en 25 mL de buffer de fijación (20 % de etanol (J.T Baker, México), 10% de ácido acético y 70% de agua), donde se mantuvo 20 min a TA y después a 4 °C hasta su tinción. Para la tinción se lavó 2 veces con 25 mL de H₂O desionizada por 5 min en agitación y se colocaron 25 mL de una solución de tiosulfato de sodio (J.T Baker, México) a 0.2 g/L por 1 minuto en agitación a TA. Posteriormente se lavó 2 veces con 25 mL de H₂O desionizada por 20 segundos y se colocó en una solución de nitrato de plata (J.T Baker, México) al 0.1% por 10 minutos. Seguidamente se colocaron 25 mL de la solución reveladora (3% de carbonato de sodio (J.T Baker, México) y 0.0004% de tiosulfato de sodio en agua), hasta que se visualizaron las bandas. Posteriormente se colocaron 25 mL de ácido cítrico (J.T Baker, México) 2.3 M durante 10 minutos y se lavó con H₂O desionizada en agitación durante 10 min.

6.11 Electroforesis 2D

Las proteínas contenidas en los PES cosechados de 1,000-2,000 x 10⁶ taquizoítos de *T. gondii*, se precipitaron por metanol-cloroformo. El precipitado se resuspendió en 200 µL de buffer de muestra 2D en condiciones no reductoras (urea 7 M (BIO-RAD, USA), tiourea 2 M (SIGMA-ALDRICH, USA), chaps 4 % (SIGMA Life Science, USA) y 20 µL de anfocinas (BIO-RAD, USA), se sonicó 4 veces por 15 seg a 40 Hz a intervalos de 1 min y luego se precipitó con acetona a -20 °C durante 16-18 h, a razón de 500 µL de acetona (J.T Baker, México) por cada 100 µL de muestra. La muestra se centrifugó a 13,200 rpm durante 15 min a 4 °C y se procedió con el proceso de desalado, que consistió en resuspender el precipitado en acetona fría y dejar reposar a 4 °C por 5 min, lo cual se repitió 10 veces. Posteriormente se realizó una última precipitación por metanol-cloroformo y el precipitado se resuspendió en buffer

para electroforesis 2D. Luego de cuantificar la proteína por el método de Bradford, el volumen correspondiente a 500 µg de proteína se llevó a un volumen final de 125 µl con amortiguador de rehidratación (urea 7 M, 2 M tiourea, 4 % chaps y azul de bromofenol (MERCK, Germany). La muestra se colocó en la placa de corrida y sobre esta la tira de isoelectroenfoque (BIO-RAD, USA), de forma que el gel estuviera en contacto con la muestra. Por último, se añadió 1 mL de aceite mineral sobre la tira y se inició la corrida de isoelectroenfoque para un rango de pH de 3-10 por 12 h de rehidratación pasiva a 20 °C en las siguientes condiciones: 50 V/20 min, 70 V/20 min, 250 V/20 min, 4,000V/2 h, 10,000V/h. Una vez terminado el isoelectroenfoque, las tiras se incubaron en amortiguador de equilibrio (Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, glicerol al 30 % (J.T Baker, México), SDS al 4% (SIGMA-ALDRICH,USA) y azul de bromofenol) por 25 min, luego se lavó con 2 mL de agua MiliQ y se colocó en un gel de poliacrilamida al 10% para correr la segunda dimensión a 120 V. Una vez concluida la corrida las proteínas de los geles se transfirieron a una membrana de NC (BIO-RAD, USA) para posteriormente llevar a cabo un WB, o se tiñeron con plata para su posterior procesamiento para espectrometría de masas.

6.12 Identificación de proteínas de PES inmunorreconocidas por Wb

Las proteínas de los PES separadas en geles de poliacrilamida al 10% fueron transferidas a membranas de NC por 70 min a 200 mA, se bloquearon con leche descremada al 6% (BD™, France) disuelta en TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 75 mM pH 8.0 y Tween 20 (SIGMA-ALDRICH,USA) al 0.1%) durante 2 horas a TA. Posteriormente, las tiras de membrana se incubaron con el suero de los pacientes por 16-18 h a 4 °C, a una dilución de 1/500. Previo a la incubación, los sueros se clarificaron mediante centrifugación a 5,000 rpm por 2 min a 4°C. Los sueros fueron proporcionados por el Departamento de parasitología del Instituto de Referencia Epidemiológica (INDRE), donde se tipificaron previamente como provenientes de pacientes seropositivos a IgM e

IgG frente a la toxoplasmosis, mediante los métodos de inmunofluorescencia indirecta y ELISA. Como control positivo (C+) se empleó un suero humano seropositivo a IgM e IgG contra *T. gondii* con dilución de trabajo conocida (1/500) y como control negativo (C-) un suero humano seronegativo a toxoplasmosis. Las membranas de NC se lavaron cinco veces con TBST por 5 min cada vez, y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-IgG humana 1:12000 (Invitogen, Zymed® antibodies, San Francisco CA) por una hora a TA. Pasado este tiempo se lavaron las membranas de NC las membranas con TBST 0.1 % y realizó la detección por quimioluminiscencia basada en la oxidación del luminol catalizado por HRP-peróxido de hidrogeno en condiciones alcalinas (ECL Western blot detection, GE Healthcare, UK). Las placas obtenidas se digitalizaron utilizando un foto-documentador (EZ Imager, BioRad, Hercules, CA, USA), mediante el programa Image™ Lab Software Versión 4.1 (BioRad, Hercules, CA, USA).

6.13 Identificación de proteínas de PES inmunogénicas por E-masas

Del patrón electroforético del gel de poliacrilamida 2D teñido con plata, se cortaron los spots que fueron inmunorreconocidos por el suero de pacientes con toxoplasmosis crónica por un WB 2D realizado en paralelo. Para llevar a cabo la identificación, las muestras fueron digeridas enzimáticamente ⁴⁷ y el concentrado de péptidos trípticos fue cargado en una precolumna Symmetry C18 trap V/M (Waters, Milford, MA): 180 µm × 20 mm, tamaño de poro de 100 Å, partícula de desalado de 5 µm en una fase móvil A (ácido fórmico (AF) al 0,1% en H₂O) y una fase móvil B (0.1% de FA en acetonitrilo (ACN)) bajo los gradientes isocráticos 99.9% para la fase móvil A y 0,1% para la fase móvil B, a un flujo de 5 µl/min durante 3 min. Luego los péptidos fueron cargados y separados en una columna HSS T3 (Waters): 75 µm × 150 mm, tamaño de poro 100 Å, tamaño de partícula 1.8 µm usando un UPLC ACQUITY M-Class (Waters) con las mismas fases móviles bajo los siguientes gradientes: 0 min 7% B, 121.49 min 40% B, 123.15 a 126.46 min 85% B y 129 a 130 min 7% B, a un flujo de 400 nL/min y 45 °C. Los datos espectrales fueron adquiridos en

un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (siglas en inglés ESI) y separación de movilidad iónica (siglas en inglés IMS) Synapt G2-Si (Waters), usando el enfoque de adquisición de datos independientes (siglas en inglés DIA) por el modo HDMS^E. La página de sintonización para la fuente de ionización se programó con los siguientes parámetros: 2.60 kV en el capilar de muestreo, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en la fuente de compensación, 70 ° C para la temperatura de la fuente, 0.6 bar para el gas nanoflujo, y 120 L/h para el flujo de gas de purga. Se adquirieron dos cromatogramas (cromatogramas de baja y alta energía) en modo positivo en un rango m/z 50-2000 con una velocidad de 0.5 escaneos/s. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, pero para obtener el cromatograma de alta energía los precursores iónicos se fragmentaron usando una energía de colisión rampa de 19-55 V. Los parámetros del flujo de trabajo incluían la tripsina como enzima de corte y la predicción de un sitio de escisión perdido en péptidos trípticos, carbamidometil (C) como una modificación fija y amidación (N terminal) y desamidación (N, Q), oxidación (M) y fosforilación (S, T, Y) como modificaciones variables: péptido automático y tolerancia de fragmentos y coincidencias de iones fragmentados mínimos por péptido, 2; mínima coincidencia de iones de fragmentos por proteína, 5; coincidencias mínimas de péptidos por proteína, 1; y una tasa de descubrimiento falsa (siglas en inglés FDR) \leq 4%. Todas las identificaciones tuvieron un porcentaje de \geq 95% de confiabilidad (Protein AutoCurate Green). Synapt G2-Si se calibró con [Glu1] -fibrinopéptido, $[M + 2H]^{2+} = 785.84261$ a ≤ 1.5 ppm. Los archivos crudos generados que contenían los espectros MS y MS/MS fueron deconvolucionados y comparados usando el servidor ProteinLynx Global (siglas en inglés PLGS) v 3.03 software⁵¹ (Waters) contra el reverso de la base de datos ToxoDB de *T. gondii* cepa GT1⁵². Esta caracterización se realizó en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica de LANSE-CINVESTAV.

7. Resultados

Los resultados se presentan en el orden que corresponde a los objetivos propuestos y todos los experimentos se realizaron como mínimo por duplicado, con excepción de aquellos que formaron parte del curso de los procesos de estandarización con la consecuente introducción de variables experimentales, donde la replicación del experimento se realizó sólo para las condiciones finales establecidas. Los PM de las bandas de proteína en los geles de electroforesis, zimografía y Wb se determinaron a partir de la construcción de una curva de calibración con ajuste lineal donde se graficaron los logaritmos del patrón de peso molecular (PM) vs el Rf: Rf es la relación entre la distancia de migración de la banda proteica (d) y la longitud de corrida total del gel (l) o sea la distancia desde el borde superior del gel hasta el frente de corrida. Luego se calcula el Rf de la proteína incógnita y se extrapola en la curva el log (PM).

7.1 Análisis bioinformático de antigenicidad de proteasas secretadas por *T. gondii*

Como primera aproximación para evaluar el potencial antigénico de proteasas secretadas por *T. gondii* se realizó un análisis *in silico* de predicción de epítomos para conocer el número de epítomos antigénicos lineales y accesibles para células B de las 19 proteasas secretadas por *T. gondii*, previamente identificadas en nuestro laboratorio ³⁹. Los resultados se muestran en la Tabla 1, donde se puede apreciar que 12 de las 19 proteasas analizadas al menos presentan 20 epítomos inmunogénicos para células B, y que a su vez cuentan con más de 10 epítomos accesibles en la estructura de la proteína.

Tabla 1: Epítomos antigénicos lineales y accesibles para células B de proteasas de PES de taquizoítos de *T. gondii* predichos con el servidor IEDB ⁴⁶.

Proteína	Familia	PM (KDa)	Longitud (# aa)	Epítomos Lineales	Epítomos Accesibles
Catepsina 1	C	79.233	733	27	14
Isoforma 2 de la proteasa putativa 39 ubiquitina específica	C	64.189	571	16	15
Catepsina L	C	47.55	422	15	11
Subunidad alfa de la Peptidasa Putativa M16	M	62.161	563	21	14
Toxolisina 4 (TLN4)	M	256.818	2435	78	53
Peptidasa M20D-Aminohidrolasa	M	55.116	514	18	14
Dominio Inactivo de la Peptidasa M16	M	148.873	1353	43	22
Amino peptidasa Putativa N	M	134.410	1219	43	32
Amino peptidasa Putativa n	M	108.775	970	41	24
Proteína M3 (familia Peptidasa)	M	75.441	667	22	17
Dominio Inactivo de la Peptidasa M16	M	142.637	1306	43	27
Proteína de la familia de Peptidasa M16	M	56.915	509	19	12
Proteína M3 (familia Peptidasa)	M	118.135	1094	41	31
Leucil Aminopeptidasa	M	83.188	781	28	17
Aspartil Aminopeptidasa	M	55.896	508	17	8
Proteasa de Romboide (ROM4)	S	72.354	665	19	14
Prolil-endopeptidasa	S	93.041	825	32	23
Serino-proteasa	S	102.78	960	36	21
Proteína de la familia Peptidasa_T1	T	27.908	260	10	7

Teniendo en cuenta que la toxolisina 4 (TLN 4) es la proteasa que presentó el mayor número de epítomos inmunogénicos predichos para la activación linfocitos B, con 78 epítomos lineales y 53 accesibles (Figura 1, Anexos I y II), nos interesó evaluar el potencial antigénico de esta proteína para células T (Tabla 2). El análisis se realizó con base a la afinidad de unión de secuencias peptídicas de la TLN 4 a los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) humano y murino, este último por ser el modelo de estudio. Se obtuvieron secuencias proteicas de elevada afinidad de unión ($IC_{50} < 50$ nM)

tanto para alelos de MHC-I como MHC-II en ambas especies, para todos los alelos analizados (Tabla 2).



Figura 1: Péptidos antigénicos lineales y accesibles en la secuencia primaria de la TLN

4. Las secuencias sombreadas en verde representan los péptidos antigénicos para células B y las subrayadas en rojo las accesibles. Las secuencias antigénicas y accesibles se determinaron con los métodos Koloaskar and Tongoankar ⁴⁹ y Emini Surface ⁵⁰ con el servidor

IEDB ⁴⁶, respectivamente. Encerrado en rectángulo azul se muestra un dominio conservado tipo insulina encontrado en el alineamiento múltiple de la TLN 4 con las especies *Homo sapiens* y *Mus musculus* con la herramienta BLAST-P del NCBI ⁵³, se señalan los aa que comprenden este dominio que son del 204 al 1375.

Tabla 2: Péptidos de la toxolisina 4 de *T. gondii* con capacidad de unión a MHC-I y MHC-II humano y murino* predichos con el servidor IEDB ⁴⁶.

MHC-I		MHC-II	
Alelo	No. Epítosos ^a	Alelo	No. Epítosos ^a
HLA-A*01:01	10	HLA-DRB1*01:01	20
HLA-B*07:02	42	H2-IAb	70
H-2-Db	16	H2-IAd	11
H-2-Dd	8	H2-IEd	6
H-2-Kb	9		
H-2-Kd	17		
H-2-Kk	12		
H-2-Ld	3		

^a Se muestra el número de epítosos peptídicos con elevada ($IC_{50} < 50$ nM) e intermedia (50 nM $< IC_{50} < 100$ nM) afinidad de unión para cada alelo MHC analizado, reportados por IEDB.

HLA-A*01:01 y HLA-B*07:02: alelos MHC-I de humano.

HLA-DRB1*01:01: alelos MHC-II de humano.

H-2-Db, H-2-Dd, H-2-Kb, H-2-Kd, H-2-Kk y H-2-Ld: alelos MHC-I murinos.

H2-IAb, H2-IAd y H2-IEd: alelos MHC-II murinos.

Para conocer que tan exclusiva es la TLN 4 de *T. gondii* y evitar fenómenos de tolerancia o reactividad cruzada en estudios inmunológicos futuros con esta proteína, se realizó un alineamiento múltiple de secuencia con las especies *Homo sapiens* (anexo III) y *Mus musculus* (anexo IV). Se encontró prácticamente un 100 % de cobertura e identidad de secuencia para la mayoría de las cepas de *T. gondii*. Sin embargo, en el caso de humano la mayor similitud se obtuvo con la cadena A de la enzima degradativa de insulina con valores de 26 % y 28.86 % respectivamente, y en ratón con la enzima

degradativa de insulina, también denominada insulinasas o proteasa de insulina, con 22 % y 31.76 % de cobertura de secuencia e identidad. La similitud encontrada entre la secuencia de TLN 4 y las enzimas degradativas de insulina en estas dos especies obedece a la coincidencia de residuos aminoacídicos en un dominio tipo insulinasas o peptidasa M 16 que abarca los aa 204 al 1375 de la TLN 4 y que da nombre a la familia de proteínas del mismo nombre (Figura 2A). La Figura 2 muestra el alineamiento de secuencia devuelto por la herramienta Blast P entre la TLN 4 (Query) y la cadena A de la enzima degradativa de la insulina humana (B) y la insulinasas murina (C) (Subject), respectivamente, donde se muestran las secuencias que comparten residuos aminoacídicos idénticos.



Figura 2: Alineamiento del dominio de secuencia conservado tipo insulinasas de TLN 4 de *T. gondii*. La alineación se hizo con la proteína degradativa de insulina humana (B) y con la proteína degradativa de insulina murina (C), obtenido por BLAST-P⁵³. (A): Dominios de secuencia conservados en la TLN 4: dominio insulinasas o peptidasa M 16 (aa: 204-1375); dominio tipo atropina (aa: 2004-2421) y dominio de la superfamilia de ADN polimerasa gamma 3 (aa: 1079-2207).

7.2 Estandarización de la purificación de metaloproteasas de *T. gondii* por cromatografía de afinidad

Con el fin de obtener una fracción enriquecida de metaloproteasas secretadas por *T. gondii*, se llevó a cabo el acoplamiento de 1 mg de PES de taquizoítos parasitarios obtenidos del lavado peritoneal de ratones BALB/c a una columna cuya matriz consistía en 1 mL de perlas sefarosa 4B acopladas a gelatina, teniendo en cuenta que la gelatina es un sustrato de las metaloproteasas. En un principio se establecieron como condiciones del proceso de purificación las siguientes (modificado de Wu Jiu-Lin *et. al.*, 2014) ⁵⁴:

- Acoplamiento de PES a la matriz: PES (obtenidos en PBS 1X), CaCl₂ 1 mM.
- Lavado 1: PBS 1X, CaCl₂ 1 mM.
- Lavado 2: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂ 1 mM, NaCl 0.5 M.
- Elución: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂, NaCl 1M, DMSO 5 %.

La Figura 3 muestra el cromatograma y la zimografía en gelatina correspondiente al proceso de purificación de las proteasas por cromatografía de afinidad a gelatina. Como se puede ver, el proceso permitió un claro enriquecimiento de la fracción de proteasas (Figura 3B, fracción eluida: "EL"), quedando muy poca actividad residual de las proteasas en las fracciones de los lavados. Esto, unido a la presencia de un pico de absorbancia a 280 nm en la primera fracción colectada de la elución (Figura 3A, EL), indica que como resultado de la purificación se logró un claro enriquecimiento de las proteasas en el producto final colectado. Sin embargo, se detectó que parte de las proteasas no fueron aisladas, ya que se perdieron en la fracción no unida (NO).

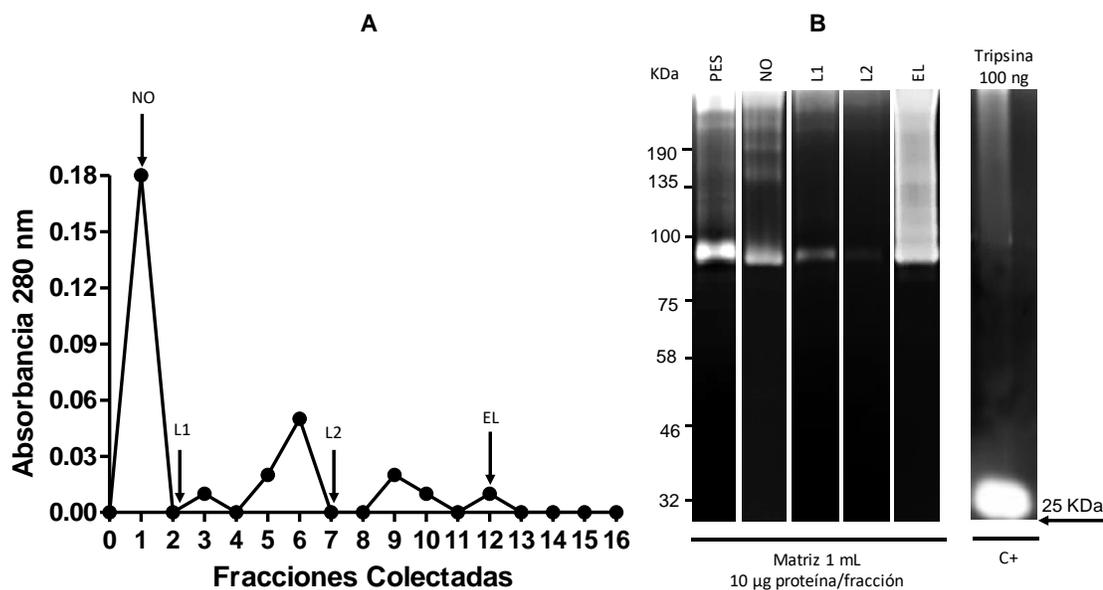


Figura 3: Purificación de metaloproteasas. Cromatograma (A) y perfil por zimografía (B) de la purificación de metaloproteasas de *T. gondii* en geles SDS-PAGE al 7.5% de acrilamida y 0.1% de gelatina. Cada carril corresponde a las fracciones de las diferentes etapas de la purificación: NO (proteínas no unidas a la matriz), L1 (primer lavado) L2 (segundo lavado) y EL (fracción eluída). Control positivo: 100 ng de tripsina.

De acuerdo con las proteasas que se perdieron en la fracción no unida (Figura 3B, NO), es posible que esto se deba a dos factores: a) que la cantidad de matriz empleada sea insuficiente para acoplar todas las metaloproteasas contenidas en los PES y b) que las condiciones de acoplamiento utilizadas no hayan sido óptimas.

Para determinar cuál era la causa que estaba afectando el acoplamiento de los PES a la matriz se decidió realizar un primer ensayo triplicando el volumen de matriz a emplear de 1 mL a 3 mL, colocando la misma cantidad de proteína de PES para su acoplamiento y que fue de 1 mg (Figura 4A). En paralelo, se realizó otra purificación utilizando los 3 mL de matriz y la misma cantidad de proteína a acoplar, pero variando el tiempo y la temperatura del acoplamiento: en lugar de 16-18 h a 4 °C, acoplar pasando los PES 3 veces por la columna a TA (Figura 4B). El resultado obtenido mostró que, aun triplicando el volumen

de matriz en la columna, continúa siendo evidente la presencia de proteasas activas en la fracción no unida a la matriz, por lo que la falta de matriz no parece ser la causa por la cual las proteasas no se estaban acoplando eficientemente a la gelatina. El cambio del tiempo y la temperatura de acoplamiento tampoco mejoraron la afinidad de unión, por lo que decidimos incrementar la concentración de CaCl_2 como cofactor de muchas enzimas, en la etapa de acoplamiento de las proteasas (presentes en los PES) a la columna de 1 mM a 5 mM. Teniendo en cuenta que el Ca^{2+} es crítico para la activación de las metaloproteasas, al permitir la correcta conformación del centro activo para la catálisis, en consecuencia, se esperaría una mejora en la interacción del sustrato con las respectivas proteasas.

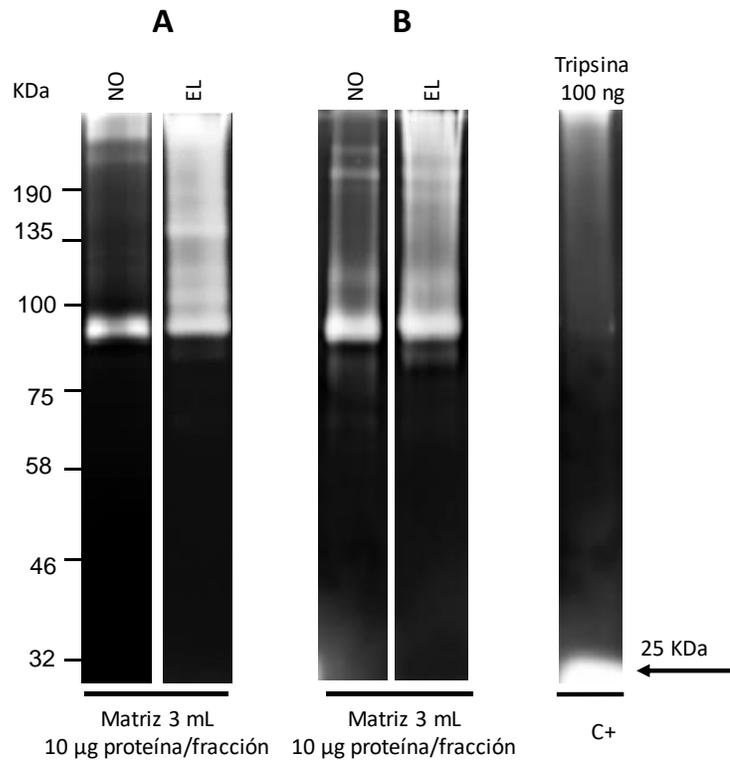


Figura 4: Perfil proteolítico de fracciones purificadas por cromatografía de afinidad. Se muestra el perfil electroforético de la fracción no unida (NO) y de elución (EL) de la purificación de metaloproteasas de *T. gondii* con diferentes volúmenes de matriz. Se muestran las zimografías en gels SDS-PAGE 7.5% de acrilamida y 0.1% de gelatina de la purificación de metaloproteasas realizada con 1mL de matriz (A) en comparación con 3 mL de matriz (B). Control positivo: Tripsina 100 ng.

Al colocar 5 mM de CaCl_2 en los PES previo al acoplamiento, fue evidente la formación inmediata de un precipitado blanco, que concluimos se debió a la formación $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a causa de la presencia de iones $(\text{PO}_4)^{3-}$ en el PBS y que es insoluble. En ese sentido, se decidió cambiar la solución amortiguadora en la cual se obtienen los PES por una solución salina con iguales concentraciones de NaCl y KCl que el PBS 1X, pero sin los fosfatos. Se probaron dos soluciones candidatas: Tris-salina y Hepes Salina, en ambos casos se monitoreó la viabilidad de los taquizoítos cada 1 h hora durante las 4 h de secreción por microscopía de contraste de fases en el microscopio Zeiss Axioskop 2 mot plus (Figura 5).

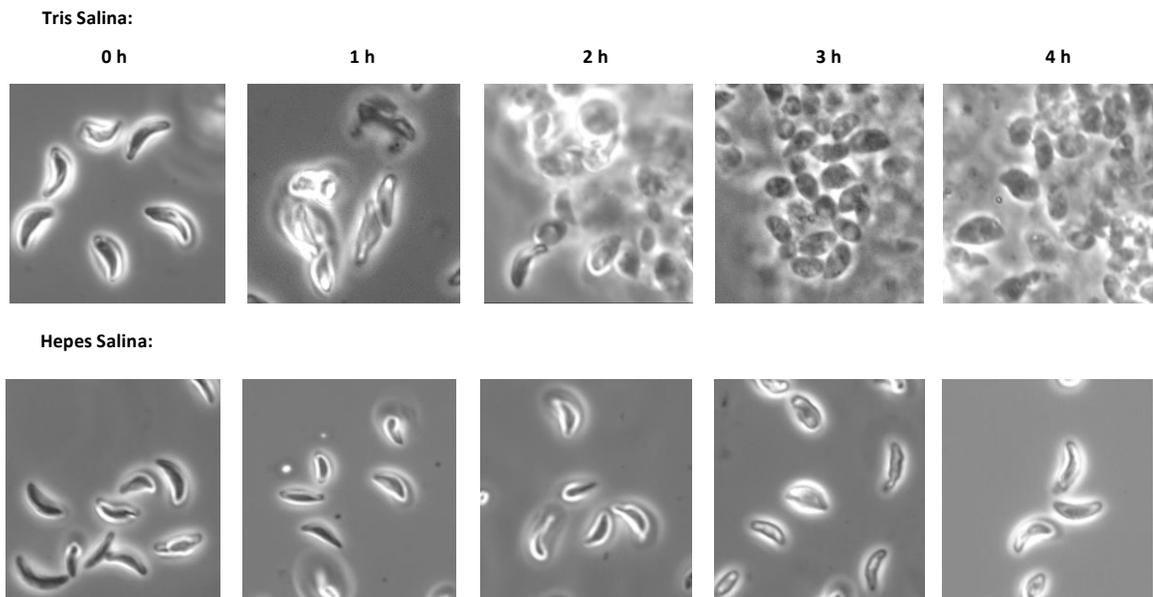


Figura 5: Efecto de amortiguadores en la integridad de los taquizoítos. Taquizoítos de *T. gondii* a las 1 - 4 h de secreción en Tris-salina (panel superior) y Hepes-salina (panel inferior). Control: taquizoítos a las 0 h de secreción. Escala = 5 μm .

En Hepes-salina hasta las 4 h de secreción los parásitos permanecieron morfológicamente similares al control hasta 4 h después del aislamiento de los ratones infectados. En contraste, en la solución de Tris-salina, desde la primera hora de secreción se comenzaron a aglomerar los taquizoítos,

encontrándose estos vacuolizados, agregados y deformes a las 4 h de incubación. Con base en esto, se decidió cosechar los PES a partir de parásitos mantenidos en Hepes-salina, modificando entonces las etapas de la purificación como sigue:

- Acoplamiento de PES a la matriz: PES (obtenidos en Hepes-salina), CaCl_2 5 mM.
- Lavado 1: Tris-HCl 1X, CaCl_2 5 mM.
- Lavado 2: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl_2 5 mM, NaCl 0.1 M.
- Elución: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl_2 , NaCl 1M, DMSO 5 %.

La Figura 4 muestra los resultados de la purificación bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

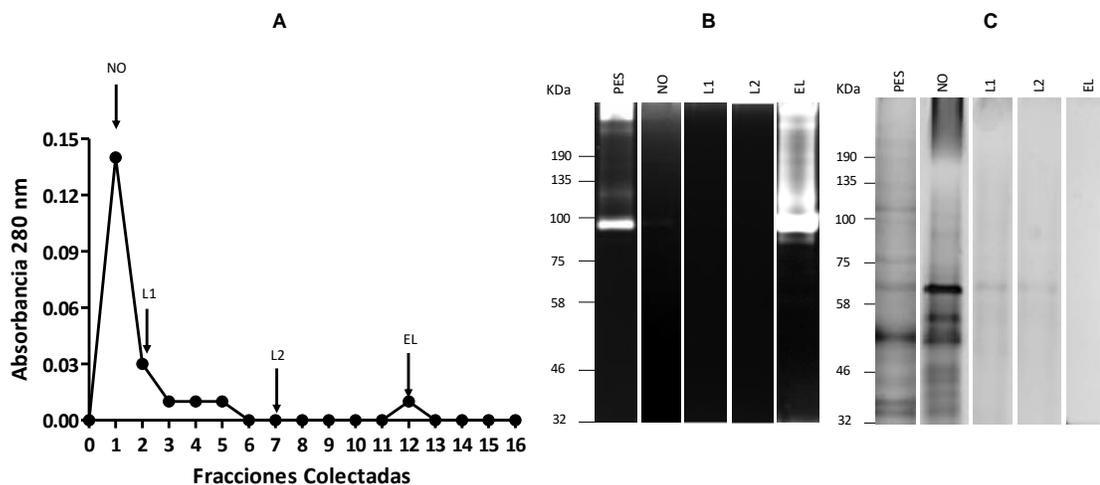


Figura 6: Resultados finales de la purificación de metaloproteasas secretadas por *T. gondii* por cromatografía de afinidad en columna de Sepharose 4B acoplada a gelatina. (A): cromatograma tipo de la purificación. (B): perfil proteolítico de las fracciones colectadas en las diferentes etapas del proceso por zimografía en geles SDS-PAGE al 7.5% de acrilamida y 0.1% de gelatina. (C): Perfil electroforético de las fracciones en gel SDS-PAGE al 7.5% de acrilamida teñido con plata. PES (productos de excreción-secreción), NO (fracción no unida), L1 (lavado 1), L2 (lavado 2) y EL (proteína eluída).

En el cromatograma (Figura 6A) se obtuvo un pico de absorbancia en la fracción colectada como resultado de la elución (EL). Esta fracción presentó una clara actividad proteolítica por zimografía (Figura 6B, EL). Es de notar que la actividad proteolítica de dicha muestra se encuentra enriquecida respecto a la de los PES de partida, lo que indica que esta fracción fue enriquecida con las metaloproteasas contenidas en los PES. Además, en el resto de las fracciones de la cromatografía: NO, L1 y L2, la presencia de actividad proteolítica es prácticamente nula, lo cual indicó que bajo las nuevas condiciones establecidas se logró incrementar la afinidad de unión de las metaloproteasas a la matriz y ya no se perdieron proteasas en la fracción no unida. El perfil electroforético de las diferentes fracciones teñidas con nitrato de plata (Figura 6C) presentó una disminución en el número de bandas en la medida que se avanza en el proceso de purificación, respecto a los PES de partida. Desafortunadamente, y no obstante al enriquecimiento de las proteasas, no se pudieron detectar bandas de proteínas en el perfil electroforético del purificado (Figura 6C), y tampoco se pudieron cuantificar las proteínas de la fracción purificada por los métodos de Bradford o Lowry, lo cual indicó la muy baja concentración de estas proteasas. Esta incapacidad no permitió calcular la eficiencia de la purificación. Debido a este muy bajo rendimiento, consideramos que lo más conveniente será obtener las proteasas de interés por vía recombinante con el objetivo de contar con la cantidad suficiente que nos permita su caracterización y aplicación como posibles inmunógenos inmunoprotectores.

7.3 Inmunorreconocimiento de proteínas inmunogénicas en PES por Wb

Teniendo en cuenta que la cantidad de proteína recuperada producto de la purificación fue insuficiente para determinar las proteasas inmunorreconocidas por sueros de pacientes con toxoplasmosis por Wb, la evaluación se realizó sobre los PES y no sobre la fracción purificada. La figura 7 muestra el patrón de proteínas inmunorreconocidas por anticuerpos IgG de cada paciente, 4 de

las cuales resultaron comunes para todos los sueros evaluados, excepto para el suero de una persona sin toxoplasmosis (C-), lo que indica ausencia de reactividad cruzada y que, por lo tanto, las proteínas inmunorreconocidas son específicas de *T. gondii*. La presencia de bandas que fueron reconocidas de manera diferencial para ciertos sueros sugiere que la respuesta inmune puede ser afectada por factores epigenéticos de cada individuo o por la cepa de *Toxoplasma* con la que se infectó.

Aunque inicialmente se pretendía realizar la evaluación de los sueros separando por la etapa de infección en que se encontraba cada paciente, esto no fue posible debido a que no contamos con la tipificación de los sueros basada en el tiempo post-infección y el título de anticuerpos IgM e IgG para cada uno.

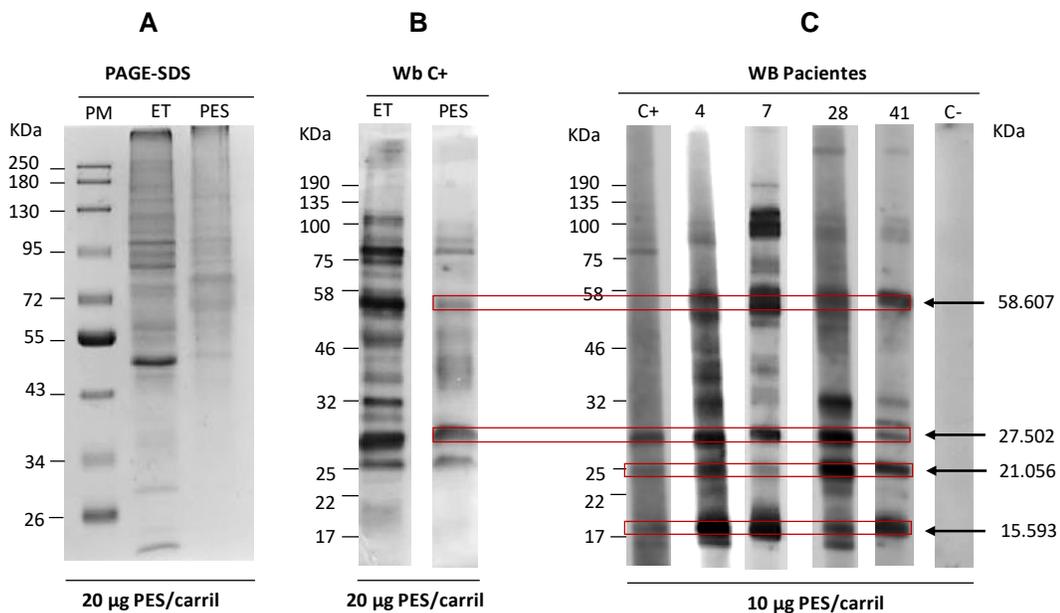


Figura 7: Identificación de proteínas inmunorreconocidas por sueros de pacientes con toxoplasmosis por Wb. (A): patrón electroforético por SDS-PAGE al 10% de acrilamida de 20 µg de proteínas de ET y PES teñido con azul de coomassie. (B): patrón de inmunorreconocimiento por Wb de proteínas de ET y PES por suero humano seropositivo a toxoplasmosis, empleado como C+ del ensayo. (C): proteínas inmunorreconocidas por sueros de pacientes: 4, 7, 28 y 41 seropositivos a IgG contra *T. gondii*. C-: suero humano seronegativo a toxoplasmosis. En los rectángulos rojos se muestran las bandas correspondientes a las

proteínas que resultaron inmunogénicas en todos los pacientes evaluados, con su respectivo PM a la derecha.

Se realizaron Wb 2D con el objetivo evaluar el inmunorreconocimiento con los sueros (Figura 8), corridos en paralelo con geles de sustrato (Figura 9) para posteriormente llevar a cabo la identificación de los spots de proteínas inmunorreconocidas por E-masas. No se realizó la identificación en geles unidimensionales debido a que en el análisis de E-masas en bandas de este tipo de geles normalmente se identifican un gran número de proteínas por banda y, por lo tanto, sesga más la posibilidad de identificar cual proteína es la verdaderamente reconocida por los sueros de los pacientes con toxoplasmosis. Los resultados obtenidos muestran spots por Wb 2D (Figura 9A) cuyo PM se corresponde con algunas de las bandas comunes a todos los sueros de pacientes en el gel unidimensional (Figuras 7 y 8), probablemente no se aprecian todas debido a que es necesario colocar más proteína para el gel 2D. Por otra parte, los spots inmunogénicos se pudieron corresponder con bandas de geles SDS-PAGE teñidas con tinción nitrato de plata (Figura 9C). Estos spots inmunogénicos fueron cortados para su posterior identificación por E-masas. La zimografía 2D (Figura 9B) permitió visualizar dos spots de proteínas que presentaron actividad proteolítica de PM 90.0 y 58.6, que se correspondieron con spots inmunorreconocidos por Wb (Figura 9 A), los cuales podrían corresponder a las proteasas: serinoproteasa prolil-endopeptidasa de 93.041 KDa, la metaloproteasa de la familia peptidasa M16 de 56.915 KDa, la metaloproteasa peptidasa M20D-aminohidrolasa de 55.116 KDa y la metaloproteasa aspartil aminopeptidasa de 55.896) (Tabla 1). Es de notar que, aunque el PM de la prolil-endopeptidasa corresponde con la del spot 1 de la zimografía 2D (Figura 9B), su PI no (Tabla 1). Esto creemos puede deberse a que los geles realizados para Wb, tinción con nitrato de plata y zimografía 2D (Figura 9) se hicieron en condiciones nativas, por lo que cabe la posibilidad de asociaciones entre proteínas y que migren juntas, lo que puede modificar las propiedades físico químicas observadas experimentalmente para algunas de las proteínas.

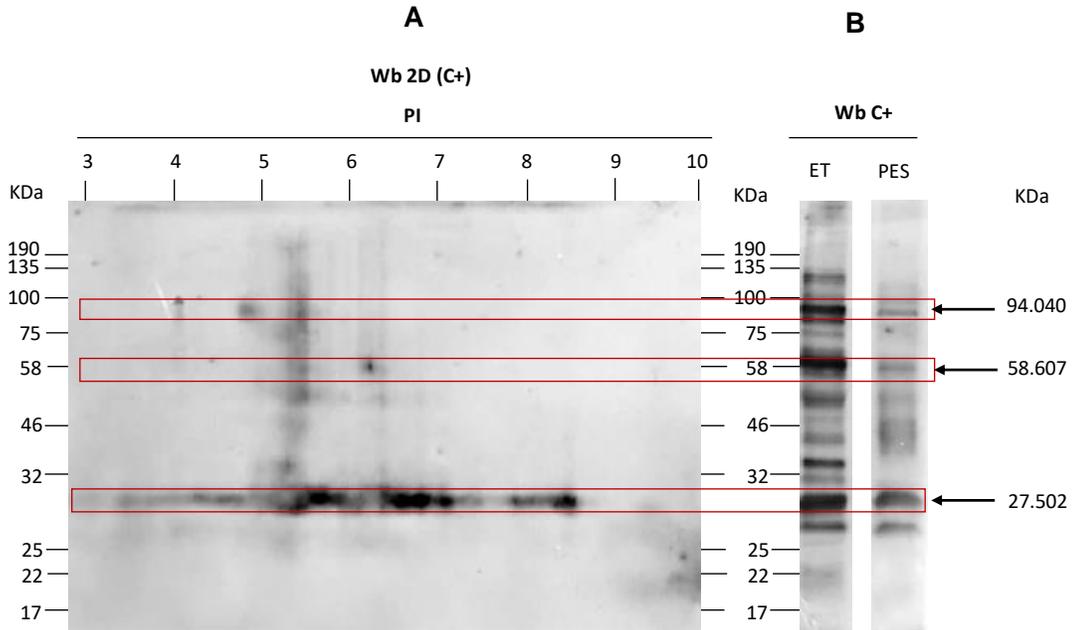


Figura 8: Inmunorreactividad de proteínas de PES por Wb 2D. Se muestra el patrón de spots correspondiente a las proteínas inumunorreconocidas por el suero C+ para toxoplasmosis crónica por Wb 2D (A), comparado con el patrón obtenido para el mismo suero, pero por Wb unidimensional (B).

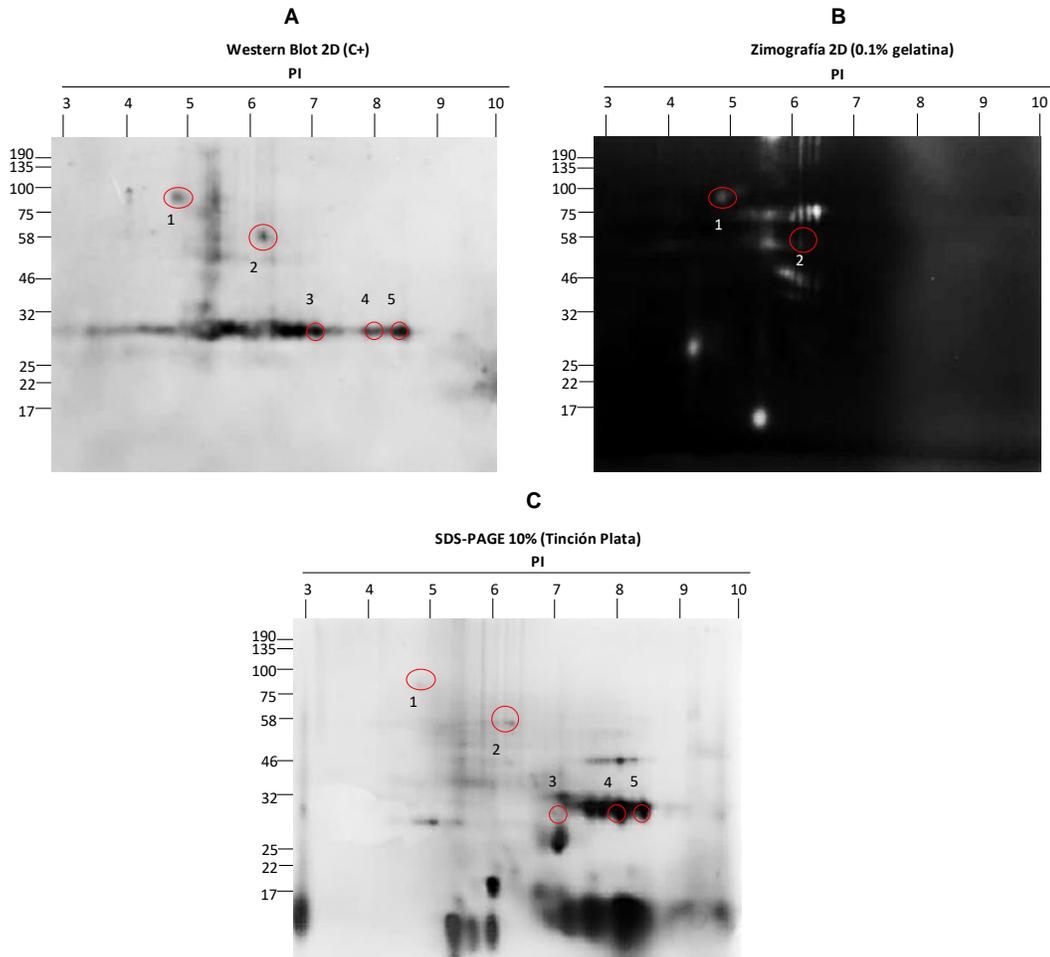


Figura 9: Inmunorreconocimiento de proteínas de PES por Wb 2D y perfil proteolítico por zimografía 2D. Se muestra el patrón de spots correspondiente a las proteínas inmunorreconocidas por el suero C+ para toxoplasmosis crónica por Wb 2D (A), el patrón proteolítico por zimografía 2D (B) y el patrón electroforético en gel SDS-PAGE 2D al 10 % de acrilamida teñido con nitrato de plata (C).

7.4 Identificación de proteínas inmunogénicas de PES por E- masas

Con el objetivo de identificar las proteínas de PES que fueron inmunorreconocidas por los sueros de los pacientes, se realizó la identificación por E-masas de los spots que resultaron inmunogénicos por Wb 2D. La tabla 3 muestra las proteínas identificadas para cada spot con más de un 95 % de confianza y que contuvieron al menos un péptido único. Se presentan algunos datos de interés como el código de acceso a la base de datos ToxoDB, contra

la cual se realizó el análisis de masas, el PM, PI y localización celular y con sus correspondientes valores de score, péptidos emparejados (PE) y cobertura de secuencia (CS), obtenidos directamente del análisis.

Se identificaron un total de 21 proteínas: tres proteínas de choque térmico (HSP 70, HSP 90 y HSP 90 putativa), cuatro proteínas implicadas en el metabolismo de la glucólisis (piruvato cinasa, GAPDH 1, enolasa 1 y enolasa 2), dos proteínas de CK (actina y actina ACT1), una proteína con motivo de reconocimiento a RNA o ribonucleoproteína (RNP), el factor de elongación de la traducción putativo eucariótico eIF-5, dos proteínas de organelos secretores (MIC 2 Y GRA 2), una proteína de la familia fosforilasa con actividad fosforilasa de nucleótidos de purina trifosfatados, una proteína putativa de la familia Hit implicada en la regulación del ciclo celular, la proteína de andamiaje DJ-1, la proteína precursora de ciclofilina (enzima con actividad peptidil-propil-isomerasa implicada en el plegamiento de proteínas), la peroxirredoxina 3 (PRX3) que interviene en la homeostasis redox en la mitocondria, la proteína de superficie la SRS29B o SAG -1, una histona acetiltransferasa de la familia con dominio repetido WD y dos proteínas hipotéticas, una de 35.6 y 183.5 KDa. El alineamiento múltiple de secuencia realizado para ambas proteínas hipotéticas primero contra todos los organismos de la base de datos, y luego excluyendo a *T. gondii*, con la herramienta BLAST-P del NCBI, arrojó un máximo de homología y cobertura de secuencia de 81% y 100% con el factor 1 de asociación mitocondrial de *T. gondii* para la proteína hipotética de 35.6 KDa. Con el resto de los organismos no se obtuvieron valores de similitud considerables, siendo los mayores con el también protozoo Apicomplexa *P. falciparum*. Para la proteína hipotética de 183.5 KDa se obtuvo prácticamente un 100% de cobertura y homología de secuencia con la misma proteína para diferentes cepas de *T. gondii*, sin embargo, al excluir este organismo sólo se obtuvieron como máximo un 9 % y 28.82 % de cobertura y homología de secuencia, con el citrocomo p450 del hongo *Diplodia corticola*.

Tabla 3: Identificación por Espectrometría de masas de proteínas de PES de *T. gondii* inmunogénicas por Wb.

No. Spot	Proteína	No. Acceso	PM (KDa)	PI	Localización* subcelular	PE	Score	CS (%)
1	MIC 2	TGGT1_201780	82.619	4.45	micronemas	8	370.0023	9.49
	HSP70	TGGT1_273760	72.292	4.82	citoplasma y mitocondrias	6	26.6241	9.75
	HSP90	TGGT1_288380	81.932	4.67	Núcleo y citoplasma	5	25.609	5.93
2	Actina	TGGT1_411760	32.058	5.95	citoesqueleto	6	251.1746	19.16
	RNP	TGGT1_236540	53.017	6.37	núcleo	6	179.973	12.99
	Enolasa 2	TGGT1_268850	52.113	6.84	citoplasma	3	140.8638	9.47
	HSP90	TGGT1_288380	81.932	4.67	Núcleo y citoplasma	4	67.2775	6.36
	HSP90 Putativa	TGGT1_244560	97.553	4.68	RE	5	61.094	6.68
	Piruvato Cinasa	TGGT1_256760	57.529	6.36	citoplasma	5	55.4486	8.29
	Actin ACT1	TGGT1_209030	41.907	4.81	citoesqueleto	4	53.7034	14.89
	HSP70	TGGT1_273760	72.292	4.82	citoplasma y mitocondrias	4	37.8057	8.4
GAPDH1	TGGT1_289690	53.339	8.41	citoplasma	3	27.7545	4.91	
3	Proteína de la familia fosforilasa	TGGT1_310640	33.042	7.12	citoplasma	3	502.8798	13.53
	GAPDH1	TGGT1_289690	53.339	8.41	citoplasma	5	347.8665	10.63
	GRA2	TGGT1_227620	19.842	9.71	gránulos densos	3	168.3858	15.68
	Proteína putativa de la familia Hit	TGGT1_243580	30.515	10.16	mitocondria y núcleo	4	104.0536	21.01
	eIF-5A putativo	TGGT1_251810	17.467	5.03	citoplasma	2	85.8439	16.15
	Proteína hipotética	TGGT1_220950	35.619	4.92	-	1	80.9447	4.49
	Proteína DJ-1	TGGT1_214290	27.904	9.32	citoplasma	1	61.415	6.25
	Precursor de la ciclofilina	TGGT1_205700	38.193	8.86	núcleo	4	46.2055	5.17
	PRX3	TGGT1_230410	30.462	9.01	mitocondria	2	43.8977	3.18
Enolasa 1	TGGT1_268860	48.341	6.28	citoplasma	1	40.1428	4.05	
4	SAG-1	TGGT1_233460	34.828	8.08	MP	4	191.6379	15.48
	GRA2	TGGT1_227620	19.842	9.71	Gránulos densos	2	164.2637	11.89
	Proteína hipotética	TGGT1_205190	183.533	8.18	-	11	31.3772	5.95
5	GRA2	TGGT1_227620	19.842	9.71	Gránulos densos	3	179.4478	15.68

	Secuencia SRS29B relacionada con SAG	TGGT1_233460	34.828	8.08	MP	2	95.908	7.44
	Proteína con dominio repetido WD	TGGT1_265205	163.414	5.41	núcleo	9	19.0704	0.76

* La localización subcelular se realizó con la bases de datos ToxoDB⁵² y UniprotKB⁴⁸ y el servidor DeepLoc 1.0⁵⁵

RE: retículo endoplasmático, MP: membrana plasmática

En el análisis proteómico realizado, no se detectaron proteasas, muy probablemente porque la cantidad de proteasas fue tan baja en los PES que no fue posible detectarlas. Lo interesante es que no obstante a la aparente ausencia de proteasas, fue evidente la presencia de sus actividades detectadas en zimografía 2D (Figura 9B). Lo anterior nos sugiere que son enzimas muy activas que aún en muy bajas concentraciones tienen una gran capacidad para degradar de manera evidente los sustratos embebidos en los sistemas de zimografía. Esto podría tener relevancia en el sentido que cuando un parásito migra a través de los epitelios y endotelios, solo requeriría liberar proteasas en las cantidades mínimas necesarias para su apertura y trans migración paracelular, sin necesidad de que estén presentes grandes cantidades de estas moléculas.

8. Discusión

El éxito biológico de la infección por *T. gondii* en un hospedero implica la diseminación parasitaria a órganos distantes del sitio primario de infección, con el consecuente establecimiento de la infección crónica y latente. El parásito lo logra gracias a su alta capacidad de transmigración de epitelios y endotelios, atravesando así barreras funcionales y estructurales como la barrera hematoencefálica, la barrera hemato-retiniana y la placenta en el caso de las embarazadas ^{19,56}. Además, *T. gondii* puede emplear células hospederas con capacidades móviles como las propias células del sistema inmune como vehículos para lograr la accesibilidad a órganos distantes ⁵⁷. En todos los casos, el parásito debe desarrollar mecanismos que le permitan establecer y mantener la infección en el ambiente hostil que presupone la presencia de múltiples mecanismos de defensa inmunológicos en el hospedero, para impedir la adherencia, colonización y crecimiento de microorganismos patógenos.

Hasta la fecha no se ha dilucidado el mecanismo molecular por el cual *T. gondii* logra atravesar los diferentes epitelios del hospedero, ni tampoco los mecanismos de reconocimiento celular y atracción quimiotáctica que determinan la dirección de su migración y diseminación tisular.

Estudios realizados durante la última década en otros protozoos parásitos han arrojado nuevos indicios sobre la participación de proteasas como posibles moléculas involucradas en diseminación. Por ejemplo, TvCP39, una CP de *T. vaginalis* participa en la degradación de distintos tipos de colágeno de la matriz extracelular, hemoglobina (Hb) e inmunoglobulinas (Ig), por lo que se ha relacionado con diseminación y con la evasión de la respuesta inmune ³⁷. Por otro lado, un aumento en la expresión del gen que codifica para la CP EhCP5 de *E. histolytica* incrementa la virulencia, pues se favorece la ruptura de la capa de mucina en su dominio carboxilo-terminal, facilitando así la invasión ⁵⁸. En el caso *Trypanosoma cruzi*, causante de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, en el 2018 Bivona E. A. *et. al.*, ³⁶ propusieron a la

Tc80, una prolil-oligopeptidasa de 80 KDa secretada por promastigotes sanguíneos extracelulares que degrada los principales componentes de la matriz extracelular como colágeno y fibronectina, como un nuevo inmunógeno para el desarrollo de una vacuna mono o multicomponente contra la infección, luego de demostrar que la inhibición selectiva de la proteasa bloqueó la infección parasitaria *in vitro* e indujo una respuesta inmune específica en ratones en quienes confirió inmunoprotección.

En estudios de microscopía confocal, utilizando marcadores fluorescentes para actina filamentosa realizados en nuestro laboratorio, y ensayos de microscopía se observó la pérdida de continuidad y apertura de monocapa de células MDCK expuestas a PES parasitarios, con reordenamiento de actina filamentosa intercelular ³⁹. Otros estudios realizados por microscopía electrónica de barrido (MEB) corroboraron esta observación, pues mostraron la separación celular y adicionalmente se encontró la pérdida de las microvellosidades de la cara apical de las células afectadas. Estos efectos fueron inhibidos al tratar los PES con inhibidores de proteasas como 1,10 Fenantrolina y PMSF, inhibidores de MP y CP, respectivamente ³⁹. Estos experimentos sugirieron que fueron las proteasas presentes en PES, las responsables de las modificaciones observadas, por lo que el paso siguiente en dicha investigación fue su identificación por E-masas. Se identificaron 19 proteasas de las cuales 12 fueron MP, 3 CP, 3 SP y 1 TP. Estos resultados, aunados al conocimiento que se tiene del papel de las proteasas en microorganismos patógenos en general, y protozoos parásitos en particular ⁵⁹, sugiere la posible implicación de las proteasas de *T. gondii* en diseminación tisular. De ser así, el poder neutralizarlas sería una buena estrategia para impedir su acción sobre las uniones intercelulares y con ello, la diseminación parasitaria.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio se trabajó en la búsqueda de proteasas parasitarias con potencial inmunogénico, pues consideramos que constituye una atractiva estrategia para realizar estudios de inmunoprotección. En primera instancia se realizó la predicción de epítomos

antigénicos y accesibles para células B de todas las metaloproteasas identificadas previamente por espectrometría de masas. Todas las proteasas analizadas presentaron epítomos potencialmente antigénicos y accesibles para la activación de anticuerpos, con un mínimo de 10 y 7 epítomos, respectivamente (Tabla 1). Es necesario destacar, que si bien al ser *T. gondii* un patógeno intracelular, la respuesta protagónica en el control de la infección sería la del tipo Th1, es decir la respuesta inmune celular. Sin embargo la presencia de anticuerpos toma relevancia cuando estos podrían destruir a los parásitos y controlar de la infección al reconocer al patógeno en su fase extracelular, es decir, cuando lisa las células y sale al medio extracelular para infectar otras células y diseminarse a los tejidos ⁶⁰.

De todas las proteasas analizadas, la TLN 4 fue la que presentó el mayor número de epítomos antigénicos y accesibles para células B, con 78 y 53 epítomos, respectivamente y un total de 10 secuencias que son tanto inmunogénicas como accesibles (Figura 1). Este resultado era esperado debido a que la TLN 4 es la proteasa con mayor peso molecular de todas las analizadas, por lo que debería contener un mayor número de sitios capaces de activar linfocitos B y, en consecuencia, anticuerpos. En el análisis de predicción de epítomos para células T de esta proteasa para los alelos más abundantes de MHC-I de humano y ratón (Tabla 2), se encontraron epítomos con una elevada afinidad de unión para todos los alelos analizados ($IC_{50} < 50$ nM). Además, el alineamiento múltiple de secuencia de esta proteína mostró que es específica de las especies de *Toxoplasma*, y que en humano y ratón sólo comparte similitud de secuencia con proteínas de la familia peptidasa M16 como las enzimas degradativas de insulina, que contienen un dominio de secuencia tipo insulinasa conservado ⁶¹. No obstante, ni el porcentaje de cobertura ni el de identidad de secuencia con proteínas de estos dos organismos fue superior al 45 %, valor por encima del cual se considera que hay una homología de secuencia importante. Estos resultados sugieren que, en principio, la TLN 4 podría ser un blanco de estudio para tratar de inducir una respuesta inmune que controle la diseminación de *T. gondii* a través del

hospedero. De todos modos, debe considerarse escindir la secuencia correspondiente al dominio insulinas con el fin de evitar reacciones de tolerancia o reactividad cruzada en estudios futuros.

Teniendo en cuenta que los métodos bioinformáticos, aunque son muy utilizados en la actualidad y cada vez más certeros, hasta el momento sólo constituyen herramientas de predicción, en este sentido, se realizaron estudios experimentales de laboratorio para identificar proteasas inmunogénicas parasitarias. Para ello se trabajó en la estandarización de un método de purificación de metaloproteasas parasitarias por cromatografía de afinidad a partir de modificaciones realizadas a un protocolo reportado para la purificación de metaloproteasas de músculo esquelético del pez carpa ⁵⁴. Como parte del proceso de estandarización se probaron diferentes condiciones para la etapa de acoplamiento de los PES a la matriz sefarosa acoplada a gelatina, pues en un inicio nos enfrentamos a la pérdida de proteasas en la fracción no unida a la columna (Figura 3). Después de realizar cambios en el incremento del volumen de matriz a utilizar, en el tiempo y la temperatura de acoplamiento sin tener éxito (figura 4), decidimos incrementar la concentración de CaCl_2 presente en la solución de recuperación de los PES previo al acoplamiento, de 1 mM a 5 mM. Esto provocó la aparición de un precipitado blanco que consideramos se debió a la formación y precipitación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a causa de la presencia de iones $(\text{PO}_4)^{3-}$ en el PBS. El $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ es una sal insoluble en agua, cuya formación y precipitación impidió que el Ca^{2+} añadido a los PES se canalizara completamente a activar las metaloproteasas, en lugar de esto una parte importante se estaba precipitando. En consecuencia, se decidió entonces cambiar la solución amortiguadora en la cual obtener los PES por Tris-Salina, sin embargo, al observar que los taquizoítos desde 1 h de secreción se aglomeraron y a las 4 h estaban además vacuolados (Figura 5, panel superior), ambos signos de afectación parasitaria, se decidió probar en Hapes-salina, donde los parásitos hasta las 4 h de secreción permanecieron igual al control. La explicación que sugerimos para este fenómeno radica en la diferencia de pKa entre los

amortiguadores de ambas soluciones, siendo de 8.08 para Tris-HCl y 7.55 para Hepes a 25 °C, hace que espontáneamente la solución tienda a desplazar el equilibrio ácido base hasta llegar a la zona de pH de máximo tamponamiento, que es el pKa. A partir de esto decidimos realizar el proceso de obtención y secreción de los taquizoítos en Hepes-salina, por tener un valor de pKa cercano al valor de pH deseado del buffer de secreción, en el cual los parásitos permanecen viables, que es 7.2. Finalmente se logró incrementar la eficiencia de acoplamiento de las metaloproteasas a la matriz y obtener un método de purificación que indicó la presencia de actividad proteolítica enriquecida en la fracción eluída, respecto a las PES de partida y con ausencia de actividad enzimática en la fracción de proteínas no unidas a la columna. No obstante, la cantidad de proteína recuperada fue insuficiente para poder visualizar las bandas por geles SDS-PAGE y llevar a cabo la evaluación de sueros de pacientes infectados con *T. gondii* sobre la fracción enriquecida de proteasas por Wb, con el fin de identificar proteasas inmunorreconocidas. Tampoco fue posible cuantificarla por Bradford y Lowry para así determinar la eficiencia de la purificación. A partir de estos resultados consideramos que la concentración de proteasas presentes en PES, al menos como resultado de la secreción *in vitro* es tan baja, que sólo se puede analizar su presencia evaluando su actividad, por tanto, si se desea continuar con este proyecto y llevar a cabo los estudios inmunológicos en el futuro, lo más conveniente será obtener las proteínas por vía recombinante.

Debido a que no fue posible realizar la identificación de proteasas inmunorreconocidas por los sueros de los pacientes sobre la fracción purificada, se decidió realizar la evaluación sobre PES por Wb. Se evaluó el suero de 5 pacientes, incluyendo el C+. Se obtuvieron un total de 4 proteínas inmunorreconocidas comunes a todos los pacientes evaluados con PM de: 58.6, 27.0, 21.0 y 15.5 KDa. En la evaluación del inmunorreconocimiento por Wb 2D con el suero C+ se identificaron 5 spots inmunogénicos que a su vez correspondieron con spots generados por SDS-PAGE de tinción con plata, y dos de los cuales (PM de 94.0 y 58.6) presentaron actividad proteolítica en

geles de sustrato 2D. El análisis por espectrometría de masas de estos spots mostró la presencia de 21 proteínas con más de un 95 % de confiabilidad, entre las cuales se encuentran: la secuencia SRS29B o SAG-1, una proteína inmunodominante altamente expresada en la membrana plasmática de los taquizoítos, que resulta clave en la adhesión a la célula hospedera y, en consecuencia para la invasión; una proteína de la familia DJ-1, que funciona como una proteína de andamiaje para la activación de la actividad cinasa de PK1 dependiente de Ca^{2+} , la cual regula la secreción de los micronemas ⁵⁵; MIC 2, que es una proteína TM de micronemas con importante función tanto en la motilidad como en la invasión parasitaria ⁶², pues contiene un dominio extracelular soluble que funciona como adhesina a la célula hospedera, mientras que la región Ct corresponde al tallo citosólico, que se asocia con el complejo actino-miosina parasitario; GRA 2, una proteína soluble de gránulos densos implicada en la invasión celular y que resulta muy inmunogénica, siendo altamente reconocida por anticuerpos de personas infectadas con *T. gondii* de forma específica ⁶³; las proteínas de choque térmico (HSPs) HSP 70 y HSP 90, que se encuentran involucradas en diversas funciones biológicas como el plegamiento de proteínas, mecanismos de respuesta al estrés y diferenciación entre los estadios parasitarios de bradizoíto y taquizoíto ⁶⁴. No obstante, las HSPs son proteínas muy ubicuas en la naturaleza y presentan dominios conservados evolutivamente entre las diferentes especies, la HSP 70 de *T. gondii* se caracteriza por una importante función moduladora⁶⁵, pues constituye un antígeno reconocido tanto por anticuerpos como por células T de personas infectadas, de ahí que en varios estudios se propone como una proteína útil en la adyuvación. Consideramos que el hecho de que por E-masas no se haya identificado ninguna proteasa de *T. gondii* no significa necesariamente que no esté presente en los spots analizados, sobre todo porque se tiene evidencia de la actividad proteolítica en los spots 1 y 2 (Figura 9C) por zimografía 2D. Cabe la posibilidad de que esto se deba a que la concentración de estas proteasas sea insuficiente para su detección por espectrometría de masas. De ser así, habrá que replantear la estrategia a

seguir para la obtención de las proteasas, pues al parecer obtenerlas directamente del parásito no es la más factible para fines prácticos. Una alternativa podría ser obtener las proteasas de interés por vía recombinante.

9. Conclusiones

1. Las 19 proteasas parasitarias de PES reportadas previamente por nuestro laboratorio resultaron inmunogénicas por métodos bioinformáticos de predicción de antigenicidad, por lo que en principio pueden ser candidatos a tener en cuenta para el desarrollo de vacunas uni o multicomponentes, contra la infección por *T. gondii*.
2. Se estandarizó un método que permitió el enriquecimiento de metaloproteasas de *T. gondii* mediante cromatografía de afinidad, con la máxima recuperación de actividad proteolítica en la fracción eluída.
3. Las proteasas en la fracción enriquecida conservaron su actividad proteolítica por zimografía, con el patrón de degradación previamente reportado por nuestro laboratorio, lo cual indica que el proceso de purificación estandarizado no desnaturalizó a las proteasas.
4. Los PES de taquizoítos parasitarios son una valiosa fuente para la búsqueda de proteínas inmunogénicas en la infección por *T.gondii*, diferentes desde el punto de vista funcional y estructural.
5. No se logró identificar ninguna proteasa en los spots de proteínas inmunorreconocidos por Wb 2D por E-masas, y aunque parecen tener una actividad fácilmente detectable por zimografía, esto sugiere que hay poca abundancia en concentración de estas proteínas en PES, lo que será necesario considerar para estudios futuros.

10. Perspectivas

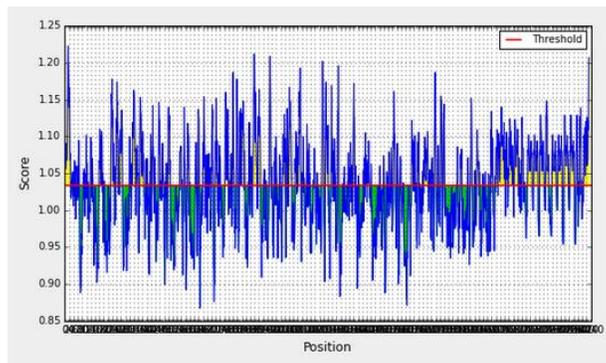
1. Ampliar la búsqueda de proteínas inmunorreconocidas en PES por Wb 2D, incrementando el número de sueros de pacientes a evaluar a como mínimo 5 sueros de pacientes con toxoplasmosis aguda y 5 con crónica.
2. Obtener las proteasas de interés por vía recombinante, con el fin de poder contar con la cantidad suficiente de estas proteínas para futuros estudios de inmunodetección diagnóstica e inmunoprotección.
3. Extender el estudio a fin de no sólo identificar proteasas inmunogénicas en PES, sino otras proteínas secretadas con funciones claves en la virulencia parasitaria, con el fin lograr una visión más amplia sobre un posible diseño multiantígeno para la inducción de inmunoprotección.

Anexos

Anexo I: Péptidos antigénicos lineales para células B de la TLN-4 devueltos por el servidor IEDB.

No.	Start	End	Peptide	Length
1	4	27	PCLFRSTFLLLLALLPLFSLSES	24
2	32	37	SRSLPS	6
3	99	104	AAAVRE	6
4	118	124	SSSVSSP	7
5	169	174	LPTLAEVRAALASTVA	16
6	213	230	AYSVFSVPALKLEGVAIA	18
7	237	248	GSFAVSVGCGFF	12
8	254	267	IPGVAHQLEHLIFL	14
9	299	305	TFVVAAP	7
10	310	328	PELLDRFLLHLFHPLLAAE	19
11	331	339	ASEVMAVQF	9
12	348	367	VARVLELAMAVIPSLASPA	20
13	394	400	DTLCKTP	7
14	404	411	GLDVLKAL	8
15	435	442	VPIIVEGA	8
16	450	457	LRIPAEVE	8
17	477	489	EMVVRILSKYVQA	13
18	533	542	SPSVSSAPAS	10
19	552	558	LKIVRLH	7
20	569	576	VASFLEAA	8
21	618	623	RLLVVW	6
22	640	650	PTALLEYLLEY	11
23	668	675	DAEYVDYT	8
24	679	687	KAFVGLLFE	9
25	697	708	EDVVSATLAYAE	12
26	742	758	AVSAVIAAAEKLAVLQP	17
27	777	785	TLLVDVLKE	9

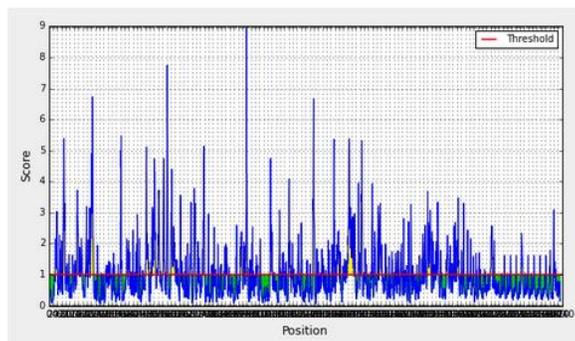
No.	Start	End	Peptide	Length
27	777	785	TLLVDVLKE	9
28	796	803	SAFVVLPE	8
29	810	816	AEVVHAF	7
30	818	832	PYGVQFSVSALPSLA	15
31	871	892	SAFPLPPVLACNVAATVALTPR	22
32	894	907	VPEICQSLSPVQFP	14
33	948	956	GPFCVLVIE	9
34	1009	1021	ALASFQCGVDLL	13
35	1027	1034	GALVLEIQ	8
36	1036	1053	FSELFAPVLARLIEVLKE	18
37	1069	1075	TLKVQLS	7
38	1082	1094	PFELALDVALSVV	13
39	1101	1107	QLDLRSA	7
40	1156	1163	SKQQLPFS	8
41	1192	1201	AYVSLYVTHP	10
42	1208	1221	MVVYSLIGEVISSP	14
43	1234	1243	YVAAAAREV	10
44	1250	1255	ATIVQG	6
45	1265	1271	RHVCAFL	7
46	1320	1327	RNFCFIRE	8
47	1337	1345	FLSCPAILK	9
48	1393	1401	LPGLSPSAS	9
49	1403	1412	SAEVRQAPSL	10
50	1523	1532	ALSLIQVEAR	10
51	1554	1559	PTVASP	6
52	1608	1617	PIEFLPLARQ	10
53	1636	1642	KRIVVDN	7
54	1665	1685	KSSLFSLSPSSHPSPLWLAY	21
55	1702	1707	EEVCGA	6



56	1713	1722	PEAVLIVSPE	10
57	1741	1750	AAAAPVVSPP	10
58	1755	1762	GVPLVPES	8
59	1835	1842	RAQLLKQR	8
60	1882	1888	AFPVSAV	7
61	1911	1921	PSALHQADPL	11
62	1977	1985	VENVTVASG	9
63	1999	2008	QTDVLPSPRA	10
64	2010	2043	IFTVPTLTPAPSPVAFALPQIHQQLPQVGVGAE	34
65	2045	2054	PREVTPVSTD	10
66	2058	2079	SASAFVPGSVQASLSQSPAASV	22
67	2084	2104	APPLPLAHQPFASLPPAPQLP	21
68	2119	2126	PPTVVPGT	8
69	2146	2167	GAPAVASPAPTVGAAPQAVITYT	22
70	2175	2195	APAVASPAPTVGAAPQAVITYT	21
71	2203	2223	APAVASLAPTVGAAPQAVITYT	21
72	2231	2244	APAVVSPAPTVGAA	14
73	2259	2279	APAVASPAPTVGAAPQAVITYT	21
74	2287	2307	APAVASPAPTVGAAPPVITYT	21
75	2315	2335	APAVASLAPTVGAAPPVITYT	21
76	2343	2363	APAVASLAPTVGAAPQAVITYT	21
77	2372	2378	PAAVASL	7
78	2387	2394	QAGVVSRA	8

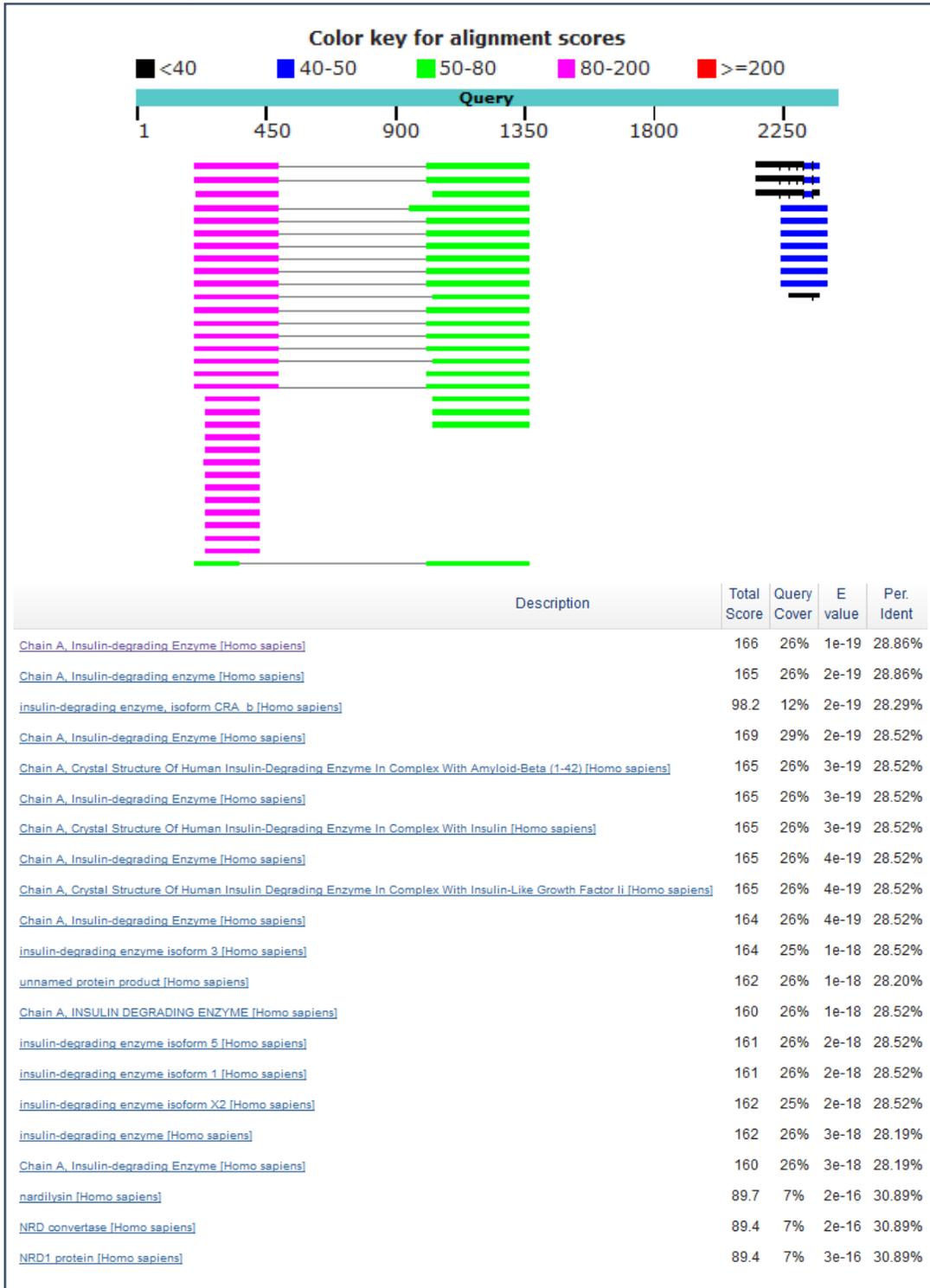
Anexo II: Péptidos accesibles de la TLN-4 devueltos por el servidor IEDB.

No.	Start	End	Peptide	Length
1	30	41	PSSRSLPSHQTR	12
2	48	53	DAARKP	6
3	67	78	SSSRETEEDPGR	12
4	112	117	SSTRTL	6
5	133	145	AETRPDSSSDPVN	13
6	152	158	GGETPDP	7
7	174	180	AQSRTFP	7
8	186	195	KNGEQVEDGD	10
9	197	212	ELAERKRVKPPRDTIS	16
10	340	347	EHEKNQPD	8
11	389	375	SATQDEV	7
12	378	384	SFYRPEV	7
13	459	474	AAEREAEKRSVYTPKE	16
14	490	509	NSPTEAHADKTKTPHNKGN	20
15	517	528	SDLTPQRTPSDA	12
16	541	551	ASSQAKRNEV	11
17	560	567	GERQKEES	8
18	580	602	DAYRSRPNATAEDSSPTDGESDA	23
19	624	629	ERRTNW	6
20	670	678	EYVDYTTISQ	9
21	688	696	LTDEGEEKF	9
22	732	740	RSWIYKDPPE	9
23	844	849	TDAAEK	6
24	911	921	GRSDSELRESS	11
25	926	933	GPRSESLE	8
26	935	944	AEVEEERKKL	10
27	964	970	KNAEPPN	7
28	987	993	ATAQNTL	7
29	1051	1062	LKESQDNVQSD	12
30	1094	1100	VRRNRFIS	7
31	1139	1147	IDYEEARKL	9
32	1184	1190	PIPEDAT	7

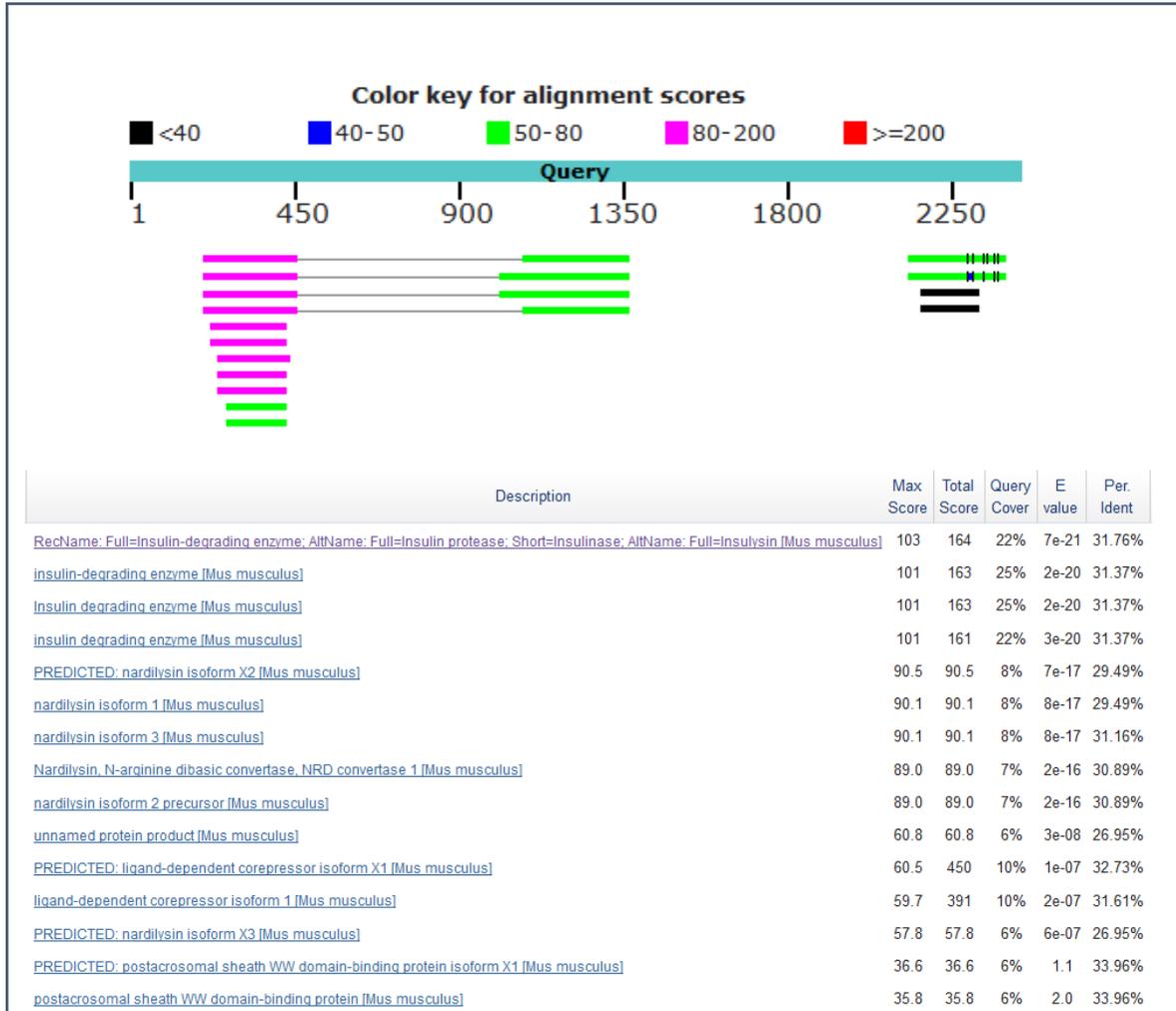


33	1199	1204	THFFPD	6
34	1255	1264	GSQRKPDELE	10
35	1354	1380	RANRRRI	7
36	1387	1381	NSSSSETASHQREIR	15
37	1417	1450	SALRFRPLSEKRETTQSSEPEAPETSSQDGGQRSV	34
38	1452	1457	ANSEKP	6
39	1470	1477	IEGKSRKV	8
40	1484	1491	PGNERRTY	8
41	1547	1552	RRGDGQ	6
42	1563	1568	APKRPA	6
43	1571	1585	AGPRDSGEASETTG	15
44	1629	1635	DQNAADA	7
45	1777	1782	APTESE	6
46	1796	1818	AEARTRQLPTAEQQTLEQRKA	21
47	1841	1853	QRLDAMKQYGRP	13
48	1891	1900	RSSTATRTQA	10
49	1905	1910	HGSRRL	6
50	1940	1949	RQAEIQTQLR	10
51	2099	2110	PAPQLPQEPVQ	12
52	2245	2253	PQAEITYTAP	9
53	2399	2404	SQPQAE	6

Anexo III: Alineamiento múltiple de secuencia de la TLN-4 de *T. gondii* con *Homo sapiens*.



Anexo IV: Alineamiento múltiple de secuencia de la TLN-4 de *T. gondii* con *Mus musculus*.



Referencias Bibliográficas

1. Innes, E. A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* **57**, 1–7 (2010).
2. Dubey, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. *J. Eukaryot. Microbiol.* **55**, 467–475 (2008).
3. Zhou, Z. *et al.* The Association between *Toxoplasma gondii* Infection and Risk of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res. Int.* **2019**, 1–8 (2019).
4. Hernández-Cortazar, I. *et al.* Toxoplasmosis in Mexico: Epidemiological situation in humans and animals. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **57**, 93–103 (2015).
5. Nassif, D. V. & Nobrega, F. R. Eccentric Target Sign: Think Neurotoxoplasmosis. *The Neurohospitalist* **9**, (2019).
6. Retmanasari, A., Widartono, B. S., Wijayanti, M. A. & Artama, W. T. Prevalence and Risk Factors for Toxoplasmosis in Middle Java, Indonesia. *Ecohealth* **14**, 162–170 (2017).
7. NCBI. Taxonomía de *Toxoplasma gondii*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>.
8. Smith, E. A Ubiquitous Intracellular Parasite : The Cellular Biology of *Toxoplasma gondii*. **25**, 1301–1309 (1995).
9. Sato, S. The apicomplexan plastid and its evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1285–1296 (2011).
10. Hu, K. *et al.* Cytoskeletal components of an invasion machine - The apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **2**, 0121–0138 (2006).
11. Nichols, B. A. & Chiappino, M. L. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **34**, 217–226 (1987).
12. Dubey, J. P. & Lindsay, D. S. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites , Bradyzoites , and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 267–299 (1998).
13. Rougier, S., Montoya, J. G. & Peyron, F. Lifelong Persistence of Toxoplasma Cysts: A Questionable Dogma? *Trends Parasitol.* **33**, 93–101 (2017).

14. Black, M. W. & Boothroyd, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 607–623 (2000).
15. Ferguson, D. J. P. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.* **34**, 347–360 (2004).
16. Mendez, O. A. & Koshy, A. A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog.* **13**, 1–12 (2017).
17. Delgado Betancourt, E. *et al.* From Entry to Early Dissemination—*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter With Its Host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 1–9 (2019).
18. Pittman, K. J. & Knoll, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**, 387–401 (2015).
19. Barragan, A. & Sibley, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* **11**, 426–30 (2003).
20. Dupont, C. D., Christian, D. A. & Hunter, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.* **34**, 793–813 (2012).
21. Okumura, R. & Takeda, K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflamm. Regen.* **38**, 1–8 (2018).
22. Sher, A., Tosh, K. & Jankovic, D. Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 36–42 (2017).
23. Yarovinsky, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 109–121 (2014).
24. Landrith, T. A., Harris, T. H. & Wilson, E. H. Characteristics and critical function of CD8+ T cells in the *Toxoplasma*-infected brain. *Semin. Immunopathol.* **37**, 261–270 (2015).
25. Sasai, M., Pradipta, A. & Yamamoto, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int. Immunol.* **30**, 113–119 (2018).
26. Cohen, S. B. & Denkers, E. Y. Border maneuvers: Deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. *Mucosal Immunol.* **7**, 744–752 (2014).

27. Holland Alday, P. & Stone Doggett, J. Drug Design, Development and Therapy Dovepress Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 273–293 (2017).
28. Jongert, E., Roberts, C. W., Gargano, N., Förster-Wald, E. & Petersen, E. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: Challenges and opportunities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 252–266 (2009).
29. Li, Y. & Zhou, H. Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*. *Expert Opin. Biol. Ther.* **18**, 273–280 (2018).
30. Garcia, J. L., Innes, E. A. & KATZER, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine Dev. Ther.* **2014**, 23–37 (2014).
31. Fereig, R. M., Abdelbaky, H. H., Mohamed, A. E. A. & Nishikawa, Y. Recombinant subunit vaccines against *Toxoplasma gondii*: Successful experimental trials using recombinant DNA and proteins in mice in a period from 2006 to 2018. *J. Vet. Med. Anim. Sci.* **1**, 1–8 (2018).
32. Mendes, É. A. *et al.* Recombinant Vaccines against T. gondii: Comparison between Homologous and Heterologous Vaccination Protocols Using Two Viral Vectors Expressing SAG1. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
33. Roiko, M. S. & Carruthers, V. B. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cell. Microbiol.* **11**, 1444–1452 (2009).
34. Good, M. F. *et al.* Vaccination with chemically attenuated *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage parasites induces parasite-specific cellular immune responses in malaria-naïve volunteers: a pilot study. *BMC Med.* **16**, 1–16 (2018).
35. Mottram, J. C. *et al.* New aziridine-based inhibitors of cathepsin L-like cysteine proteases with selectivity for the Leishmania cysteine protease LmCPB2.8. *Eur. J. Med. Chem.* **156**, 587–597 (2018).
36. Bivona, A. E. *et al.* *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 1–23 (2018).
37. Ibáñez-Escribano, A. & Gómez-Barrio, A. *Trichomonas vaginalis*: The versatility of a tenacious parasite. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* **83**, 10–47 (2017).

38. Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G. & De La Garza, M. Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. *J. Trop. Med.* **2013**, 1–32 (2013).
39. Ramírez-Flores, C. J. *et al.* Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitol. Res.* **118**, 289–306 (2019).
40. Chaparro, J. D. *et al.* Two key cathepsins, TgCPB and TgCPL, are targeted by the vinyl sulfone inhibitor K11777 in in vitro and in vivo models of toxoplasmosis. *PLoS One* **13**, 1–11 (2018).
41. Han, Y. *et al.* DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* cathepsin C 1 induce protection against toxoplasmosis in mice. *Korean J. Parasitol.* **55**, 505–512 (2017).
42. Zhao, G. *et al.* Immunization with *Toxoplasma gondii* aspartic protease 3 increases survival time of infected mice. *Acta Trop.* **171**, 17–23 (2017).
43. Zhao, G. *et al.* *Toxoplasma gondii* cathepsin proteases are undeveloped prominent vaccine antigens against toxoplasmosis. *BMC Infect. Dis.* **13**, 1–11 (2013).
44. Zhao, G. *et al.* Identification and characterization of *Toxoplasma gondii* aspartic protease 1 as a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Parasites and Vectors* **6**, 1–13 (2013).
45. CDC. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. *U.S. Department of Health and Human Services. Quinta edición.* 1–415 (2009).
46. IEDB. Available at: <https://www.iedb.org/>.
47. Link, V., Shevchenko, A. & Heisenberg, C. P. Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Dev. Biol.* **13**, 1–9 (2006).
48. Uniprot. Available at: <https://www.uniprot.org/>.
49. Kolaskar, A. S. & Tongaonkar, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* **276**, 172–174 (1990).
50. Emini, E. A., Hughes, J. V, Perlow, D. S. & Boger, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* **55**, 836–839 (1985).

51. Li, G. Z. *et al.* Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* **9**, 1696–719 (2009).
52. ToxoDB: The Toxoplasma Genomics Resource. Available at: <https://toxodb.org/toxo/>.
53. NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
54. Wu, J. L. *et al.* Purification and characterization of a gelatinolytic matrix metalloproteinase from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Food Chem.* **145**, 632–638 (2014).
55. DeepLoc 1.0. Available at: <http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>.
56. Jones, E. J., Korcsmaros, T. & Carding, S. R. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. *Tissue Barriers* **5**, 1–11 (2017).
57. Długońska, H. Review articles *Toxoplasma gondii* and the host cells 1. *Ann. Parasitol.* **60**, 83–88 (2014).
58. Siqueira-Neto, J. L. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 1–12 (2018).
59. Li, H., Child, M. A. & Bogyo, M. Proteases as regulators of pathogenesis: Examples from the Apicomplexa. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 177–185 (2012).
60. Lim, S. S. Y. & Othman, R. Y. Recent advances in *Toxoplasma gondii* immunotherapeutics. *Korean J. Parasitol.* **52**, 581–593 (2014).
61. Laliberté, J. & Carruthers, V. B. *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **177**, 49–56 (2011).
62. Huynh, M. H. & Carruthers, V. B. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog.* **2**, 753–762 (2006).
63. Rezaei, F. *et al.* A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. *Microb. Pathog.* **126**, 172–184 (2019).
64. Angel, S. O., Figueras, M. J., Alomar, M. L., Echeverria, P. C. & Deng, B. *Toxoplasma gondii* Hsp90: Potential roles in essential cellular processes of the parasite. *Parasitology* **141**, 1138–1147 (2014).
65. Dobbin, C. A., Smith, N. C. & Johnson, A. M. Heat Shock Protein 70 Is a

Potential Virulence Factor in Murine Toxoplasma Infection Via Immunomodulation of Host NF- κ B and Nitric Oxide. *J. Immunol.* **169**, 958–965 (2002).