



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Inducción de la secreción de proteasas en taquizoítos  
de *Toxoplasma gondii*”**

**T E S I S**

Que presenta

**Biól. SANDRA HERNÁNDEZ GARCÍA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA**

**Director de Tesis: Dr. Ricardo Mondragón Flores**

**Ciudad de México**

**AGOSTO, 2017**



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio No. 16: Bioquímica Celular de Patógenos Intracelulares, en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) unidad Zacatenco, bajo el apoyo del Estímulo a la investigación médica 2017 otorgado por la Fundación Migel Alemán A.C. al Dr. Ricardo Mondragón Flores.

## **Agradecimientos:**

Al **Dr. Ricardo Mondragón Flores**, por permitirme integrarme a su grupo de trabajo, por su asesoría, dirección, tiempo e ideas que permitieron el desarrollo y el cumplimiento de las metas de este trabajo.

A mis asesores la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** y el **Dr. Guillermo Ávila Flores**; por su tiempo y valiosa asesoría que enriquecieron el contenido de este trabajo y mi formación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca crédito con número CVU/Becario 417246/588786 otorgada en el periodo de septiembre de 2015 a agosto de 2017.

Al **Colegio de Profesores del Departamento de Bioquímica** por las enseñanzas recibidas durante el periodo de maestría y sus aportes en los seminarios departamentales.

Al **Departamento de Bioquímica**, por el acceso de las instalaciones y los equipos, así como por el material de apoyo proporcionado.

Las unidades administrativas y académicas del CINVESTAV-IPN: Control Escolar, Departamento de Becas, Biblioteca.

A la **UPEAL** del CINVESTAV Unidad Zacatenco por el suministro de animales empleados durante este proyecto.

El **M. en C. Carlos J. Ramírez Flores**, por brindarme las bases para proyectar mi tema de tesis, el apoyo brindado, las sugerencias y las horas dedicadas a entrenarme y transmitirme su conocimiento.

La **Q.F.B. Mónica E. Mondragón Castelán**, auxiliar de investigación del laboratorio 16, por su apoyo y asistencia técnica en el trabajo de laboratorio.

## **Agradezco a:**

A los **M. en C. Francisco Ernesto Sandoval Rodríguez, Rosalba Cruz Mirón, Kitzia Nohemí Castro Elizalde**, y al **Biól. Noe Lagunas Cortés**, por su apoyo en técnicas de laboratorio utilizadas durante el desarrollo del trabajo.

El **Ing. José Claudio Jiménez Vargas** por su apoyo y asistencia en la preparación del material utilizado para los experimentos.

Agradezco a mi **Poder Superior** el haberme permitido concluir esta etapa académica y personal, y por todas las cosas que para mi crecimiento aprendí en el proceso.

Comparto este logro con:

**Alexis**, gracias por ser el motor que impulsa mis sueños. Por cada beso, abrazo y sonrisa que siempre me hacen levantarme y continuar a pesar de cualquier adversidad.

**Oscar**, por todas y cada una de las veces que has sido mi compañero y mi amigo, por sostenerme cuando las fuerzas se me agotan y por todo el amor que siempre de ti recibo. Gracias.

Mi familia: **Ferchito, Chapis y Yaz**. Muchas gracias por todo su amor, por siempre ser mi apoyo, desde siempre. Por preocuparse por mí, por todas sus palabras de aliento y sus oraciones. Por recordarme que aunque todo parezca difícil siempre hay alguien que cuida de mí. Fui bendecida al tenerlos como mi familia.

Mis **abuelitos, tías, Luigi y Aranza**, por sus consejos y sus palabras de ánimo. Por todo el cariño que nos brindan a los tres.

**Biani**, gracias por todas las veces que a punto de rendirme me hiciste recapacitar. Tu apoyo fue fundamental para terminar este proyecto.

Mi padrino **Jesús y compañeros del grupo Nuevo Amanecer** gracias por sus consejos y por mostrarme siempre que todo en la vida tiene un motivo de ser y que ningún obstáculo es imposible de superar por difícil que parezca.

**Claudio**, gracias por las charlas y la música compartida. Fue un gusto añadir un amigo más a mi pequeña lista.

Mis nuevos amigos del laboratorio, **Francisco**, **Noé**, **Rouse** y **Kitzia**, les agradezco su apoyo, ánimo y compañía en el periodo de mi trabajo experimental.

**Lupita**, gracias por tu apoyo para preparar mis amortiguadores y diversas soluciones.

De forma especial quiero agradecer a **Carlos J.R.F.**, tú mejor que nadie entiende lo que este trabajo representa para mí en todos los aspectos. Muchas gracias por haber estado junto a mí, por las horas y horas que dedicaste a enseñarme lo que sabes, por la paciencia, las charlas, los consejos y correcciones, por prestarme tus bitácoras, por las preocupaciones y el estrés. Este trabajo no hubiera sido posible sin ti. Gracias por ser mi maestro, pero sobre todo por convertirte en mi amigo. Fue un privilegio aprender de ti.

<b>Índice</b>	
<b>Abreviaturas</b>	<b>XI</b>
<b>Resumen</b>	<b>XIV</b>
<b>Abstract</b>	<b>XV</b>
<b>1.0 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2.0 Generalidades</b>	<b>2</b>
2.1 Taxonomía	2
2.2 Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	2
2.3 El taquizoíto de <i>T. gondii</i>	5
2.4 Organelos secretores de <i>T. gondii</i>	6
2.4.1 Gránulos densos	7
2.4.2 Roptrías	7
2.4.3 Micronemos	8
2.5 Mecanismo de invasión celular de <i>T. gondii</i>	9
2.5.1 Invasión pasiva	9
2.5.2 Invasión activa	10
2.6 Diseminación de <i>T. gondii</i>	12
2.7 Proteasas	13
2.7.1 Aspártico proteasas	15
2.7.2 Cisteína proteasas	15
2.7.3 Serina proteasas	16
2.7.4 Metaloproteasas	16
2.8 Proteasas en <i>T. gondii</i>	18
2.9 Proteasas en protozoarios patógenos	20
2.9.1 Protozoarios extracelulares	20
2.9.2 Protozoarios intracelulares	23
<b>3.0 Antecedentes directos</b>	<b>26</b>
<b>4.0 Justificación</b>	<b>31</b>
<b>5.0 Hipótesis</b>	<b>32</b>
<b>6.0 Objetivos</b>	<b>32</b>
6.1 Objetivo general	32
6.2 Objetivos específicos	32

<b>7.0 Métodos</b>	<b>33</b>
7.1 Animales	33
7.2 Mantenimiento de parásitos de <i>T. gondii</i> cepa RH en cultivo celular	33
7.3 Mantenimiento de parásitos de <i>T. gondii</i> cepa RH en modelo murino	33
7.4 Determinación de viabilidad celular por exclusión con azul de tripano	34
7.5 Preparación de extractos totales de taquizoítos	34
7.6 Estimulación de taquizoítos con las moléculas elegidas como factores de inducción.	34
7.7 Inducción de la secreción de proteasas por interacción con BSA	35
7.8 Precipitación de proteínas por la técnica de metanol-cloroformo	36
7.9 Zimografía 1D	37
7.10 Inhibición de proteasas en Zimografía	37
7.11 Evaluación del papel de Ca <sup>2+</sup> intracelular en la secreción inducida de proteasas	38
7.12 Efecto de inhibidores de PKC y PP2C en la secreción de proteasas	38
7.13 Análisis de los productos de secreción inducida mediante Electroforesis 2D (Isoelectroenfoque)	39
7.14 Tinción con azul de Coomassie	40
7.15 Tinción con nitrato de plata	40
<b>8.0 Resultados</b>	<b>41</b>
8.1 Corroboración de la presencia/ausencia de proteasas en extractos totales de taquizoítos aislados de ratón y de cultivo celular mediante zimografía en gelatina.	41
8.2 Inducción de la secreción de proteasas en taquizoítos obtenidos de cultivo celular	42
8.3 Inducción de la secreción de proteasas en taquizoítos aislados de modelo murino.	45
8.5 Caracterización de las condiciones óptimas para la detección de las proteasas de secreción inducida por exposición a BSA al 3% en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina.	49
8.6 Identificación de las proteasas inducidas mediante el uso de inhibidores específicos.	56
8.7 Zimografía en geles de poliacrilamida copolimerizados con BSA	59
8.8 Papel del calcio intracelular	60

8.9 Análisis de la posible regulación de la secreción inducida utilizando inhibidores de proteínas de señalización.	61
8.10 Comparación de la composición de productos de secreción inducida y secreción constitutiva mediante análisis por isoelectroenfoco	63
<b>9.0 Discusión</b>	<b>68</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>75</b>
<b>11. Perspectivas</b>	<b>76</b>
<b>12. Bibliografía</b>	<b>77</b>

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .	4
<b>Figura 2.</b> Diagrama de un taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de invasión activa de <i>Toxoplasma gondii</i> .	11
<b>Figura 4.</b> Diseminación de <i>T. gondii</i> a través de barreras biológicas.	13
<b>Figura 5.</b> Mecanismo proteolítico de los grupos de proteasas.	14
<b>Figura 6.</b> Proteasas de parásitos extracelulares.	23
<b>Figura 7.</b> Proteasas de parásitos intracelulares.	25
<b>Figura 8.</b> Perfil proteolítico de ET y productos de E/S de taquizoítos aislados de ratón.	26
<b>Figura 9.</b> Invasión celular por taquizoítos pre-tratados con inhibidores de proteasas	27
<b>Figura 10.</b> Zimograma en colágena I/III.	28
<b>Figura 11.</b> Perfil proteolítico de extractos totales y productos de secreción de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH).	29
<b>Figura 12.</b> Retorno de la expresión de proteasas en taquizoítos aislados de cultivo celular y reingresados a ratón.	30
<b>Figura 13.</b> Perfil proteolítico de ET de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) aislados de ratón y de cultivo celular.	43
<b>Figura 14.</b> Perfil proteolítico de productos de secreción inducida (PSI) y extractos totales (ET) de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados con diferentes concentraciones de BSA durante 30 min.	48
<b>Figura 15.</b> Zimograma en caseína del perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados o no con BSA 3%	49
<b>Figura 16.</b> Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados con BSA 3% por activación a diferentes pH.	51
<b>Figura 17.</b> Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados con BSA 3%, activado a pH 5.5 en presencia de diferentes cofactores o agentes reductores.	54
<b>Figura 18.</b> Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de	

taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados con BSA 3%, activado a pH 7.5 en presencia de diferentes cofactores.	55
<b>Figura 19.</b> Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados con BSA 3%, activado a pH 8.0 en presencia de diferentes cofactores.	56
<b>Figura 20.</b> Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados con BSA 3%.	59
<b>Figura 21.</b> Zimograma copolimerizado con BSA del perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) estimulados o no con BSA 3%.	60
<b>Figura 22.</b> Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) preincubados con BAPTA-AM	62
<b>Figura 23.</b> Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) preincubados con inhibidores de PKC y de PP2C.	64
<b>Figura 24A.</b> Análisis por isoelectroenfoque de la secreción de proteínas inducida por BSA.	67
<b>Figura 24B.</b> Análisis por isoelectroenfoque de la secreción de proteínas inducida por BSA.	68
<b>Tabla 1.</b> Factores evaluados en la búsqueda del inductor de la secreción en taquizoítos de <i>T. gondii</i>	45
<b>Tabla 2.</b> Proteínas con variaciones en la secreción estimulada por BSA.	66

## Abreviaturas

°C	Grados centígrados
AP	Aspártico proteasas

APS	Persulfato de amonio
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane N, N, N', N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CP	Cisteína proteasas
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
E64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino) butano
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
E/S	Excreción-secreción
ET	Extracto total
h	Hora
HEp-2	Carcinoma epidermoide humano cepa-2
IAA	Iodoacetamida
kDa	kiloDaltones
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
MEM	Medio mínimo esencial
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	miliMolar
MMP	Metaloproteasas de la matriz extracelular
MP	Metaloproteasas
ng	Nanogramos
PES	Penicilina-Estreptomicina
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
Rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SFB	Suero fetal bovino
SP	Serina proteasas
TA	Temperatura ambiente
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametil etilen diamina
TLCK	N- $\alpha$ -p-Tosil-L-lisina clorometil cetona
TPCK	N-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
V	Volts
VP	Vacuola Parasitófora
ZnCl <sub>2</sub>	Cloruro de zinc
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ M	microMolar
$\mu$ g	microgramos
2D	Bidimensional

## Resumen

*Toxoplasma gondii* es un coccidio intracelular obligado responsable de una de las enfermedades parasitarias más comunes, la toxoplasmosis, que infecta de manera crónica a cerca de la tercera parte de la población humana mundial. Uno de los factores de éxito para la enfermedad es la gran capacidad de diseminación del parásito que migra a través de los tejidos hasta alcanzar incluso órganos inmunoprivilegiados, como ojo, placenta y cerebro; sin embargo, a pesar de su importancia, los mecanismos por los cuales el parásito lleva a cabo el proceso de diseminación son aún desconocidos. *T. gondii* expresa y secreta de forma constitutiva metaloproteasas detectables por zimografía cuando los parásitos son aislados de un modelo *in vivo*. Interesantemente, parásitos mantenidos *in vitro* muestran un comportamiento proteolítico diferente, posiblemente como resultado de que en cultivo celular el parásito no necesita atravesar barreras biológicas o defenderse de la respuesta inmune. En la presente tesis, utilizando parásitos de ambos modelos, se evaluó la inducción de la secreción de proteasas en taquizoítos de *T. gondii* como resultado de la interacción con diversos factores y moléculas biológicas y se caracterizaron algunas de sus propiedades bioquímicas. Dentro de los candidatos evaluados (matriz extracelular, fibronectina, colágena I, líquido peritoneal de ratón, ionomicina, etanol, albúmina sérica bovina) se encontró que la interacción de taquizoítos extracelulares aislados del modelo murino de toxoplasmosis aguda con albúmina sérica bovina resultó en la inducción de la secreción de dos proteasas, por un proceso independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Se caracterizaron las condiciones experimentales para la detección de estas proteasas y su dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como su sensibilidad a quelantes de iones divalentes (EGTA y 1,10 fenantrolina).

## Abstract

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular coccidia responsible for one of the most common parasitic diseases, toxoplasmosis, which chronically infects about one-third of the world human population. One success factor for the disease is the parasite dissemination through the tissues in order to reach even immunoprivileged organs such as eye, placenta and brain. Despite their importance, the mechanisms by which this parasite carries out the dissemination process are still unknown. *T. gondii* constitutively expresses and secretes detectable metalloproteases by zymography when parasites are isolated from an *in vivo* model. Interestingly, parasites maintained *in vitro* showed a diminished proteolytic behavior, possibly by the fact that in cell culture the parasites do not need to cross biological barriers or to defend against the immune response. One aspect not yet studied in *Toxoplasma* is the induced secretion of components such as proteases and their role on pathogenesis. By using parasites from both models (mice and cell culture), the interaction of biological factors with tachyzoites and their effect as inducers for protease secretion was evaluated. Among the evaluated candidates (extracellular matrix, fibronectin, collagen I, mouse peritoneal fluid, ionomycin, ethanol, bovine serum albumin), we found that the interaction of BSA with tachyzoites from the murine model, resulted in the induction of secretion of two proteases through an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  independent process. We also identified and characterized the experimental conditions for detection of these proteases, their dependence on  $\text{Ca}^{2+}$  and sensitivity to divalent ion chelators (EGTA and 1, 10 phenanthroline).

## 1.0 Introducción

*Toxoplasma gondii* es un protozooario parásito intracelular obligado. Es el agente causal de la parasitosis denominada Toxoplasmosis. *Toxoplasma* pertenece al phylum Apicomplexa (Speer et al, 1998) que incluye también a otros parásitos patógenos como *Sarcocystis spp.*, *Plasmodium spp.*, *Cryptosporidium spp.*, y *Eimeria spp* (Francia y Striepen, 2014). Los primeros en describir al parásito fueron Nicholle y Manceaux (Nicolle y Manceaux, 1908) en África del Norte y Splendore (Splendore, 1908) en Brasil.

Éste parásito es catalogado como uno de los más exitosos, ya que infecta a más de 3000 especies de mamíferos, aves e incluso animales acuáticos (Mazzillo et al, 2013; Dubey et al, 2007). En humanos afecta a cerca de la tercera parte de la población mundial (Jensen et al, 2015; Tenter, 2000).

Entre las patologías que *T. gondii* ocasiona en pacientes inmunocomprometidos se encuentran: encefalitis (Luft et al, 1993), coriorretinitis (Roberts y McLeod, 1999), ceguera y linfadenopatía (Burnett et al, 1998). En mujeres embarazadas, el parásito alcanza y atraviesa la placenta alojándose en el feto, pudiendo ocasionar aborto (Desmonts y Couvreur, 1974) o inducir malformaciones, hidrocefalia, macro o microcefalia y lesiones oculares (Remintong et al, 1995; Desmonts y Couvreur, 1974).

Una de las características más importantes del parásito es su alta capacidad de diseminación, ya que puede alcanzar todos los tejidos del organismo, atravesando barreras inmunoprivilegiadas como la barrera hematoencefálica o la placenta (Barragán y Sibley, 2003). A la fecha, el mecanismo exacto utilizado por el parásito durante este proceso permanece sin dilucidarse. Sin embargo, existen algunas moléculas como las proteasas, que son utilizadas por patógenos con igual capacidad de diseminación que *Toxoplasma* (Kim et al, 2003; Piña-Vázquez, 2012).

## 2.0 Generalidades

### 2.1 Taxonomía

*Toxoplasma gondii* es la única especie del género *Toxoplasma*, que pertenece al Phylum Apicomplexa, Clase *Esporozoa*, subclase *Coccidia* (Speer y Dubey, 1998). El nombre de la especie proviene de *Ctenodactylus gondii*, roedor del cual fue aislado por primera vez (Galván y Mondragón, 2001), mientras que el nombre del género proviene del griego *toxon*, que quiere decir arco, haciendo referencia a la forma del parásito y *plasma*, que significa vida (Ferguson, 2009).

### 2.2 Ciclo de vida de *T. gondii*

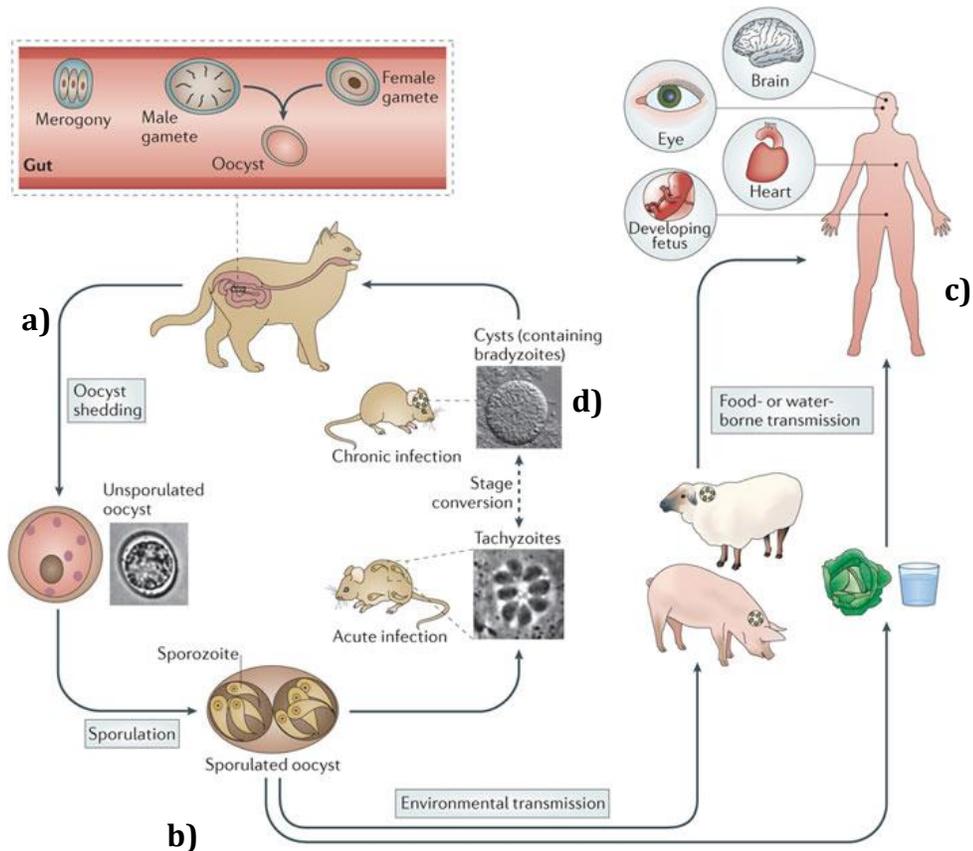
El ciclo de vida de *T. gondii* (Figura 1) se compone de diversos estadios, y se desarrolla en dos tipos de hospederos: hospederos intermediarios (todos los mamíferos y animales de sangre caliente, incluido el humano) y hospederos definitivos (felinos) (Dubey, 1998).

El ciclo comienza cuando un felino ingiere una presa (roedor, aves, etc) que aloja en sus tejidos al parásito en forma de bradizoíto dentro de estructuras conocidas como quistes tisulares. Ya en el intestino del felino, los quistes se rompen y liberan a los bradizoítos, que invaden a los enterocitos alojándose en una vacuola parasitófora (VP). Una vez realizado esto, los parásitos proliferan dentro de la VP y se diferencian mediante gametogonia (Dubey et al, 1970; Frenkel et al, 1970) en macrogametos y microgametos (Dubey, 1998; Ferguson, 2002). Los microgametos son flagelados y altamente dinámicos, lo que les permite fertilizar a los macrogametos (Ferguson, 2002) y dar lugar a un ooquiste inmaduro. Los ooquistes inmaduros son excretados en las heces al ambiente y maduran en pocos días bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas, constituyendo una fuente de infección para hospederos intermediarios cuando se encuentran contaminando fuentes

de agua o vegetales (Hutchison, 1965; Dubey y Frenkel, 1976; Muniz y Mondragón, 2009).

En el caso del humano, se conoce que las vías de infección incluyen la ingestión de ooquistes esporulados (maduros) en agua y hortalizas contaminados, y la ingestión de quistes tisulares alojados en carne mal cocida de animales de rastro infectados (Dubey, 1994). Una vez en el intestino se rompe la capa externa de los ooquistes o quistes tisulares por acción de enzimas digestivas, y se liberan las formas parasitarias contenidas en ellos (Dubey, 1998). Éstos parásitos invaden a las células epiteliales y se diferencian dentro de la VP en taquizoítos, que tienen la capacidad de atravesar la barrera intestinal y diseminarse a través de la circulación sanguínea para invadir todos los tipos celulares del hospedero (Barragán y Sibley, 2003).

Ante la presencia del parásito, la respuesta inmune del organismo activa a linfocitos B con la producción de anticuerpos específicos que no son protectores y a células T, que secretan citocinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). La interacción del parásito con esta molécula desencadena el proceso de cistogénesis, que consiste en la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y la formación de un quiste tisular. De esta manera, los parásitos entran en una etapa de lenta proliferación y latencia, que les permite sobrevivir durante un largo periodo de tiempo, siendo además resistentes a la acción de fármacos y células efectoras (Dubey, 1998; Ferguson, 2004).



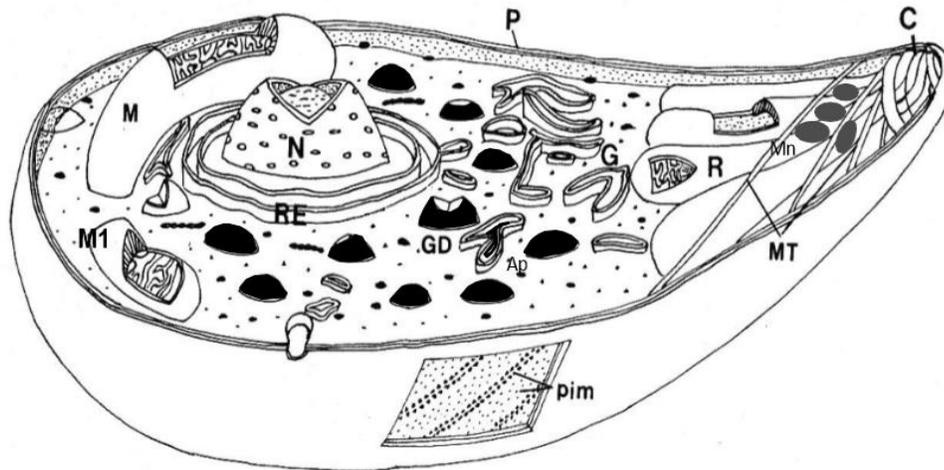
**Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.** (a) En los hospederos definitivos se lleva a cabo el ciclo de reproducción sexual de *T. gondii*, formando un ooquiste que es liberado al ambiente en las heces. (b) Un ooquiste inmaduro puede contaminar hortalizas, agua y alimentos. (c) Los hospederos intermediarios se infectan al ingerir a los ooquistes maduros. Los esporozoítos invaden el epitelio intestinal y se diferencian en taquizoítos. La invasión y proliferación de los taquizoítos genera la fase aguda de la enfermedad, pudiendo infectar órganos como ojo, cerebro, músculo, entre otros órganos. (d) La toxoplasmosis crónica se genera cuando hay una activación del sistema inmune del hospedero con la secreción de IFN $\gamma$ , el cual induce la diferenciación de los parásitos a bradizoítos y la formación de un quiste tisular, que le proporciona al parásito protección a fármacos y al sistema inmune. Tomado de Hunter y Sibley, 2012.

### **2.3 El taquizoíto de *T. gondii***

*Toxoplasma gondii* presenta tres formas parasitarias infecciosas durante su ciclo de vida: el bradizoíto, que se alberga dentro de quistes tisulares, es la forma de baja proliferación; el esporozoíto, contenido en ooquistes maduros, y el taquizoíto (Figura 2) que vive y se reproduce al interior de las VP's, es la forma más dinámica e invasiva del parásito (Dubey et al, 1998; Gómez de León y Mondragón, 2014).

El taquizoíto (Figura 2) es la forma infectiva asexual del parásito, posee una forma característica de media luna, con el extremo posterior redondeado y un tamaño de 3 x 7  $\mu\text{M}$  (Kasper, 1989; Otifi, 2012; Gómez de León y Mondragón, 2014).

Un taquizoíto tiene organelos típicos de una célula eucariota como son: núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, citoesqueleto, además de organelos característicos como el apicoplasto (plástido no fotosintético, común en Apicomplexas), anillos polares, conoide y películo (estructura trimembranal que rodea al parásito) (Dubey et al, 1998). Finalmente, el taquizoíto presenta al menos tres tipos de organelos secretores, relacionados con el proceso de invasión: micronemos, roptrías y gránulos densos (Black y Boothroyd, 2000; Carruthers, 1999; Kim, 2004; Leriche y Dubremetz, 1991).



**Figura 2. Diagrama de un taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.** P, membrana plasmática; C, conoide; MT, microtúbulos; Mn, micronemos; R, roptrías; N, núcleo; pim, partículas intermembranales; RE, retículo endoplásmico; Ap, apicoplasto; GD, gránulos densos y M, mitocondria. Figura de R. Mondragón. Tomada de Muñiz y Mondragón, 2009.

#### **2.4 Organelos secretores de *T. gondii***

Una de las características más importantes de un taquizoíta de *T. gondii* es la distribución polarizada de sus organelos, dentro de los cuales están dos organelos que participan en el proceso de secreción: las roptrías y los micronemos (Leriche y Dubremetz, 1991; Carruthers y Sibley, 1997; Carruthers, 1999; Ho et al, 2002).

Probablemente este tipo de distribución esté determinada por la íntima relación que los organelos secretores guardan con el mecanismo de invasión celular del parásito. Se sabe que los organelos secretores descargan su contenido secuencialmente: la exocitosis de los micronemos ocurre cuando se da la adhesión a la célula hospedero; la secreción de las roptrías coincide con la invasión y la secreción del contenido de los gránulos densos tiene un papel más activo después de que el parásito ha entrado a la célula hospedero y se ha alojado al interior de una VP (Carruthers y Sibley, 1997; Paredes-Santos et al, 2012).

#### *2.4.1 Gránulos densos*

Son organelos esféricos electrodenso de aproximadamente 200 nm de diámetro y se encuentran ubicados por todo el cuerpo del parásito.

Los productos de secreción de los gránulos densos incluyen proteínas denominadas GRA, NTPasas, TgPI (inhibidores de proteasas), cilofilina y otras enzimas (Cesbron-Delaw, 1994; Mercier et al, 2005). A la fecha, se han estudiado al menos 40 proteínas GRA (GRA1-GRA40) (Nadipuram et al, 2016).

El contenido de los gránulos densos se secreta al interior de la VP durante el desarrollo intracelular del parásito (Gómez de León y Mondragón, 2014), y aproximadamente 20 minutos después de la invasión, y es utilizado para la formación de la red vesículo- tubular intravacuolar cuya función es desconocida (Magno et al, 2005; Leriche y Dubremetz, 1990; Michelin et al, 2009; Sibley et al, 1986).

Se ha propuesto que las proteínas GRA-3,5,7,8,10 y 14 podrían formar parte de la membrana de la VP, confiriendo cierta protección a los parásitos contra mecanismos intracelulares de defensa (Sibley et al, 1985; Joiner et al, 1990). Se desconoce qué activa y regula su secreción al interior de la VP.

#### *2.4.2 Roptrías*

Son organelos en forma de sáculos alargados con dos aparentes sub-compartimentos, uno con apariencia alveolada y un delgado ducto insertado al interior del conoide (Shaw et al, 1998; Gómez de León y Mondragón, 2014).

Dentro de las roptrías se encuentran las proteínas ROM (derivadas del cuello), ROP (derivadas del bulbo) y lípidos (Besteiro et al, 2008; Leriche y Dubremetz, 1991; Schwarmatz y Krug, 1989; Osorio et al, 1992; Foussard et al, 1991; Joiner et al, 1994).

Las proteínas RON son responsables del ensamblaje de la unión móvil, una unión transitoria entre las membranas plasmáticas del parásito y de la célula hospedero y que es esencial en la primera etapa de la invasión activa (Alexander et al, 2005). Por su parte, las proteínas ROP participan durante el establecimiento de la infección (Bradley y Sibley, 2007).

Se han descrito al menos 18 proteínas ROP (Bradley y Sibley, 2007). Una de las más importantes es la proteína ROP1, que se ha propuesto interacciona con otras moléculas para inducir la actividad estimuladora de la penetración, o que esta proteína podría ser incluso el denominado factor estimulador de la penetración (PEF) (Osorio et al, 1992), un factor secretado por el parásito que tiene la capacidad de producir lisis de las células blanco (Lycke y Norrby, 1966; Nichols y O'connor, 1981; Lycke et al, 1968; Lycke et al, 1975).

En cuanto a los lípidos que forman parte del contenido de las roptrías, se han identificado colesterol y fosfatidilserina, los cuales podrían intervenir en la formación de la VP (Foussard et al, 1991).

Además de los componentes ya mencionados, se han estudiado como parte de las roptrías una serie de proteínas con dominio cinasa de serina y treonina que parecen tener un rol en la virulencia del parásito (Saeij et al, 2006; Sibley et al, 2009). Se desconocen los factores o moléculas que inducen su secreción fisiológica.

### *2.4.3 Micronemos*

Los micronemos son pequeños organelos con forma ovoide de 30 nm de diámetro. Se ubican en el extremo apical de los taquizoítos y contienen en su interior proteínas de 3 tipos: MIC1-12, AMA1 y SUB1 (Achbarou et al, 1991; Sheiner et al, 2010).

Se han descrito al menos 13 proteínas MIC que incluyen proteínas solubles y transmembranales (Soldati-Favre et al, 2010). Se ha propuesto que este tipo de proteínas secretadas al inicio del proceso de invasión intervienen en la

adhesión y facilitación de la penetración del parásito a la célula hospedero (Jonier y Dubremetz, 1993; Carruthers y Sibley, 1997) y se sabe que el calcio intracelular, así como vías de señalización que involucran proteínas de tipo PKG median el fenómeno de secreción de las mismas (Carruthers et al, 1999; Brown et al, 2016).

## **2.5 Mecanismo de invasión celular de *T. gondii***

*Toxoplasma gondii* tiene la capacidad de invadir todas las células del organismo, tanto células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) como no fagocíticas (epiteliales, de tejido conectivo, muscular, etc.) (Revisado en: Díaz-Martín y Mondragón, 2014). Para ello, utiliza dos tipos de mecanismos: la invasión pasiva y la invasión activa (Sibley et al, 1985; Morisaki et al, 1995).

### *2.5.1 Invasión pasiva*

Es el tipo de invasión que el parásito utiliza para células con capacidad fagocítica.

El proceso tiene lugar en varias etapas: inicia con la adhesión del parásito a la membrana del fagocito, seguida por la activación de señales de transducción que producen la reorganización del citoesqueleto y finalmente se da la introducción del parásito a la célula en un fagosoma el cual es modificado en la composición de su membrana por componentes secretados por el parásito transformándolo así en una VP la cual no es fusogénica con lisosomas (Sibley et al, 1985; Díaz-Martín y Mondragón, 2014, Galván y Mondragón, 2001) protegiéndose así el parásito de su destrucción por la digestión enzimática.

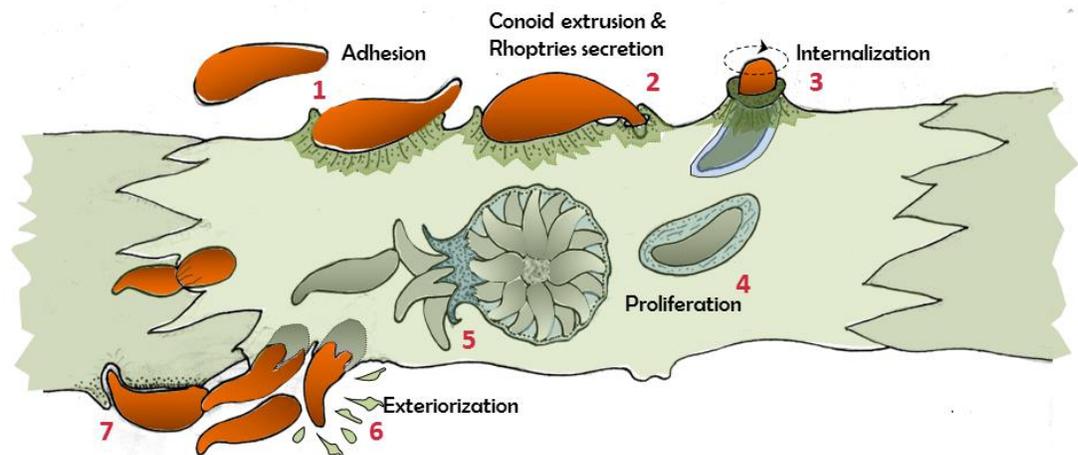
Una vez dentro de la VP, el parásito induce una desregulación metabólica sobre la célula hospedera, que le permite replicarse asexualmente por el proceso conocido como endodiogenia (Galván y Mondragón, 2001).

### 2.5.2 Invasión activa

*Toxoplasma gondii* utiliza este mecanismo para invadir a células no fagocíticas. Involucra una serie de eventos dinámicos y de secreción de diversos componentes. Dura de 3 a 5 segundos y tiene lugar en varias etapas (Dubremetz, 1998) (Figura 3):

- a) Adhesión, deslizamiento y secreción de micronemos: las proteínas MIC son secretadas para funcionar como un sistema de adhesión molecular y lubricación para la motilidad por *gliding* (Sibley, 2010) sobre la superficie de la célula hospedera (Sharma y Chitnis, 2013). Este es un movimiento de deslizamiento que involucra giros y torsiones sobre la membrana de la célula blanco para desplazarse ya que el parásito carece de organelos móviles como flagelos o membrana ondulante.
- b) Extrusión del conoide: el conoide es proyectado sobre la membrana de la célula hospedera, presionando y desestabilizándola para poder vaciar los componentes de las roptrías y formar así una horadación de menos de 1  $\mu\text{m}$  y una unión móvil temporal.
- c) Secreción de las roptrías: después de la formación de la unión móvil se secreta el contenido de las roptrías y se genera una horadación en la membrana de la célula blanco (Mordue et al, 1999).
- d) Internalización con formación de una sutura intermembranal: el parásito se internaliza en menos de 3 segundos por una horadación en la membrana mediante un movimiento tipo tornillo.
- e) Alojamiento intracelular en una VP: conforme el taquizoíto penetra a la célula, se forma un proceso endocítico que conduce a la formación de la VP, un compartimiento que evita la acidificación y la fusión con lisosomas (Sibley, 1993). Una vez ahí, los parásitos inician la secreción del contenido de los gránulos densos dando origen a una red vesículo-tubular que envuelve a los parásitos y cuya función es desconocida.

- f) Proliferación por endodiogenia: el proceso de replicación del parásito consiste en la formación interna de dos células hijas a partir del contenido citoplasmático común de la célula madre (Goldman et al, 1958).
- g) Exteriorización: una vez que la VP se halla saturada, tienen lugar señales bioquímicas desconocidas que activan la motilidad de los parásitos y la salida de la célula hospedera destruyéndola e invadiendo células vecinas.



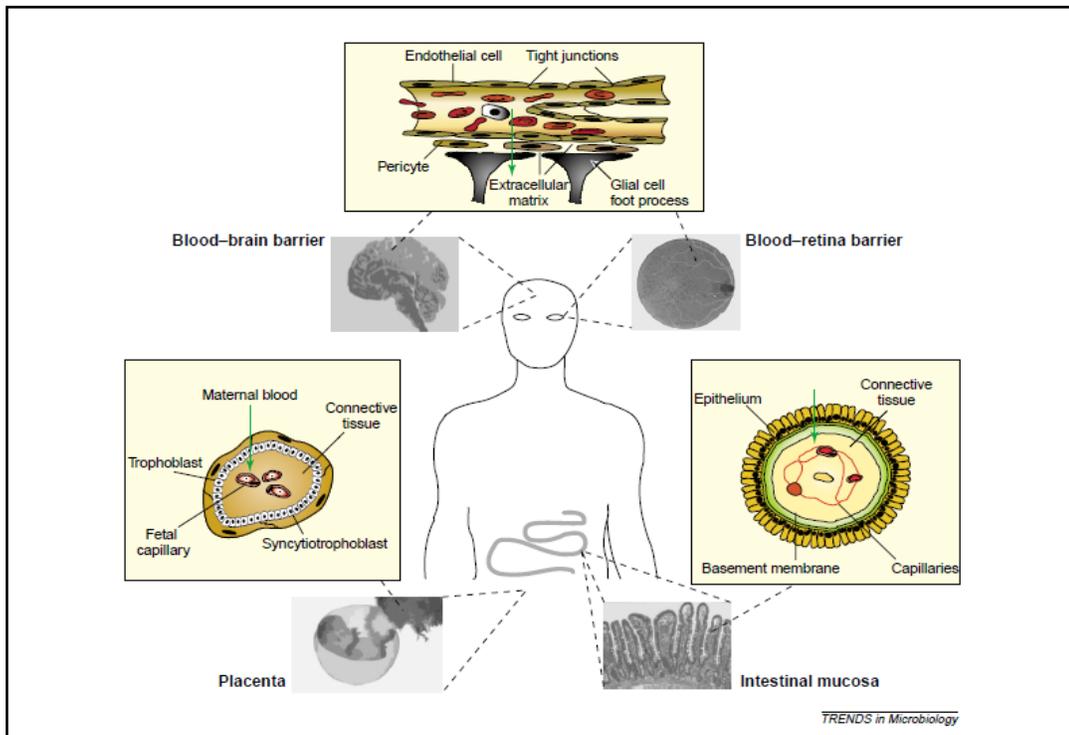
**Figura 3. Mecanismo de invasión activa de *Toxoplasma gondii* .**

(1) Adhesión del parásito a la membrana de la célula hospedera (secreción de proteínas MIC) y deslizamiento mediante un motor de actina-miosina; (2) elección de un sitio blanco, protrusión del conoide sobre la membrana de la célula hospedera y secreción de las roptrías, (3) internalización mediante movimiento tipo tornillo, (4) generación de la VP, secreción de proteínas GRA, (5) división por endodiogenia , (6) exteriorización e (7) invasión de células vecinas. Cortesía de R. Mondragón.

## 2.6 Diseminación de *T. gondii*

Una de las características que hacen de *T. gondii* un parásito exitoso es su alta capacidad de diseminación por todo el organismo. Aunque todas las formas infectivas de *T. gondii* (esporozoíto, taquizoíto y bradizoíto) tienen capacidad de invasión celular, el taquizoíto es la forma con mayor capacidad de diseminación tisular (Mondragón, 2014). Después de la infección por vía oral, el parásito invade y atraviesa el epitelio intestinal para alcanzar los capilares y diseminarse por los tejidos, logrando atravesar barreras biológicas importantes (Figura 4), como la placenta y la barrera hematoencefálica (Barragán y Sibley, 2003), pudiendo causar problemas congénitos en fetos (Desmonts y Couvreur, 1974), afectaciones neurológicas en individuos inmunocomprometidos (Luft et al., 1993) y daño ocular en hospederos sanos (Roberts y McLeod, 1999). En *T. gondii* el mecanismo exacto por el cual logra atravesar estas barreras aún se desconoce (Ueno y Lodoen, 2015).

Aunque el proceso de diseminación tisular para muchos patógenos es poco conocido, se ha propuesto podría deberse a la expresión y secreción de proteasas, de manera similar a lo que se observa en procesos de migración de células cancerígenas (Kim, 2004).



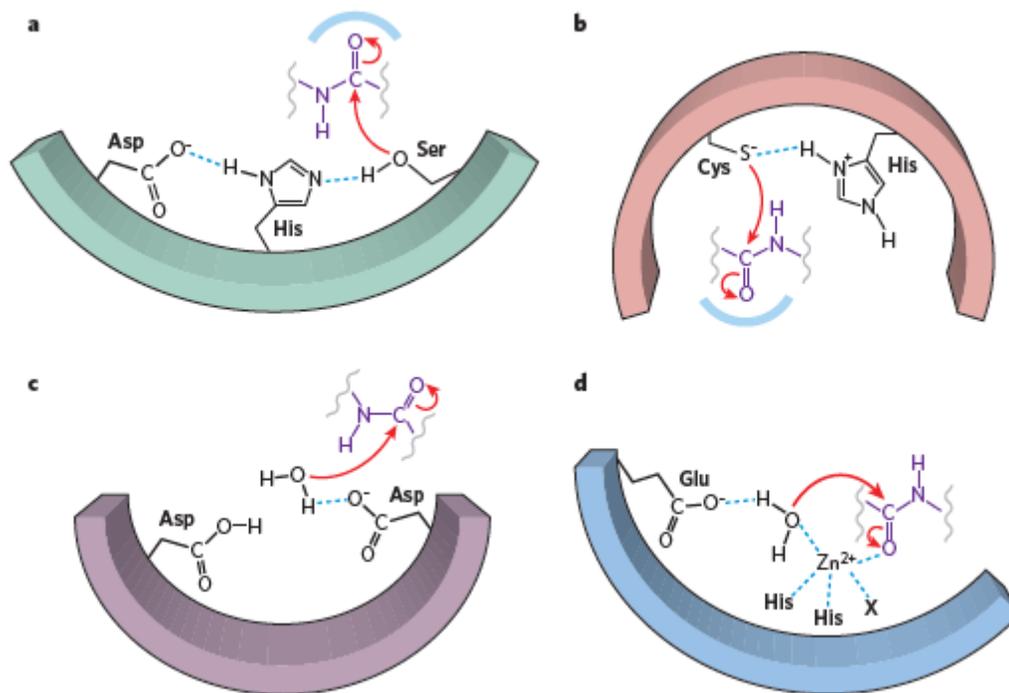
**Figura 4. Diseminación de *T. gondii* a través de barreras biológicas.** *Toxoplasma gondii* atraviesa inicialmente el epitelio intestinal y se disemina a los tejidos. Atraviesa barreras biológicas como la placenta y la barrera hematoencefálica para alcanzar sitios inmunológicamente privilegiados en donde se observan las patologías más severas. Tomada de Barragán y Sibley, 2003.

## 2.7 Proteasas

Las proteasas, también conocidas como enzimas proteolíticas, proteinasas o peptidasas son proteínas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos (Sajid y McKerrow, 2001; Erez et al 2009). Forman uno de los más grandes e importantes grupos de enzimas (Power et al, 2002). Se encuentran ampliamente distribuidas en todas las formas de vida, desde virus hasta vertebrados, y comprenden, con muy pocas variaciones, alrededor del 2% de todos los genes expresados entre los organismos (Sajid y McKerrow, 2001; Puente et al, 2005; Rani et al, 2012).

Estas proteínas están involucradas en la catálisis de una amplia variedad de procesos biológicos importantes como son: digestión, coagulación sanguínea, fertilización, diferenciación celular y crecimiento, señalización celular, respuesta inmune y apoptosis (Power et al, 2002; Rakashanda et al, 2012; Rani et al, 2012).

Las proteasas han sido clasificadas en cuatro grandes grupos con base en los residuos presentes en el sitio catalítico: aspártico proteasas, cisteína proteasas, serina proteasas y metaloproteasas (Figura 5) (Barret,1994; Coombs y Mottran, 1997; Sajid y McKerrow, 2001; Power et al, 2002).



**Figura 5. Mecanismo proteolítico de los grupos de proteasas.** a: Serina proteasas; b: Cisteína proteasas; c: Aspártico proteasas; d: Metaloproteasas. Las flechas rojas indican el movimiento de los pares de electrones, líneas punteadas azules representan puentes de hidrógeno u otras interacciones electrostáticas. Tomada de Erez et al, 2009.

### *2.7.1 Aspártico proteasas*

También conocidas como proteasas ácidas debido a que su pH óptimo de actividad fluctúa entre valores 3-4.5 (McKerrow et al, 1993; Rani et al, 2012), son endopeptidasas formadas por dos lóbulos separados por una hendidura en donde se encuentra el sitio catalítico (Rakashanda et al, 2012).

Las aspártico proteasas tienen dos residuos de ácido aspártico, muy conservados entre especies, de los cuáles se valen para su actividad utilizando un mecanismo ácido-base, mediante el que una molécula de agua es activada por la abstracción de un protón para atacar al carbonilo del enlace peptídico (Figura 5) (McKerrow et al, 1993; Erez et al.,2009; Rani et al, 2012).

El inhibidor clásico utilizado en su caracterización es la pepstatina A (Barrett, 1994).

### *2.7.2 Cisteína proteasas*

Las cisteína, tiol o sulfhidril proteasas (Figura 5) (Barret, 1994) constituyen un grupo de alrededor de 20 familias de proteínas (Sajid y McKerrow, 2001).

Son proteasas que forman un enlace covalente enzima-sustrato (Erez et al, 2009) y para su actividad dependen de una diada consistente en una cisteína y una histidina; el átomo de azufre de la cisteína actúa como nucleófilo y la histidina como donador de protones (Sajid y McKerrow, 2001; Rani et al, 2012).

El pH al cual estas proteasas tienen actividad óptima se encuentra en el rango de 5.0-7.0 (McKerrow et al, 1993; Sajid y McKerrow, 2001).

A nivel fisiológico, las cisteína proteasas median tanto funciones generales como catabolismo intracelular de proteínas y funciones especializadas entre las que destacan: la activación selectiva de moléculas de señalización

(interleucinas, PKC) y la degradación de proteínas extracelulares (Rakashanda et al, 2012).

La actividad de estas proteínas se inhibe con E64 (Barret, 1994).

### *2.7.3 Serina proteasas*

Es el más grande grupo de proteasas. Todas tienen tres aminoácidos en su sitio activo: una serina, una histidina y un aspártico, que comprenden la triada catalítica. Esta familia toma su nombre del residuo de serina, cuyo grupo hidroxilo está involucrado en la unión y en el ataque nucleofílico al sustrato (Figura 5) (McKerrow et al, 1993; Erez et al, 2009; Rani et al, 2012).

Las serina proteasas hidrolizan enlaces peptídicos con leucina, tirosina y fenilalanina (Rani et al, 2012). A menudo existen como zimógenos y son activadas por proteólisis específica (Rakashanda et al, 2012).

El pH óptimo de actividad de las serina proteasas varía de 7.0 a 11.0 (Rani et al, 2012).

Se conoce que las proteasas pertenecientes a este grupo se encuentran relacionadas con procesos que intervienen en el crecimiento celular y diferenciación (Rakashanda et al, 2012).

Para su caracterización, la actividad de estas enzimas puede ser inhibida con PMSF, TPCK o TLCK.

### *2.7.4 Metaloproteasas*

Las metaloproteasas son proteínas que dependen de un ion metálico divalente que se encuentra en el sitio activo, y que juega un rol clave en la unión al sustrato (Figura 5) (McKerrow et al, 1993; Rani et al, 2012).

Se pueden distinguir dos familias de metaloproteasas: las ADAM (metaloproteasas-desintegrinas) y las MMP (metaloproteasas de matriz extracelular o matrixinas).

La familia de ADAMs comprende proteínas multifuncionales de membrana, asociadas a neurogénesis, modulación de la migración y adhesión de las células tumorales, activación de vías señalizadoras y liberación de factores de crecimiento unidos a membrana (Cascales y Álvarez-Gómez, 2009), por lo que regulan indirectamente la proliferación celular y se implican en procesos cancerígenos (Mochizuki y Okada, 2007).

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) son una familia de proteasas neutras que degradan componentes de matriz extracelular. Contienen zinc y dependen de calcio para su actividad (Visse y Nagase, 2003; Cascales y Álvarez-Gómez, 2009). Se distinguen entre ellas 8 grupos estructurales: 5 de MMP secretadas y 3 de MT-MMP (asociadas a membrana) (Cascales y Álvarez-Gómez, 2009).

Las MMP son sintetizadas como zimógenos inactivos, con un propéptido o prodominio que contiene un switch de cisteína (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1993; Springman et al, 1990), que se activa por proteólisis atendiendo a un mecanismo de interacción proteína-proteína (Rosenblum et al, 2007).

En general, las metaloproteasas ocupan un importante rol en el desarrollo, la regulación de la homeostasis del medio extracelular y la inmunidad innata (Moot y Werb, 2004; Sternlicht y Werb, 2001; Cascales y Álvarez-Gómez, 2009). Se sabe que cambios en la expresión de estas proteasas se relacionan con procesos patológicos como como cáncer, artritis, asma y arteroesclerosis (Overall y Kleifeld, 2006; Cascales y Álvarez-Gómez, 2009).

Para su estudio, la actividad de metaloproteasas puede ser inhibida por quelantes de iones divalentes, como EGTA y 1, 10 fenantrolina (Barret, 1994).

## 2.8 Proteasas en *T. gondii*

Las proteasas, como ya se ha mencionado en este escrito, se encuentran ampliamente distribuidas, de manera que se les puede hallar en prácticamente todas las formas de vida, incluyendo protozoarios como *Toxoplasma gondii*, modelo en el cual, aunque los estudios al respecto son aún escasos, se han descrito una serie de proteasas con diferente localización y función en el parásito.

- a) TgSUB1: es una proteína de 85 kDa con actividad de serina proteasa relacionada con los micronemos. Se encuentra anclada a la membrana y es liberada a la superficie durante el proceso de invasión (Binder et al, 2008). Se sabe involucrada en el proceso de *gliding* del parásito, así como en el procesamiento de proteínas como: MIC4, MIC2 y el complejo M2AP-MIC1 (Lagal et al, 2010).
- b) TgSUB2: es una serina proteasa que se procesa por autocatálisis a partir de un precursor de 140 kDa. Se localiza en las roptrías y está involucrada en el procesamiento de la proteína ROP1 (Steven et al, 2003).
- c) TgCPB: es una cisteína proteasa de aproximadamente 30 kDa que se procesa por TgCPL a partir de una proforma de 63 kDa (Dou, 2012). Se localiza en el Compartimiento Acídico Vacuolar (VAC) del taquizoíto. Aunque anteriormente se atribuía a esta proteasa un papel en la biogénesis de las roptrías y la maduración de proteínas ROP (Que et al, 2002), un nuevo estudio ha demostrado que estos procesos se llevan a cabo de manera independiente a esta enzima (Dou, 2012), por lo que su función exacta aún permanece sin describirse.
- d) TgCPL: es una proteína de tipo cisteína proteasa de 47 kDa. En ensayos *in vitro* se ha observado que su maduración se da por autoprosesamiento, (Dou, 2012) sin embargo, el proceso completo *in vivo* no ha sido reportado. Está involucrada en el procesamiento de MIC3 y del complejo

M2AP-MIC1. Es una de las dos proteasas que se ha reportado se almacenan en el denominado Compartimiento Acídico Vacuolar (VAC) del parásito (Parussini et al, 2010; Dou, 2012).

- e) Toxolisina 1: es una metaloproteasa de 182 kDa de peso molecular que se procesa y almacena en las roptrías. Es secretada durante el proceso de invasión celular y se ha encontrado presente en la VP (Hajagos et al, 2012). A la fecha, su papel específico en los procesos llevados a cabo por el parásito no se conoce.
- f) Toxolisina 4: es una metaloproteasa de la familia M16A. Se calcula tiene un peso de 256 kDa. Se localiza principalmente en los micronemos, y su secreción es dependiente de calcio. Se hipotetiza que podría contribuir a la degradación del citoesqueleto de la célula hospedera durante el egreso de los parásitos, o bien, al procesamiento de proteínas MIC (Zhou et al, 2005; Laliberté y Carruthers, 2011).
- g) ROM1: es una serina proteasa localizada en los micronemos, que es importante es el proceso de división y crecimiento del parásito (Brossier et al, 2008).
- h) ROM4: es una serina proteasa de 69 kDa. Se encuentra uniformemente distribuida en la superficie del parásito. Es importante en la eficiencia de invasión del parásito, ya que se encarga del procesamiento de adhesinas (AMA, MIC2, MIC6 y MIC8) de unión a la célula hospedera, y con ello facilita el movimiento de parásito al inicio del proceso de invasión activa (Shen et al, 2014; Rugarabamu et al, 2015).
- i) ROM5: esta serina proteasa se encuentra en el extremo posterior del parásito y tiene un peso molecular aproximadamente de 92 kDa. Junto con la proteína ROM4, es indispensable para la sobrevivencia del parásito. Se sabe involucrada en el procesamiento intramembranal de proteínas AMA (Opitz et al, 2002; Rugarabamu et al, 2015).

## 2.9 Proteasas en protozoarios patógenos

Las enfermedades por protozoarios patógenos representan un problema de salud global. De entre varios factores clave identificados para la virulencia de los parásitos, uno de los más estudiados son las proteasas (McKerrow et al, 2006).

### 2.9.1 Protozoarios extracelulares

En *Entamoeba histolytica* (Figura 6), agente causal de la amebiasis, se han identificado diversos factores que contribuyen a la virulencia de las cepas. Entre ellos, se encuentran las cisteína proteasas y las metaloproteasas (Reed, 1995; Que y Red, 2000). Se sabe que la mayor actividad proteolítica intra y extracelular del parásito está dada por las cisteína proteasas (McKerrow et al, 1993).

a) EhCP1, EhCP2, EhCP5: se propone contribuyen a la activación del ameboporo (Montford et al, 1993), afectan la integridad del epitelio intestinal e inducen inflamación patológica (Hellberg et al, 2001; Reed, 1995; Que y Red, 2000; Zhang et al, 2000).

Se ha comprobado además que varias cisteína proteasas de esta ameba degradan componentes de matriz extracelular (Luaces y Barret, 1988; Ocádiz et al, 2005; Li et al, 1995; Schulte y Scholze, 1989) y que la actividad colagenolítica está correlacionada con la virulencia de las cepas (Gadasi y Kessler, 1983; Muñoz et al, 1984; Reed et al, 1989).

***Giardia intestinalis***. También conocido como *G. lamblia* o *G. duodenalis*, es el parásito intestinal más prevalente en todo el mundo y el mayor contribuyente a enfermedades diarreicas en humanos (McKerrow et al, 1993; Muller et al, 2005). Se ha observado que los productos de secreción presentan actividad colagenolítica (Williams y Coombs, 1995; Coradi y Guimaraes, 2006) debida principalmente a cisteína proteasas (Figura 6) (Carvalho et al, 2008), por lo que se sugiere la participación de éstas en el

proceso de adhesión a las células epiteliales por este patógeno (Coradi y Guimaraes, 2006).

***Acanthamoeba spp.*** Es una ameba de vida libre capaz de causar enfermedades en humanos, principalmente en individuos inmunocomprometidos (Piña-Vázquez et al, 2012). Expresa elastasas (Ferrante y Bates, 1988), SP (Hadas y Mazur, 1993; Serrano-Luna et al., 2006), CP (Serrano-Luna et al., 2006) y MMP (Khan, et al, 2000; Sissons et al., 2006). Se ha estudiado una mejoría en la colonización debida a proteasas presentes en los productos de secreción de la ameba (Mitro et al, 1994). Este parásito tiene además muchas proteasas (SP, CP, MMP) que son capaces de degradar componentes de Matriz Extracelular, principalmente colágena I y IV, fibronectina, elastina y hemoglobina (Piña-Vázquez et al., 2012; He et al, 1990; Mitro et al, 1994; Kong et al, 2000; Na et al, 2001; Sissons et al, 2006; Kim et al, 2003; Ferreira et al, 2009; De Souza et al, 2011) (Figura 6) y que podrían con ello estar implicadas en la patogenicidad de la ameba.

***Naegleria spp.*** es el agente causal de la meningoencefalitis amebiana, una enfermedad fatal en humanos que se inicia con la invasión vía la mucosa nasal (Aldape et al, 1994).

Se sabe que esta ameba expresa y secreta cisteína proteasas que degradan elastina y colágena (Serrano-Luna et al, 2007), mejoran la colonización y juegan un rol en la patogenicidad (Aldape et al, 1994) (Figura 6).

El estudio de los factores de virulencia en *Naegleria* continúa siendo escaso. En la actualidad se ha planteado considerar a las proteasas de este organismo como posibles blancos farmacológicos (Piña-Vázquez et al, 2012).

***Trichomonas vaginalis*** es un protozoario flagelado responsable de la tricomoniasis, una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en humanos (Álvarez-Sánchez et al, 2000). Es uno de los protozoarios más

ricos en contenido de proteasas en la naturaleza, con al menos 450 genes que codifican para éstas (Carlton et al, 2007). *T. vaginalis* constantemente libera proteasas de los lisosomas al medio extracelular (Alderete et al. 1991; Bozner et al. 1992; Garber y Lemchuk-Favel, 1994) (Figura 6).

a) CP30: es una cisteína-proteasa de 30 kDa de peso molecular que degrada colágena IV y fibronectina. Está involucrada en la adhesión a células epiteliales (Mendoza-López et al, 2000).

b) TvCP39: es una proteína de 39 kDa de peso molecular que degrada colágena I, II, IV y V, además de fibronectina. Es secretada durante la invasión activa (Hernández-Gutiérrez et al, 2004).

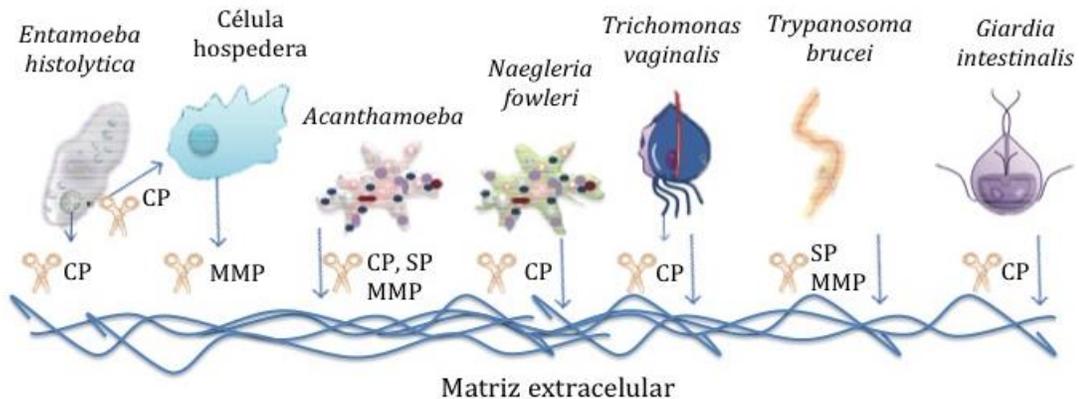
c) TvCP65: es una cisteína proteasa localizada en la membrana plasmática que degrada colágena IV y fibronectina. Es importante para la citotoxicidad del protozooario (Álvarez-Sánchez et al, 2000).

***Trypanosoma brucei*** es el protozooario parásito responsable de la tripanosomiasis africana. Se sabe que secreta proteasas, principalmente de tipo MMP que degradan fibronectina, colágena y laminina y le permiten migrar a través de los tejidos (Huet et al, 1992) (Figura 6). Otras proteasas juegan un papel en fases agudas de la enfermedad, cuando el parásito es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

a) GP63: es una metaloproteasa dependiente de zinc altamente conservada entre especies que degrada colágena I (Bangs et al, 2001).

b) Brucipaina: induce la activación de señalización dependiente de  $Ca^{2+}$  que permite al parásito cruzar la barrera hematoencefálica. Degrada Colágena I y elastina (Grab et al, 2009).

c) TbCatB: Es una enzima con actividad cisteína proteasa que degrada colágena I (Mackey et al, 2004).



**Figura 6. Proteasas de parásitos extracelulares.** CP: cisteína proteasas; SP: serina proteasas y MMP: metaloproteasas de matriz extracelular. Tomada de Ramírez-Flores (2015) y modificada de (Piña-Vázquez et al., 2012).

### 2.9.2 Protozoarios intracelulares

**Leishmania** es un parásito protozoario de macrófagos de vertebrados que produce lesiones cutáneas y en mucosas (Leishmaniasis). Afecta a aproximadamente 12 millones de personas en 88 países diferentes (McKerrow et al, 2006). Este protozoario cuenta con proteasas a las cuáles se han atribuido importantes funciones en la patogenicidad del mismo (Figura 7). Entre ellas se pueden citar:

- b) Leishmanolisina: facilita la unión a los macrófagos y degrada componentes de Matiz extracelular (Chen et al, 2000; McGwire et al, 2003; McKerrow et al, 1993; Piña-Vázquez et al, 2012).
- c) CPA, CPB, CPC: tienen un papel en la invasión celular y degradación de moléculas de respuesta inmune (Bart et al, 1997; Mottram et al, 1996).

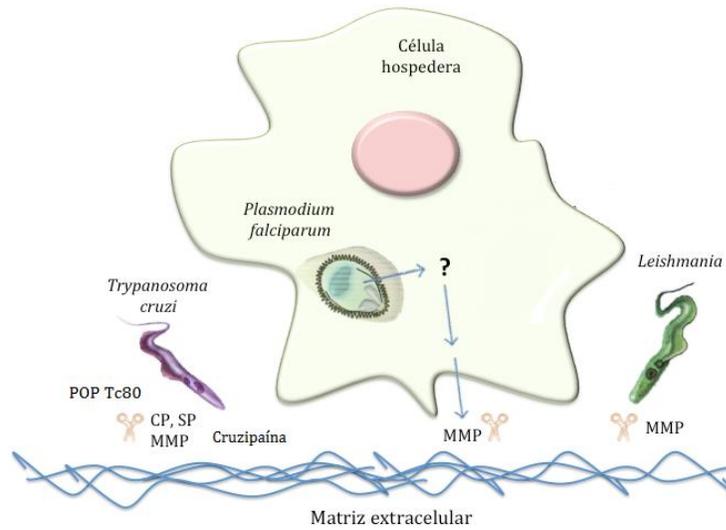
**Trypanosoma cruzi**, el agente causal de la enfermedad de Chagas se aloja en el citoplasma de las células hospederas, por lo que las proteasas que produce (Figura 7) están en contacto directo con componentes celulares, y se sugiere que juegan un importante rol en el daño a tejido cardiaco, característico de la enfermedad.

- a) Cruzipaina: también conocida como cruzaina o GP57/51. Es una cisteína proteasa responsable de la mayor parte de la actividad proteolítica de este protozoo. Tiene funciones diferentes de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que el parásito se encuentre o dependiendo de la isoforma (McKerrow et al, 2006). Es capaz de funciones tan diversas como degradación de nutrientes, degradación de colágena y fibronectina (Murta et al, 1990; Cazzulo et al, 2002), replicación (McKerrow et al, 1993) hasta mediación de la invasión por unión a receptores (Scharfstein et al, 2000; Aparicio et al, 2004).
- b) Penetrina (GP63): es una proteína de superficie que promueve la adhesión a componentes de matriz extracelular (heparán sulfato y colágena) (Ortega-Barria y Pereira, 1991).
- c) POPTc80: serina proteasa que cataliza la hidrólisis de componentes de Matriz extracelular (Santana et al, 1997).

***Plasmodium falciparum***. Este parásito produce la enfermedad llamada malaria y afecta a cerca de un millón de personas cada año (OMS, 2005).

Diferentes tipos de proteasas son requeridas por el parásito durante la invasión y la ruptura de los eritrocitos (McKerrow et al, 1993). Se ha sugerido que en el primer proceso (invasión) participan serina proteasas, como la falcipaina 1, falcipaina 2 y PfSUB2 (Greenbaum, 2002), y en la ruptura de los eritrocitos el papel más importante sería el de cisteína proteasas, que junto a las aspártico proteasas (plasmepsinas 1 y 2) cumplen un rol adicional de hidrólisis de globina para obtener nutrientes para el parásito (McKerrow et al, 1993; Mayer et al, 1991; Schrevel et al, 1988; Coombs y Mottran, 1997).

Además de las proteasas propias, aparentemente *P. falciparum* induce la expresión de otras del hospedero, como se ha observado en pacientes con malaria severa, que presentan altos niveles de MMP-9 (Prato et al, 2005) (Figura 7).

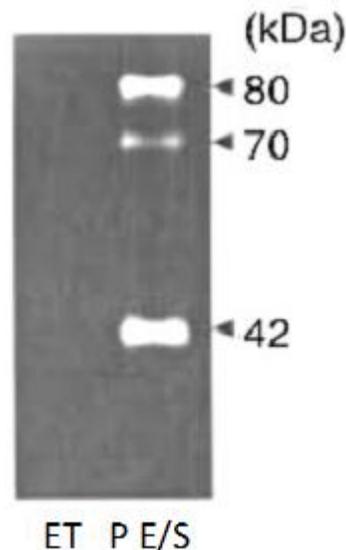


**Figura 7. Proteasas de parásitos intracelulares.** CP: cisteína proteasas; SP: serina proteasas y MMP: metaloproteasas de matriz extracelular. Modificada de Piña-Vázquez et al., 2012.

### 3.0 Antecedentes directos

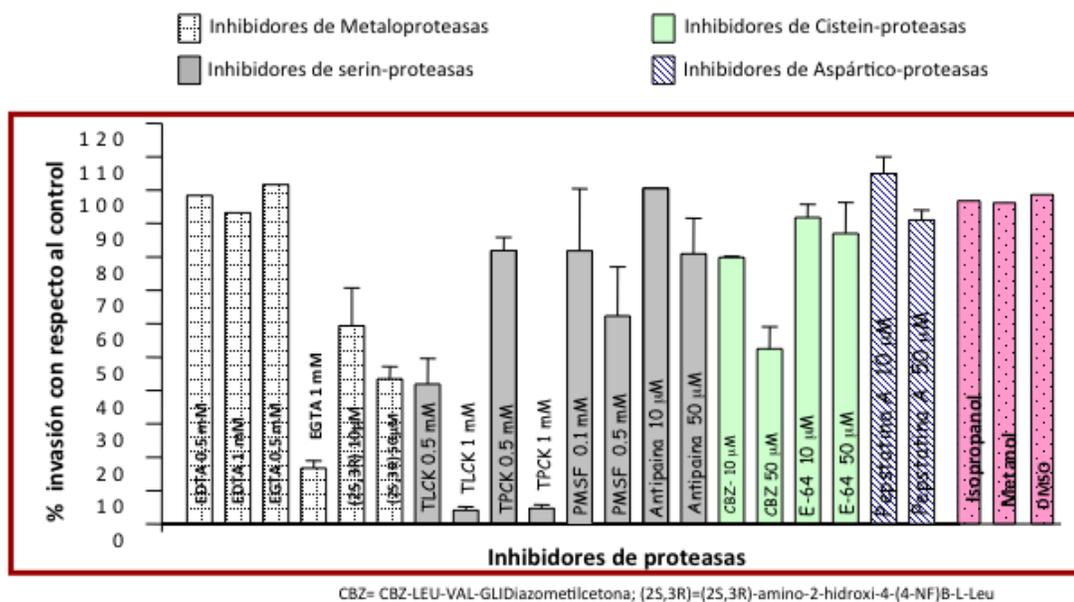
Los estudios de detección de proteasas de secreción constitutiva o inducida en *T. gondii* son muy escasos. En general, los trabajos con proteasas en el parásito abordan cuestiones de procesamiento intracelular de las mismas, y en menor frecuencia acerca de su función. Por otra parte, los estudios sobre estimulación o inducción de la secreción en *T. gondii* centran su atención en la secreción de proteínas MIC (Brown et al,2016; Carruthers et al, 1999), pero no en la secreción de proteasas.

En 2003, Song y Nam, analizaron mediante zimografía en geles copolimerizados con gelatina muestras de ET y productos de E/S de taquizoítos en busca de caracterizar las proteasas ahí presentes, y reportaron tres proteasas de 42, 70 y 80 KDa presentes en los productos de E/S; sin embargo, no encontraron actividad proteolítica en los ET (Figura 8). Acerca de la proteasa de 80 kDa, reportaron que su actividad es dependiente de  $Ca^{2+}$  y de pH neutro; que se inhibe con EGTA, EDTA y 1,10 fenantrolina, por lo que pertenece al grupo de MP.



**Figura 8. Perfil proteolítico de ET y productos de E/S de taquizoítos aislados de ratón (Song y Nam, 2003).**

En nuestro laboratorio, la M. en C. Tais Nopal Guerrero como parte de su proyecto de maestría, analizó el papel de proteasas en el proceso de invasión a células HEP-2, esto utilizando diferentes inhibidores, como son EGTA, PMSF, TPCK, TLCK, CBZ-LEU-VAL-GLI-Diazometilcetona. Con base en sus resultados, tras observar bloqueos evidentes en la invasión celular cuando se daba el tratamiento con inhibidores de proteasas, sugirió que proteasas de diferentes grupos están involucradas en el proceso (Nopal-Guerrero, 2003) (Figura 9).

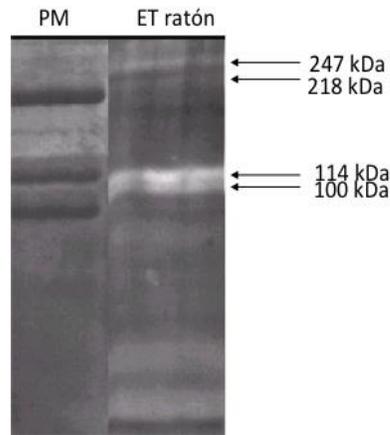


CBZ= CBZ-LEU-VAL-GLI-Diazometilcetona; (2S,3R)=(2S,3R)-amino-2-hidroxi-4-(4-NF)B-L-Leu

**Figura 9. Invasión celular por taquizoítos pre-tratados con inhibidores de proteasas.** Los taquizoítos purificados se incubaron con los inhibidores de proteasas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 40 min previos al ensayo de invasión. Los controles negativos fueron los solventes: metanol al 0.30%, isopropanol al 0.13% y DMSO al 0.21% (utilizados en la preparación de los diferentes inhibidores). Se contaron un total de 200 células para cada condición y por triplicado (p<0.01). Tomado de Nopal-Guerrero (2003).

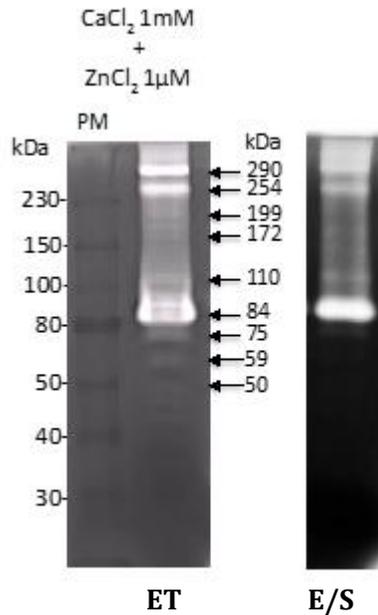
Dentro del mismo trabajo, se realizaron además ensayos zimográficos con ET de taquizoítos aislados de modelo murino en geles de poliacrilamida copolimerizados con colágena I/III, encontrando, en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, actividad proteolítica de cuatro bandas, sugiriendo que la degradación era debida a proteínas de tipo MP (Nopal-Guerrero, 2003). Con ello, se evidenció

por primera vez en el laboratorio la presencia de proteasas en extractos totales de taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH detectables mediante zimografía (Figura 10), resultado que contrasta con lo reportado por Song y Nam (2003), esto debido probablemente a las diferencias tanto de sustrato utilizado para copolimerizar los geles, como de procesamiento de los mismos.



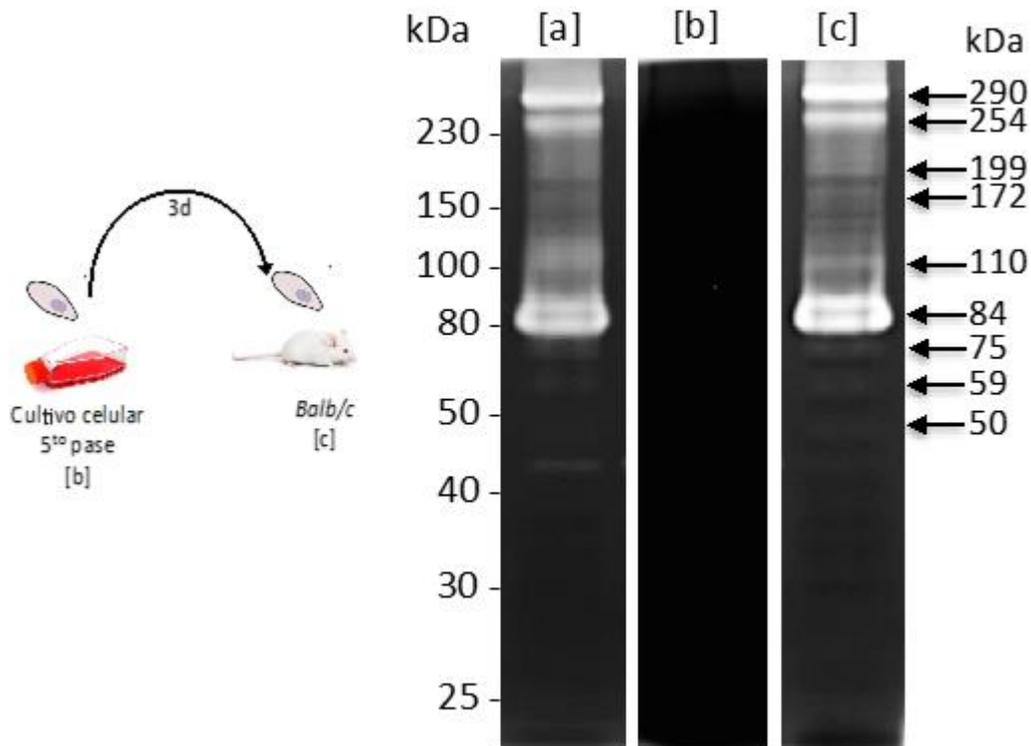
**Figura 10. Zimograma en colágena I/III.** Actividad proteolítica de extractos totales de *T. gondii* en presencia de  $\text{CaCl}_2$  1mM. PM: peso molecular, ET: Extracto total de taquizoítos de la cepa RH aislados de ratón. Tomada de Nopal-Guerrero, 2003.

En 2015, también en nuestro laboratorio, el M.C. Carlos Jorge Ramírez Flores analizó muestras de ET de taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH (altamente virulenta) aislados del modelo murino mediante ensayos zimográficos bajo diferentes condiciones. Reportó entonces las condiciones óptimas para detectar en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina, al menos 9 proteasas presentes en ET con pesos de entre 50 y 290 KDa, todas sensibles a quelantes de iones divalentes como EGTA y 1, 10 fenantrolina, por lo cual indicó que se trata de metaloproteasas. Adicionalmente, detectó al menos 5 proteasas en los productos de E/S, también sensibles a EGTA y 1, 10 fenantrolina (Ramírez-Flores, 2015) (Figura 11).



**Figura 11. Perfil proteolítico de extractos totales y productos de secreción de *Toxoplasma gondii* (RH).** La actividad proteolítica de ET  $10 \times 10^6$  y los productos de E/S de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón se evaluó en condiciones óptimas. Gel acrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular. ET: extractos totales. E/S: productos de excreción-secreción. Tomado de Ramírez-Flores, 2015.

Posteriormente, analizó mediante zimografía y bajo las condiciones óptimas encontradas, muestras de ET y productos de E/S de taquizoítos de la cepa RH aislados de cultivo celular, y encontró una disminución en la actividad de todas las proteasas presentes en los parásitos aislados del modelo murino, misma que se recuperó totalmente al reingresar a los parásitos al modelo *in vivo* (Figura 12). Ramírez-Flores propuso que la expresión diferencial de estas proteasas era debida a una adaptación del parásito al cultivo celular en donde se carece de moléculas como componentes de matriz extracelular, factores del complemento y respuesta inmune, por lo que el parásito pierde la capacidad de expresar las proteasas que en ratón expresa abundantemente.



**Figura 12. Retorno de la expresión de proteasas en taquizoítos aislados de cultivo celular y reingresados a ratón.** (a) Control de actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón; (b) extracto total de taquizoítos pertenecientes al 5to pase, misma muestra que se inoculó en ratón y (c) extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos reingresados a ratón. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. Tomado de Ramírez-Flores, 2015.

## 4.0 Justificación

*Toxoplasma gondii* posee una gran capacidad de diseminación tisular, incluso hacia órganos importantes protegidos por barreras inmunoprivilegiadas. Sin embargo, el mecanismo que el parásito utiliza en su proceso de migración no se conoce por completo.

Recientemente se ha descrito la expresión y secreción de proteasas por la forma infectiva del parásito mantenida en un modelo murino, que no se presentan en el modelo mantenido en cultivo. Moléculas fisiológicas presentes en el hospedero, pero no en cultivo celular podrían entonces funcionar como activadores de la expresión y secreción de estas proteasas. En los resultados previos descritos, las proteasas detectadas y caracterizadas corresponden a proteasas con expresión constitutiva ya que aún en solución salina, el parásito las secreta constantemente sin una aparente activación previa.

No obstante se han descrito a las proteasas TgSUB1, a la toxolisina 1 y a la toxolisina 4, todas ellas secretadas a partir de organelos secretores durante la invasión, se desconoce a la fecha las moléculas o condiciones que inducen su secreción o incluso si existen otras proteasas que también son secretadas por condiciones fisiológicas particulares.

Por lo anterior, la descripción del factor o factores que inducen la expresión y secreción de proteasas en *Toxoplasma gondii* permitiría definir bases de estudio del proceso de invasión celular y de la diseminación tisular.

## 5.0 Hipótesis

Ciertas moléculas fisiológicas o componentes presentes en el hospedero (componentes de matriz extracelular, componentes de plasma, moléculas de respuesta inmune, etc.) podrían actuar como un sistema de activación para la síntesis y secreción de enzimas con actividad proteolítica en el parásito *Toxoplasma gondii*, a fin de permitir la invasión celular y facilitar la migración y diseminación tisular de los parásitos.

## 6.0 Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Identificar moléculas y componentes fisiológicos del hospedero que induzcan la secreción/activación de proteasas de *Toxoplasma gondii* y caracterizar las propiedades bioquímicas de las proteasas inducidas/activadas.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Corroborar la presencia de proteasas en extractos totales de taquizoítos aislados de ratón y su ausencia en taquizoítos aislados de cultivo celular.
2. Evaluar el efecto de la interacción de componentes del hospedero en la secreción/activación de proteasas de taquizoítos de *T. gondii*.
3. Identificar y caracterizar la(s) proteasa(s) secretadas por taquizoítos como resultado de la interacción con los componentes biológicos evaluados.
4. Caracterizar las posibles vías de señalamiento involucradas en la secreción de proteasas por taquizoítos de *T. gondii* inducida por la interacción con las moléculas inductoras seleccionadas.

## **7.0 Métodos**

### **7.1 Animales**

Los ratones hembras de la cepa BALB/c utilizados para mantener al parásito se mantuvieron bajo condiciones ambientales reguladas de temperatura, humedad y aire filtrado. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco. Los animales se mantuvieron de acuerdo con lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

### **7.2 Mantenimiento de parásitos de *T. gondii* cepa RH en cultivo celular**

Para mantener la cepa RH de *T. gondii* en cultivo celular, se infectaron monocapas sub-confluentes de células HEp-2 en MEM suplementado con SFB al 8%, penicilina 20 U.I./ml y estreptomycinina 20 µg/ml y fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los parásitos se cosecharon del sobrenadante del cultivo celular en MEM sin suero. La suspensión rica en parásitos se purificó mediante varios ciclos de centrifugaciones a baja velocidad a 1700 rpm y mediante resuspensión de la pastilla de parásitos en MEM estéril sin suero. También se filtraron a través de filtros de policarbonato de 5 µm de diámetro. Para mantener la cepa, se re-infectaron nuevas botellas sub-confluentes de células HEp-2.

### **7.3 Mantenimiento de parásitos de *T. gondii* cepa RH en modelo murino**

Los parásitos se mantuvieron mediante inoculaciones intraperitoneales en ratones hembra de la cepa BALB/c, como se reportó previamente (Mondragón y Frixione, 1996). Tres o cuatro días post-inoculación los ratones infectados son sacrificados por dislocación cervical, y se realizan exudados intraperitoneales con PBS estéril (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1 mM, pH 7.2) para obtener una suspensión rica en

taquizoítos, misma que se purifica mediante lavados a 1700 rpm/10 min y una posterior resuspensión del botón celular en PBS estéril. Los parásitos se someten además a una purificación adicional haciéndolos pasar por filtros de policarbonato de 5  $\mu$ M de diámetro que permite eliminar macrófagos y contaminantes celulares. Se inocularon 2 ratones sanos para el mantenimiento de la cepa.

Durante el manejo de taquizoítos se siguieron las medidas de bioseguridad para el manejo de patógenos de tipo II ("Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2009).

#### **7.4 Determinación de viabilidad celular por exclusión con azul de tripano**

Para determinar el porcentaje de viabilidad de los taquizoítos tras el periodo de secreción, se utilizó azul de tripano 10% y se contabilizó en cámara de Neubauer el número de parásitos que incorporaron o no el colorante.

#### **7.5 Preparación de extractos totales de taquizoítos**

El botón celular resultante de la centrifugación tras el periodo de secreción de los parásitos ( $20 \times 10^6$  parásitos) fue resuspendido en amortiguador para Zimografía (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, Glicerol 20% y 0.002% de Azul de bromofenol, pH 6.8) en ausencia de inhibidores de proteasas y agentes reductores. Las muestras fueron sonicadas en hielo a 40 Hz (Procesador Ultrasonico GE 130PB Cole-Parmer) 4 veces durante 15 s en lapsos separados por 1 min.

#### **7.6 Estimulación de taquizoítos con las moléculas elegidas como factores de inducción**

Los taquizoítos, aislados de cultivo celular o de ratón, y purificados fueron contados en cámara de Neubauer y se ajustaron alícuotas de  $20 \times 10^6$  parásitos que fueron colocadas en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y

resuspendidas en 100 µl de DMEM sin suero, conteniendo la concentración elegida del factor a probar (Los factores elegidos, así como las concentraciones utilizadas de cada uno se enlistan en la Tabla 1). La suspensión de parásitos fue incubada durante 4 h a 37 °C sin agitación, que es el tiempo máximo en el cual la viabilidad del parásito no está comprometida. Una suspensión de parásitos igual tratadas, pero sin entrar en contacto con el factor a evaluarse fue utilizado como control negativo. Después de la incubación, se realizaron 3 ciclos de centrifugaciones suaves (1700rpm/10min/TA) para asegurar la separación de los parásitos. El sobrenadante recuperado (productos de secreción inducida) se precipitó mediante la técnica de metanol-cloroformo. La proteína obtenida se resuspendió en amortiguador para Zimografía (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, Glicerol 20% y 0.002% de Azul de bromofenol, pH 6.8).

Cuando los ensayos fueron realizados con parásitos provenientes de cultivo celular, además de realizar lo anterior, se prepararon muestras de taquizoítos a los cuáles se permitió tras la estimulación durante 4 con el factor elegido, invadir botellas subconfluentes de células HEp-2. 72 h después, se recuperaron los taquizoítos externalizados y se realizó el correspondiente zimograma de ET y productos de E/S.

### **7.7 Inducción de la secreción de proteasas por interacción con BSA**

Se eligió BSA como un posible inductor de la secreción debido a que existen por una parte, un referente en *Trichoderma viride*, que se sabe secreta metaloproteasas en respuesta a estimulaciones con BSA (Simkovic et al, 2008). Además de ello, recientemente se ha descrito que en *T. gondii* se promueve también la secreción de proteínas MIC tras incubaciones de los taquizoítos con BSA (Brown et al, 2016).

Por lo anterior, la inducción de la secreción se realizó como a continuación se describe: los taquizoítos purificados fueron contados en cámara de Neubauer y se ajustaron alícuotas de  $20 \times 10^6$  parásitos que fueron

colocadas en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y resuspendidas en Albúmina Sérica Bovina a diferentes concentraciones en el rango de 0.05 a 3% en medio DMEM sin suero. La suspensión de parásitos fue incubada a 37°C por 30 min a fin de minimizar cualquier efecto que comprometiera la viabilidad de los parásitos, posterior a ello. Posteriormente, se retiró el inductor (Albúmina Sérica Bovina) mediante lavados de los parásitos por centrifugaciones suaves (1700 rpm/ 10min/TA) con PBS estéril. Se volvió a resuspender a los taquizoítos en medio DMEM sin suero en ausencia de la BSA y se les mantuvo durante 2 h a 37°C. Un bloque de suspensiones de parásitos igual tratadas, pero sin contacto con el inductor fue utilizado como control. El volumen de incubación fue de 100 µl. Para las incubaciones de 4 h, no se lavaron los parásitos. Después de terminada la correspondiente incubación, se realizaron 3 ciclos de centrifugaciones suaves (1700rpm/10min/TA) para asegurar la separación de los parásitos. El sobrenadante recuperado (productos de secreción inducida) se precipitó mediante la técnica de metanol-cloroformo. La proteína obtenida se resuspendió en amortiguador para Zimografía (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, Glicerol 20% y 0.002% de Azul de bromofenol, pH 6.8).

### **7.8 Precipitación de proteínas por la técnica de metanol-cloroformo**

La precipitación se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 ml, añadiendo a la muestra metanol, cloroformo y agua, en una proporción 1:4:1:3. Después de adicionar cualquiera de los componentes, los tubos se vortexearon, y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó la primera fase resultante y se agregaron 3 partes de metanol. Se llevaron los tubos a una segunda centrifugación en iguales condiciones. Se descartó el sobrenadante y la proteína precipitada se resuspendió en el amortiguador correspondiente de acuerdo al experimento a realizar (Friedman y Lilley, 2009; Wessel y Flügge, 1984).

## **7.9 Zimografía 1D**

Los ensayos de zimografía se realizaron como previamente se reportó (Heussen y Dowdle, 1980), con algunas modificaciones (Ramírez-Flores, 2015). Para ello, las proteínas obtenidas en los ensayos correspondientes (extractos totales y productos de secreción inducida) fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida 7.5% co-polimerizados o no con gelatina de piel porcina Tipo A, caseína o Albumina Sérica Bovina (BSA) 0.1% como sustratos. La electroforesis se inició a 80V y una vez la muestra se encontraba en la fracción de gel separador, el voltaje se incrementó a 120V hasta que el frente de corrida salió del gel.

Concluida la electroforesis, los geles se lavaron en amortiguador con Tritón X-100 2.5%, a diferentes pH (Acetato de Sodio 10 mM, pH 3.5; Tris-HCl 10 mM, pH 5.5; Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 o Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Posteriormente se activaron los geles en los mismos amortiguadores sin Tritón X-100 en presencia o no de Cofactores (CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) y agentes reductores (DTT y β-mercaptoetanol) a 37°C durante 24 h. Al terminar la incubación los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

## **7.10 Inhibición de proteasas en Zimografía**

Para determinar el tipo de proteasas mediante la utilización de inhibidores para las principales familias, se realizó la separación electroforética antes descrita y se añadió al amortiguador de activación el inhibidor de proteasas correspondiente (Nogueira de Melo et al, 2010). Las concentraciones utilizadas se basaron en reportes anteriores (Álvarez-Sánchez et al, 2000; Coradi y Guimaraes, 2006; Song y Nam, 2003; Vyas et al, 2014) , o bien, en la hoja técnica de cada producto, y fueron las siguientes: 1 y 5 mM para inhibidores de metaloproteasas (EGTA y 1,10 fenantrolina) y de serina proteasas (PMSF, TPCK, TLCK). Para los inhibidores de cisteína proteasas (E64) y aspártico proteasas (Pesptatina A) se utilizó 1 y 5 μM.

### **7.11 Evaluación del papel de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la secreción inducida de proteasas**

Los taquizoítos aislados y purificados de ratones infectados fueron contados en cámara de Neubauer y se ajustaron alícuotas de  $20 \times 10^6$  parásitos que fueron colocadas en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y resuspendidas en: a) solución salina libre de Ca<sup>2+</sup>, b) solución de Ca<sup>2+</sup> 1 mM, c) solución de BAPTA-AM a cualquiera de las siguientes concentraciones: 25, 50, 100, 200  $\mu$ M. La suspensión de parásitos fue incubada a 37°C durante 1 h. Al finalizar se sometieron a un ciclo de revolución suave (1700 rpm/ 10 min) y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el botón de taquizoítos en BSA al 3% para un tubo disuelta en a) solución salina libre de Ca<sup>2+</sup> y para otro b) solución de Ca<sup>2+</sup> 1 mM, esto para cada concentración de BAPTA-AM utilizada. Los tubos fueron incubados 2 h a 37°C. Tras la incubación, se realizaron 3 ciclos de centrifugaciones suaves (1700rpm/10min/TA) para asegurar la separación de los parásitos. El sobrenadante recuperado (productos de secreción inducida) se precipitó mediante la técnica de metanol-cloroformo. La proteína obtenida se resuspendió en amortiguador para Zimografía (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, Glicerol 20% y 0.002% de Azul de bromofenol, pH 6.8).

### **7.12 Efecto de inhibidores de PKC y PP2C en la secreción de proteasas**

Los taquizoítos aislados y purificados de ratones infectados fueron contados en cámara de Neubauer y se ajustaron alícuotas de  $20 \times 10^6$  parásitos que fueron colocadas en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y resuspendidas en: a) solución salina libre de Ca<sup>2+</sup> ó en b) solución del inhibidor a evaluar. La suspensión de parásitos fue incubada a 37°C durante 1 h. Al finalizar se sometieron a un ciclo de revolución suave (1700 rpm/ 10 min) y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el botón de taquizoítos en BSA al 3% disuelta en PBS y en presencia del correspondiente inhibidor. Los tubos fueron incubados 30 min a 37°C. Pasado este tiempo, los parásitos fueron lavados una vez con PBS en presencia del inhibidor correspondiente. Tras el lavado, se resuspendieron los parásitos en PBS con inhibidor y se les permitió

secretar durante 2 h a 37°C. El volumen de incubación para todos los casos fue de 100 µl. Terminado el periodo de secreción, se recuperaron los productos de secreción inducida realizando 3 ciclos de centrifugaciones suaves (1700rpm/10min/TA) para asegurar la separación de los parásitos. El sobrenadante recuperado (productos de secreción inducida) se precipitó mediante la técnica de metanol-cloroformo. La proteína obtenida se resuspendió en amortiguador para Zimografía (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, Glicerol 20% y 0.002% de Azul de bromofenol, pH 6.8).

### **7.13 Análisis de los productos de secreción inducida mediante Electroforesis 2D (Isoelectroenfoque)**

El procedimiento se siguió de acuerdo a lo reportado por (O'Farrell, 1975). Se obtuvieron productos de secreción inducida de taquizoitos tratados con BSA y como control, productos de excreción-secreción de taquizoitos no tratados como se describe en el apartado 7.7. La proteína fue precipitada y resuspendida en amortiguador de lisis para electroforesis 2-D (Urea 7 M, Tiourea 2 M, Chaps al 4%, DTT 60 mM, amortiguador de anfolinas pH 3-10 al 2% -para tiras lineales de 7cm-); la proteína se precipitó con acetona a -20 °C durante al menos una noche. La muestra se centrifugó a 13,200 rpm durante 15 min a 4 °C, la pastilla se resuspendió en acetona fría, se dejó reposando a -20 °C por 5 min y se repitió el proceso de lavado y centrifugación por al menos cinco veces, se realizó una última precipitación por el método de metanol-cloroformo, la proteína se resuspendió en amortiguador de lisis para electroforesis 2-D y se realizó la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). El volumen correspondiente a 120 µg de proteína se llevó a un volumen de 125 µl con amortiguador de rehidratación (Urea 7 M, Tiourea 2 M, Chaps al 4% y Azul de bromofenol). La muestra se colocó en la placa de corrida y sobre tiras con anfolinas embebidas con rango de pH de 3-10, posteriormente se cubrieron con aceite mineral y se inició la corrida de IEF. La corrida consistió en 12 h de rehidratación pasiva a 20 °C, por pasos de 50V/20 min, 70V/20 min,

250V/20 min, 4,000V/2 h, 10,000V/h (IEF Cell Protean BioRad, Hercules, CA, USA). Una vez terminado el IFE, las tiras se incubaron en amortiguador de equilibrio con 1% DTT (Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Glicerol al 30%, SDS al 2%, DTT al 1% y Azul de bromofenol) durante 15 min. Posteriormente, se le retiró el amortiguador de equilibrio con DTT y se le colocó amortiguador de equilibrio con IAA al 2.5% (Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Glicerol al 30%, SDS al 2%, IAA al 2.5% y Azul de bromofenol) durante 20 min; la tira se lavó con agua MiliQ estéril y se colocó en un gel de poliacrilamida al 10% y se separó electroforéticamente la segunda dimensión durante 80 min a 120V en frío.

#### **7.14 Tinción con azul de Coomassie**

Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie (Azul de Coomassie R-250 13%, metanol 50%, ácido acético 10%) durante toda la noche a 4°C en agitación, y posteriormente se decoloraron con solución decolorante (para geles de acrilamida: metanol 50%, ácido acético 10%, y para zimogramas: metanol 10%, ácido acético 10%). La actividad fue detectada como bandas blancas sobre un fondo azul.

#### **7.15 Tinción con nitrato de plata**

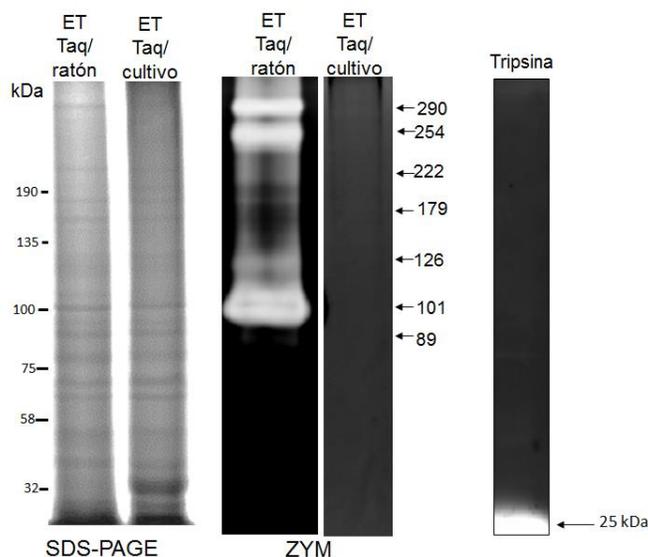
Se colocaron los geles en un recipiente de vidrio y se lavaron con agua MQ por 10 min en agitación. Se colocó el gel en solución fijadora (metanol 40% y 50 µL de formaldehído al 37%) durante 10 min en agitación. Se lavó dos veces con agua MQ por 5 min y se agregó una solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/ml) durante 1 min en agitación. Se lavó dos veces con agua MQ durante 20 s. Se adicionó una solución de nitrato de plata 0.1% y se incubó en agitación durante 10 min. Se adicionó la solución reveladora (carbonato de sodio 3%, tiosulfato de sodio 0.0004% y 50 µl de formaldehído al 37%) en agitación hasta observar las bandas. La reacción se detuvo adicionando ácido cítrico 2.3M, en agitación durante 10 min.

## **8.0 Resultados**

Los resultados se presentan de manera secuencial de acuerdo a los objetivos planteados para el presente trabajo. Los pesos moleculares indicados para las proteasas inducidas fueron determinados mediante análisis con el programa Image™ Lab Software Versión 4.1 (BioRad, Hercules, CA, USA). Todos los resultados se repitieron al menos tres veces, obteniendo perfiles proteolíticos idénticos.

### **8.1 Corroboración de la presencia/ausencia de proteasas en extractos totales de taquizoítos aislados de ratón y de cultivo celular mediante zimografía en gelatina.**

Con la finalidad de reproducir los resultados obtenidos previamente en el laboratorio se realizaron zimografías para observar el perfil proteolítico de ET de taquizoítos aislados de ratón. Se obtuvo un patrón proteolítico idéntico al previamente reportado por Ramírez-Flores en su tesis de maestría, consistente en al menos 7 proteasas de pesos moleculares de entre 50 y 290 KDa (Figura 13).



**Figura 13. Perfil proteolítico de ET de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) aislados de ratón y de cultivo celular.** Se evaluó la actividad proteolítica de ET  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón ó de cultivo celular. El gel se lavó e incubó por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  a pH 7.5. Se usó Tripsina 50 ng como control positivo. Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. ET: extracto total.

Posteriormente, fueron analizados los ET de taquizoítos aislados de cultivo celular bajo las mismas condiciones. El zimograma muestra total ausencia de actividad proteolítica, resultado también concordante con lo descrito por Ramírez-Flores (Figura 13).

Una vez reproducido el antecedente al presente trabajo, se inició con la fase de inducción de la secreción de proteasas.

## 8.2 Inducción de la secreción de proteasas en taquizoitos obtenidos de cultivo celular

Con el objetivo de observar si la interacción con algún componente del hospedero (ausente en cultivo celular) propiciaba la expresión o secreción de cualquiera de las proteasas ya observadas en los taquizoítos extraídos del modelo murino o de proteasas nuevas no detectadas previamente, se evaluaron taquizoítos de cultivo celular en los experimentos de inducción.

Para ello utilizamos de forma paralela dos estrategias de trabajo: 1) Se realizaron incubaciones de taquizoítos a 37°C durante 4 h con la molécula inductora en cuestión y posteriormente se recuperaron los productos de secreción y los ET para procesarse para zimografía. 2) Se realizaron incubaciones a 37°C durante 4 h con la molécula inductora y posteriormente se invadieron células HEp-2 con los parásitos tratados. Se permitió que los taquizoítos proliferaran durante 72 h y se realizó entonces el correspondiente zimograma para ET y productos de secreción.

En cuanto a los posibles inductores, se probaron diferentes moléculas a varias concentraciones (Tabla 1), en primer lugar, y sabiendo que al ingresar a un organismo, es la matriz extracelular uno de las primeras barreras a superar por cualquier patógeno, utilizamos ECM gel, una mezcla que contiene componentes de lámina basal y matriz extracelular (colágena IV, entactina, proteoglicanos, laminina, fibronectina, entre otros), y no logramos inducir la expresión ni la secreción de proteasas por los taquizoítos. Posteriormente, teniendo en cuenta que algunas moléculas se encontraban en muy bajas concentraciones en el ECM gel, y que probablemente en el organismo el parásito se enfrenta a otro tipo de concentraciones de las mismas, decidimos utilizar como moléculas únicas los componentes de matriz extracelular Fibronectina y Colágena I. Además de lo anterior, y considerando que pudiera haber una respuesta más bien a un conjunto de componentes fisiológicos que desencadenada la secreción de proteasas, utilizamos exudado peritoneal de ratones sanos, buscando ofrecer a los parásitos un medio de interacción lo más similar al fisiológico. Tampoco observamos actividad proteolítica en los zimogramas realizados. En *T. gondii* se ha descrito que el uso de herramientas metodológicas como son: ionóforos para  $Ca^{2+}$  (Mondragón y Frixione, 1996) y etanol (Carruthers et al, 1999; González del Carmen et al, 2009) permite observar fenómenos de importancia para el parásito, como la extrusión del conoide y la secreción de proteínas; por ello, utilizamos ambas herramientas en busca de observar algún efecto sobre la inducción de la secreción o expresión de proteasas.

Finalmente, se evaluó para parásitos obtenidos de cultivo celular la interacción con BSA.

Ninguna de las interacciones con los posibles inductores en cualquiera de las dos modalidades de experimento realizadas resultó en actividad proteolítica en zimogramas para ET y para Productos de E/S.

<b>FACTOR EVALUADO</b>	<b>CONCENTRACIONES</b>	<b>TIEMPOS PROBADOS</b>
<b>ECMgel</b>	10, 50, 100, 250, 500 µg	-4 hrs -Tras 72 hrs proliferación
<b>FIBRONECTINA</b>	50, 100, 250, 500 µg	-4 hrs -Tras 72 hrs proliferación
<b>COLAGENA I</b>	50, 100, 250, 500 µg	-4 hrs -Tras 72 hrs proliferación
<b>LIQUIDO PERITONEAL</b>	-----	-4 hrs -Tras 72 hrs proliferación
<b>ETANOL</b>	200 mM	2,5, 10, 15, 30 min
<b>IONOMICINA</b>	400 nM, 1 µM	2,5, 10, 15, 30 min
<b>ALBÚMINA SERICA BOVINA</b>	0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 5%	-30 min, 2 y 4 h. -Tras 72 hrs proliferación

**Tabla 1. Factores evaluados en la búsqueda de una molécula o condición inductora de la secreción en taquizoítos de *T. gondii*.**

### **8.3 Inducción de la secreción de proteasas en taquizoítos aislados de modelo murino.**

Tras varios ensayos con diferentes moléculas realizados con taquizoitos aislados de cultivo celular, que no expresaron y/o secretaron proteasas, se decidió realizar los experimentos estimulando ahora taquizoítos aislados del modelo murino, que cuentan con el arsenal de herramientas necesarias para responder a estímulos fisiológicos, y, que como ya se había observado previamente (Figura 13; Ramírez-Flores, 2015), expresan y tienen la capacidad de secretar diferentes proteasas.

Los ensayos para determinar la inducción de la secreción de proteasas en taquizoítos de modelo murino fueron realizados en una primera etapa incubando los taquizoítos a 37°C durante 4 h en las mismas condiciones que cuando se trabajó con los de cultivo celular; se probaron las mismas moléculas previamente elegidas y las mismas concentraciones (Tabla 1). Los zimogramas fueron activados en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1 mM y ZnCl<sub>2</sub> 1µM, condiciones idóneas reportadas por Ramírez-Flores (2015) para la detección por zimografía de la actividad de proteasas de *T. gondii*.

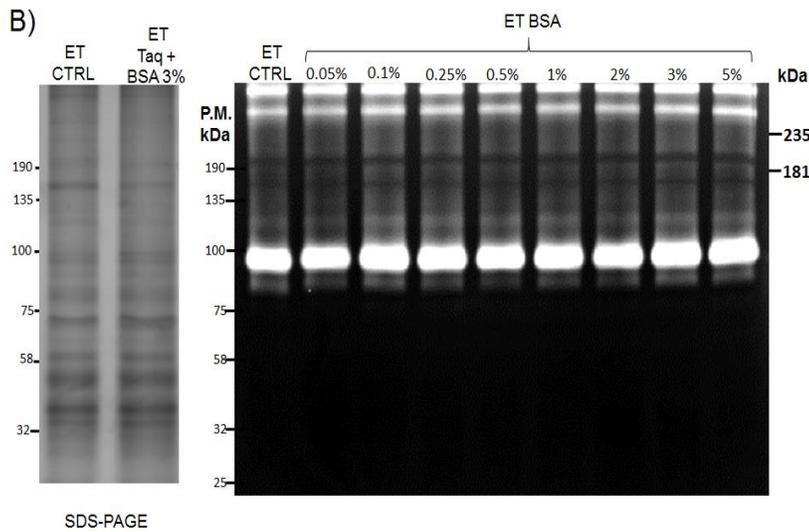
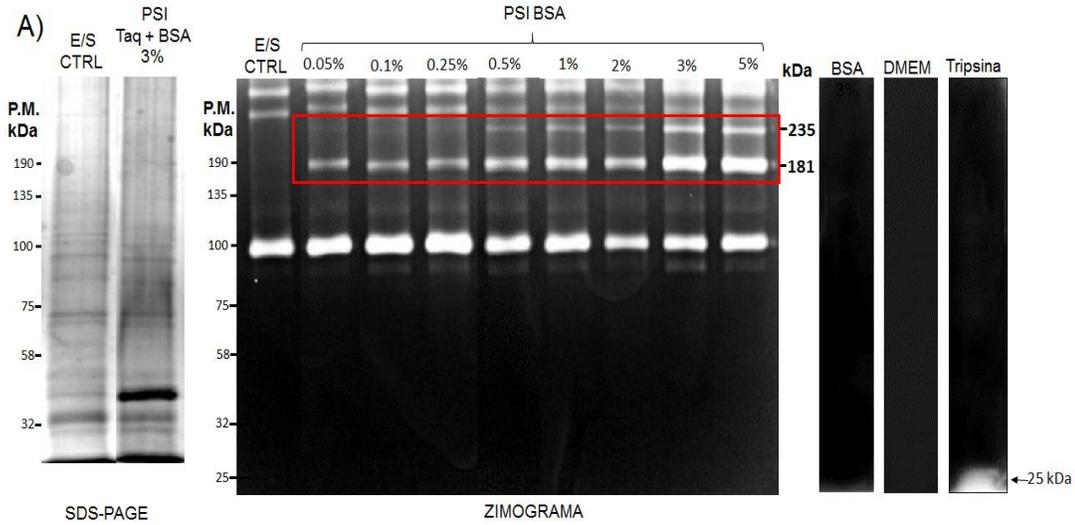
De todas las condiciones indicadas en la Tabla 1, solo BSA ejerció la inducción *in vitro* de la secreción de proteasas en los taquizoítos provenientes del modelo murino como se muestra a continuación.

Se evaluaron diferentes concentraciones de BSA según se muestra en la Tabla 1. Los resultados mostraron mediante zimografía (Figura 14) que la exposición de los taquizoítos a BSA en un rango de 0.05 a 5% indujo la secreción de al menos dos proteasas, una de 181 kDa y otra de 235 kDa. La intensidad de ambas proteasas en cuanto a la degradación del gel de sustrato, estuvo de acuerdo a la concentración evaluada de BSA. Tras analizar el correspondiente zimograma, observamos que la actividad de la proteasa de 181 kDa es visible desde la más baja concentración utilizada (0.05%) e incrementa conforme se incrementa la concentración de BSA. Por

su parte, la proteasa de 235 kDa tiene una actividad apenas perceptible a bajas concentraciones de BSA (0.05-0.25%), que se incrementa a partir de la concentración de 0.5% de BSA, siendo muy clara en el rango de concentraciones fisiológicas (3-5%). Estos ensayos se evaluaron con 30 min de exposición de los parásitos a la BSA.

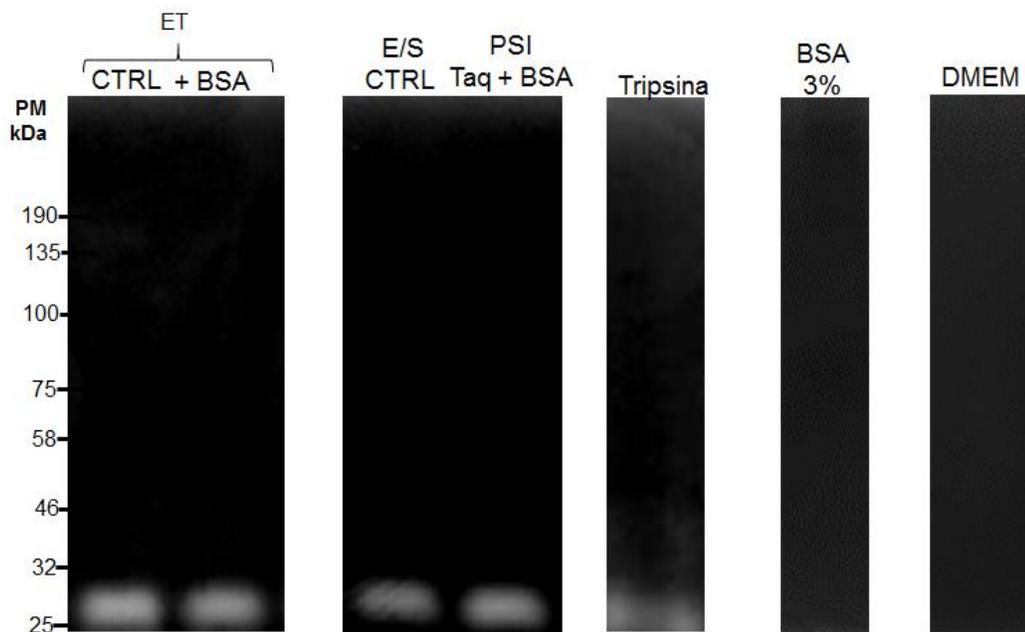
Cuando se evaluó la presencia de proteasas inducidas en los extractos totales de los taquizoítos, no se encontraron bandas con igual actividad a los pesos moleculares correspondientes a las proteasas inducidas, lo que podría indicar que estas proteasas son secretadas de forma inactiva y luego activadas por otra proteasa probablemente de secreción constitutiva.

Con base en los anteriores resultados, se eligió la concentración de 3% de BSA en la inducción de la secreción de proteasas ya que es una concentración que corresponde con la fisiológica en humanos, y además permite observar claramente a las dos proteasas de secreción inducida (PSI) antes mencionadas. Con base en los ensayos de secreción de las proteínas de micronemos previamente reportados para *T. gondii*, en donde se demostró la inducción de dicha secreción en el lapso de entre 2- 10 min (Carruthers et al, 1999; Brown, 2016), se utilizó el tiempo de 30 min, de incubación con el inductor para la secreción de proteasas, considerando que este tiempo minimizaría cualquier efecto que comprometiera la viabilidad de los taquizoítos.



**Figura 14. Perfil proteolítico de productos de secreción inducida (PSI) y extractos totales (ET) de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados con diferentes concentraciones de BSA durante 30 min.** Se evaluó la actividad proteolítica de productos de secreción inducida (A) y extractos totales (B) de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón incubados con BSA a diferentes concentraciones y por 30 min de exposición. El gel se lavó e incubó 24 h a  $37^\circ\text{C}$  a pH 7.5, en presencia de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ , según lo reportado por Ramírez-Flores (2015) Se usó Tripsina 50 ng como control positivo. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control. E/S: productos de excreción-secreción. PSI: productos de secreción inducida.

Por otra parte, se sabe que las proteasas comúnmente degradan diferentes proteínas blanco. Con la finalidad de observar si los productos de secreción inducida con BSA (3%) tienen otros blancos hidrolíticos, el zimograma fue realizado en geles copolimerizados con caseína 0.1%. Los resultados mostraron únicamente actividad de una proteasa de secreción constitutiva de bajo peso molecular de aproximadamente 28 kDa (Figura 15), ya antes caracterizada en el laboratorio, es decir, no se observó la inducción con BSA de la secreción de proteasas nuevas para las cuáles la caseína sea un blanco hidrolítico.



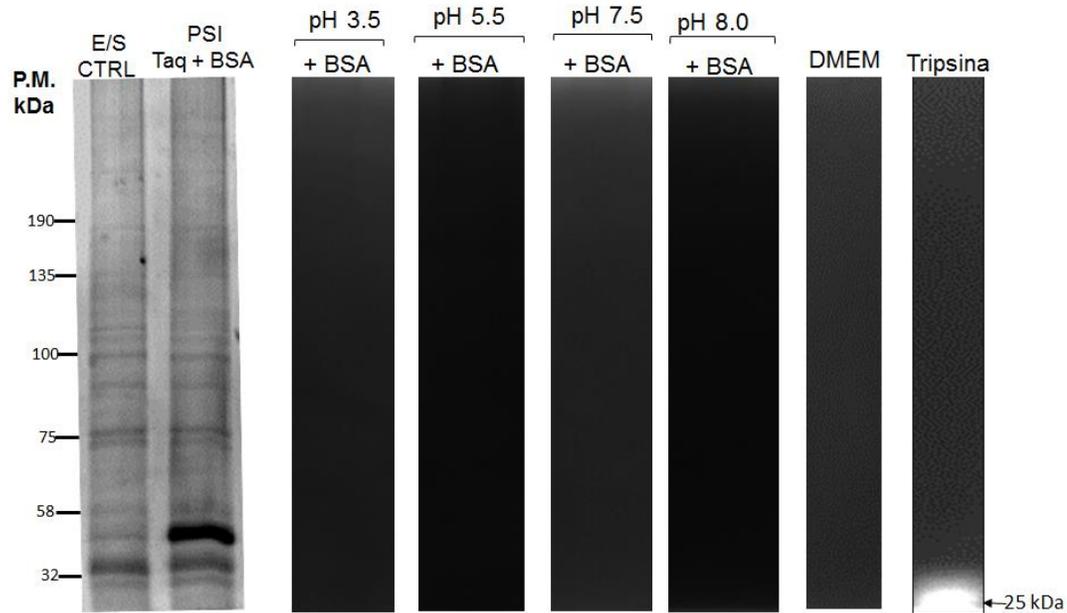
**Figura 15. Zimograma en caseína del perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados o no con BSA 3%** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón, estimulados con BSA 3% se evaluó. El gel se lavó e incubó 24 h a 37°C a pH 7.5 Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con caseína 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control. E/S: productos de excreción-secreción. PSI: productos de secreción inducida.

## **8.5 Caracterización de las condiciones óptimas para la detección de las proteasas de secreción inducida por exposición a BSA al 3% en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina**

Una vez elegido el tiempo de 30 minutos para la interacción con el inductor, se procedió a realizar ensayos para elegir las condiciones óptimas para la actividad de las proteasas inducidas en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. Esto debido a que la detección se realizó utilizando las condiciones óptimas en términos de cofactores y pH de activación para la actividad de otras proteasas anteriormente descritas por Ramírez-Flores (2015). Cabe mencionar que todos los experimentos mostrados de aquí en adelante en este trabajo fueron realizados con la concentración de BSA elegida (3%), pero también se utilizó 0.3% y 1% de BSA, obteniendo idénticos resultados (Figuras no mostradas).

Debido a que cada grupo de proteasas tiene actividad óptima a un rango específico de pH, se decidió probar la muestra activando los zimogramas con amortiguadores que permiten diferentes condiciones de pH. Los amortiguadores utilizados fueron: acetato de sodio 10 mM, pH 3.5 (Oliveira-Jr et al., 2013) para evidenciar la actividad de aspártico proteasas; Tris-HCl 10 mM, pH 5.5 (Oliveira-Jr. et al., 2013) para analizar cisteína proteasas; Tris-HCl, 100 mM, pH 7.5 (Saboia-Vahia et al., 2014) ó Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 (Sampieri et al, 2010) para observar actividad de serina proteasas y metaloproteasas.

Una vez obtenidos los zimogramas activados a diferentes pH, en ausencia de cofactores, no se logró observar actividad proteolítica en ninguno de los mismos (Figura 16), ni en ET (figuras no mostradas) ni en el carril de los productos de secreción inducida. La tripsina utilizada como control positivo tuvo actividad a pH 7.5 y pH 8.0 En el gel de acrilamida teñido con Coomassie, observamos una banda diferencial de aproximadamente 40 kDa únicamente en el carril de secreción inducida, de identidad molecular desconocida.



**Figura 16. Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados con BSA 3% por activación a diferentes pH.** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón se evaluó activando los zimogramas en amortiguadores al pH indicado, en ausencia de cofactores. El gel se lavó e incubó 24 h a 37°C. Se usó Tripsina 50 ng como control positivo. Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. P.M.: peso molecular. CTRL: control. E/S: productos de excreción-secreción. PSI: productos de secreción inducida.

Los resultados anteriores nos dan un indicio de que las proteasas que se inducen con BSA pueden ser dependientes de algún cofactor, ya que es sabido que muchas proteasas requieren de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o agentes reductores como el DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol para su actividad. Por lo anterior, decidimos analizar los productos de secreción inducida activando los zimogramas a diferentes pH pero ahora en presencia de agentes reductores y cofactores.

Para ello, se probaron concentraciones de cofactores y agentes reductores que se suelen utilizar en ensayos zimográficos previamente reportados en otros modelos celulares (Oliveira-Jr. et al., 2013; Song y Nam, 2003; Mendoza-López et al., 2000). Se decidió utilizar tres pH: 5.5, 7.5 y 8.0, que se

encuentran en el rango de los pH's utilizados para la detección de proteasas provenientes de patógenos (Coradi y Guimaraes, 2006; Hernández-Gutiérrez et al, 2004; Mendoza-López et al, 2000; Nogueira de Melo, 2010; Song y Nam, 2003)

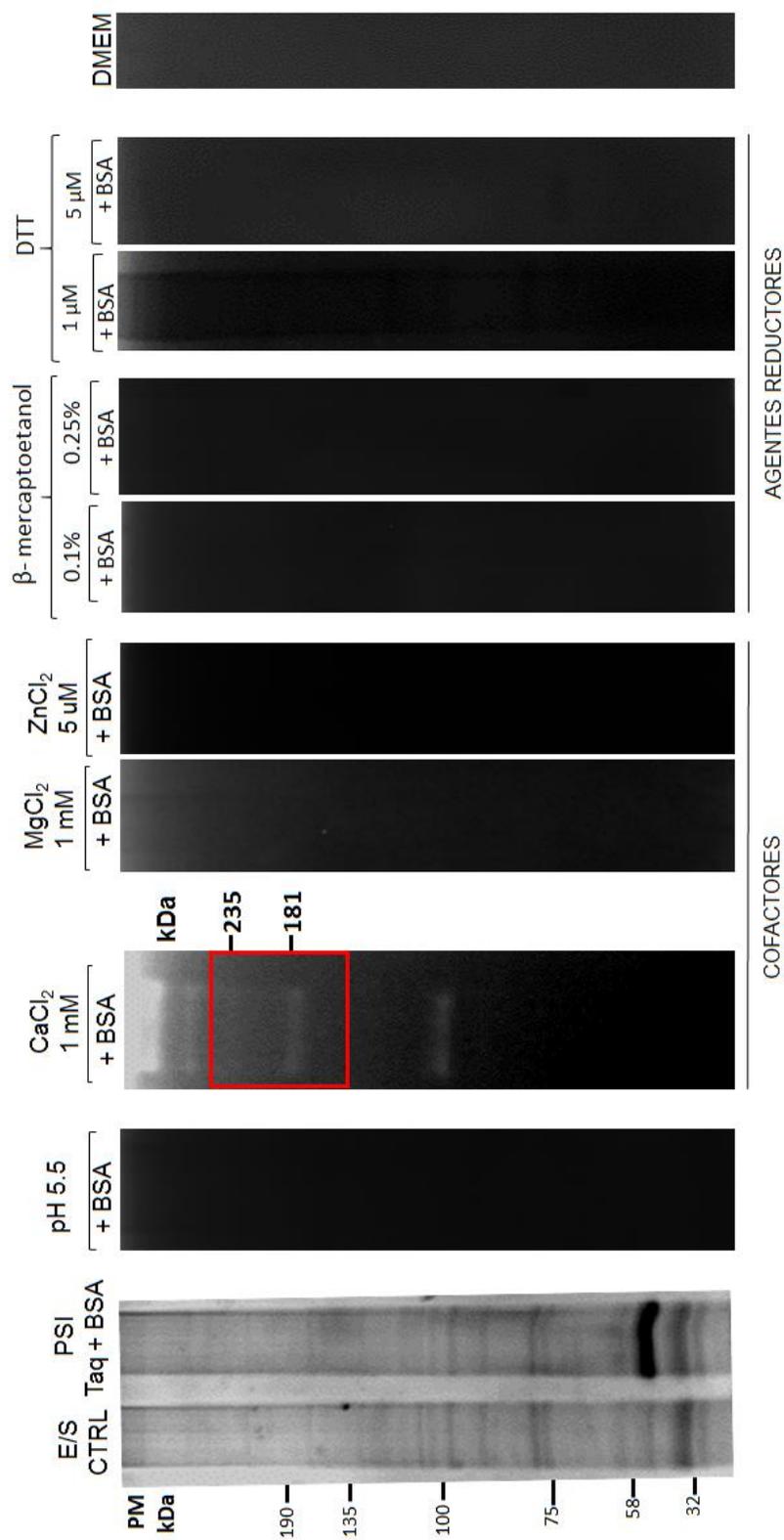
- a) para el pH 5.5 de activación se utilizaron dos concentraciones distintas de DTT (1 y 5 mM) y  $\beta$ -mercaptoetanol (0.1 y 0.25%) como agentes reductores, y como cofactores  $\text{CaCl}_2$  (1 mM),  $\text{ZnCl}_2$  (5  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{MgCl}_2$  (1 mM). Los agentes reductores son comúnmente utilizados a este pH de activación (Coradi y Guimaraes, 2006; Mendoza-López et al, 2000), pues se sabe que tienen la capacidad de activar cisteína proteasas, mismas que tienen actividad óptima a pH ácido.
- b) para pH 7.5 de activación, debido a que es el más cercano al fisiológico, y teniendo el antecedente de que la primera detección de las proteasas secretadas constitutivamente y por inducción fue a este pH, se decidió utilizar más concentraciones de cofactores, a saber:  $\text{CaCl}_2$  (1, 5 y 10 mM),  $\text{ZnCl}_2$  (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{MgCl}_2$  (1, 5 y 10 mM).
- c) para pH 8.0 de activación se utilizó  $\text{CaCl}_2$  (1 mM),  $\text{ZnCl}_2$  (5  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{MgCl}_2$  (1 mM).

La activación de los zimogramas a pH 5.5, no evidenció actividad en presencia de agentes reductores (DTT y  $\beta$ -mercaptoetanol) ni en presencia de  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ , sin embargo, al utilizar una concentración de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  como cofactor, pudimos observar las 2 proteasas inducidas, además de las previamente descritas por Ramírez Flores (2015) (Figura 17), lo que nos sugiere que las 2 proteasas de secreción inducida son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cabe destacar que como ya se había mencionado, los agentes reductores se utilizaron únicamente para pH 5.5.

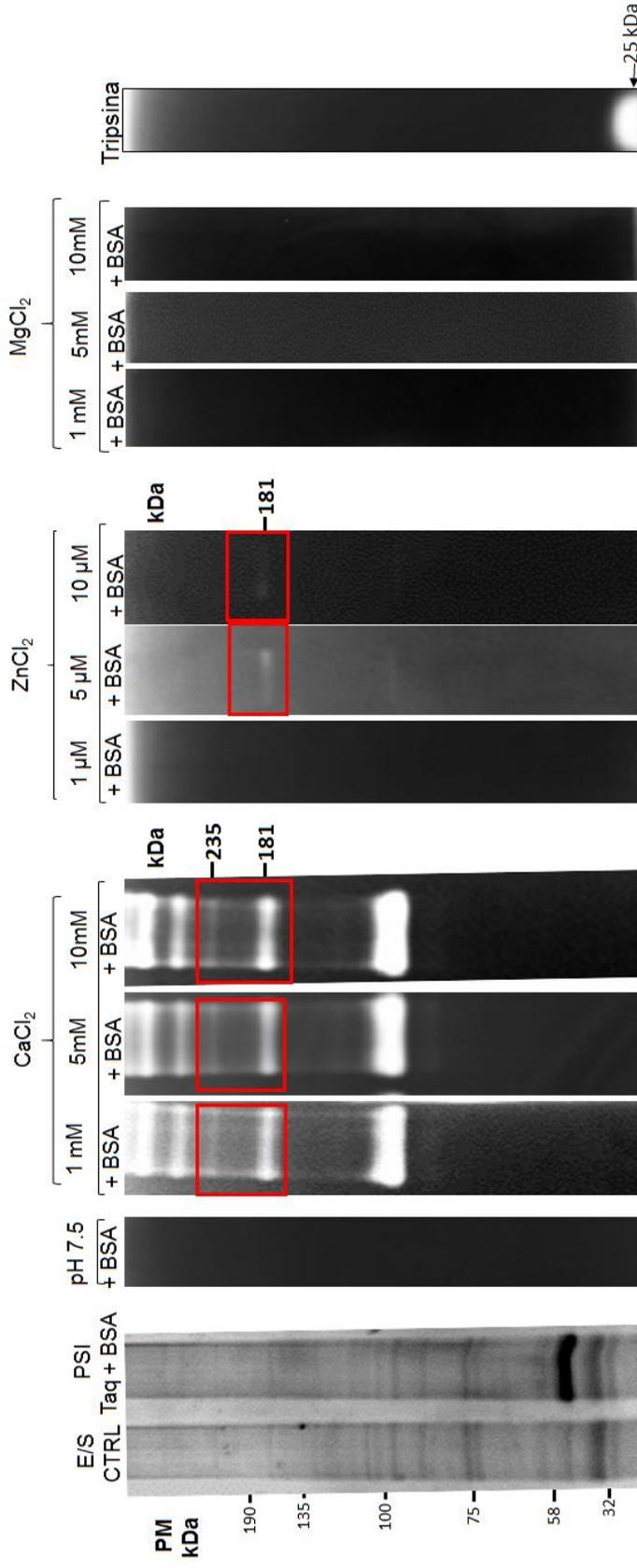
Analizamos entonces la actividad de las proteasas de productos de secreción inducida activando los zimogramas a pH 7.5 en presencia de los diferentes

cofactores (Figura 18). A las tres concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  utilizadas para pH 7.5, se observó un incremento en la actividad proteolítica de las dos bandas (181 y 235 kDa) con respecto a la observada a pH 5.5, lo que revela que la actividad de las proteasas está favorecida por el pH fisiológico, lo que se corrobora al utilizar  $\text{ZnCl}_2$ , como cofactor con el cual se logró observar una degradación mínima en los zimogramas de la proteasa de 181 kDa a partir de 5  $\mu\text{M}$ . Utilizando  $\text{MgCl}_2$  a ninguna concentración observamos proteólisis, lo que nos indica que las proteasas de secreción constitutiva e inducida en *T. gondii* no dependen de este cofactor para su actividad.

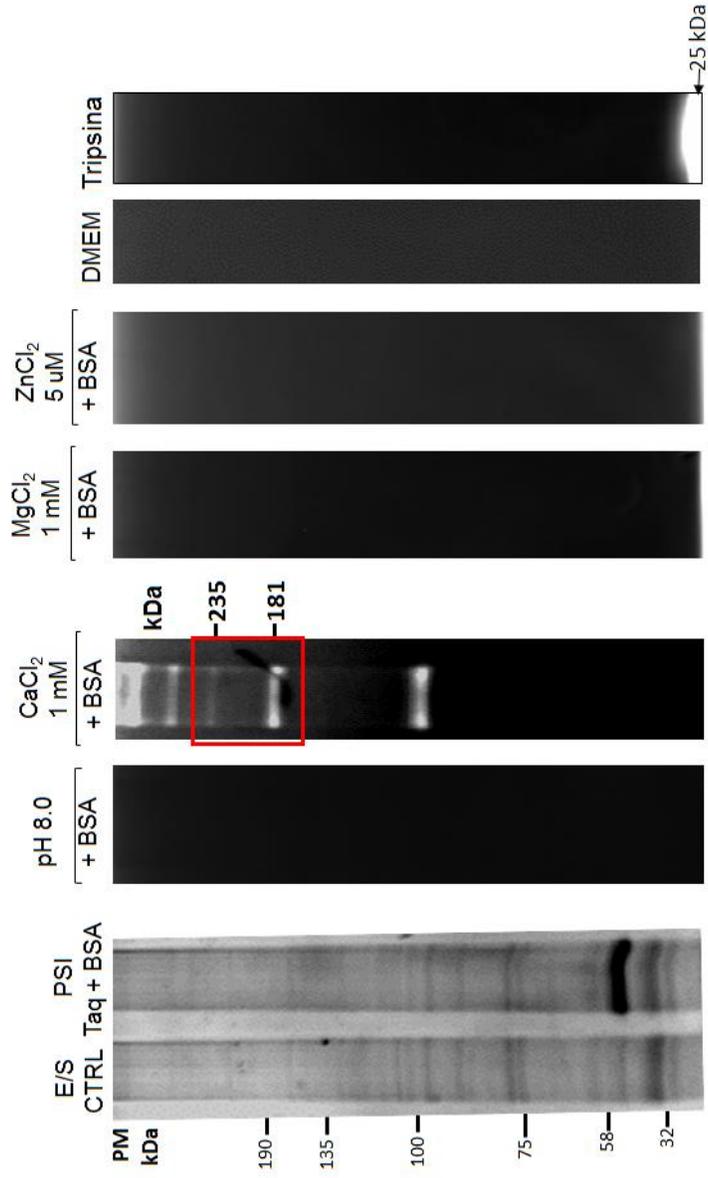
Finalmente, evaluamos la activación a pH 8.0 con los cofactores ya mencionados. Como se muestra en la Figura 19, en presencia de  $\text{CaCl}_2$  1 mM se evidencia un patrón proteolítico similar, pero menos activo que el observado a pH 7.5. Con relación a los demás cofactores, no observamos actividad proteolítica. Con ello se muestra que el pH 8.0 no es el más adecuado para analizar por zimografía la actividad proteolítica de las proteasas de secreción inducida.



**Figura 17. Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados con BSA 3% , activado a pH 5.5 en presencia de diferentes cofactores o agentes reductores.** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de 20x10<sup>6</sup> taquizoítos aislados de ratón estimulados con BSA 3% se evaluó en presencia de pH 5.5, con diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, DTT o β- mercaptoetanol. Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control. E/S: productos de excreción-secreción. PSI: productos de secreción inducida.



**Figura 18. Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados con BSA 3%, activado a pH 7.5 en presencia de diferentes cofactores.** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón estimulados con BSA 3% se evaluó en presencia de pH 7.5, con diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  o  $\text{CaCl}_2$ . Se usó Tripsina 50 ng como control positivo. Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control. E/S: productos de excreción-secreción. PSl: productos de secreción inducida.



**Figura 19. Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados con BSA 3%, activado a pH 8.0 en presencia de diferentes cofactores.** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón estimulados con BSA 3% se evaluó en presencia de pH 8.0 en presencia de cofactores :  $MgCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CaCl_2$  . Se usó Tripsina 50 ng como control positivo. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control. E/S: productos de excreción-secreción. PSI: productos de secreción inducida.

En general, se observó que la actividad de las dos proteasas inducidas para su secreción por BSA se vió claramente favorecida por pH 7.5, adicionalmente, a todos los pH evaluados para la activación de los zimogramas, el catión  $\text{Ca}^{2+}$  resultó ser el cofactor óptimo en la activación de las proteasas inducidas. En el caso de los ensayos realizados utilizando  $\text{Zn}^{2+}$  (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) como co-factor , solo se detectó la actividad de la proteasa de 181 kDa a pH 7.5 , y en una baja intensidad, lo que implica que éste no es el cofactor principal necesario para la óptima actividad de las proteasas inducidas, pero que, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  , podría favorecerla.

Con base en los resultados anteriores se puede afirmar que la interacción de los taquizoítos de *T. gondii* con BSA, induce la secreción de dos proteasas con actividad óptima a pH 7.5, que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como co-factor. Debido a ello, se decidió tomar como condiciones óptimas para la actividad de las proteasas inducidas por BSA en ensayos de zimografía, las siguientes: pH 7.5, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . El pH fue elegido debido a que es el pH más cercano al fisiológico; el  $\text{CaCl}_2$  mostró ser determinante para la actividad de las proteasas en todo el rango de pH, y el  $\text{ZnCl}_2$  se utilizó debido a que a la concentración y pH elegidos facilitó la actividad de al menos una de las proteasas inducidas aún en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ .

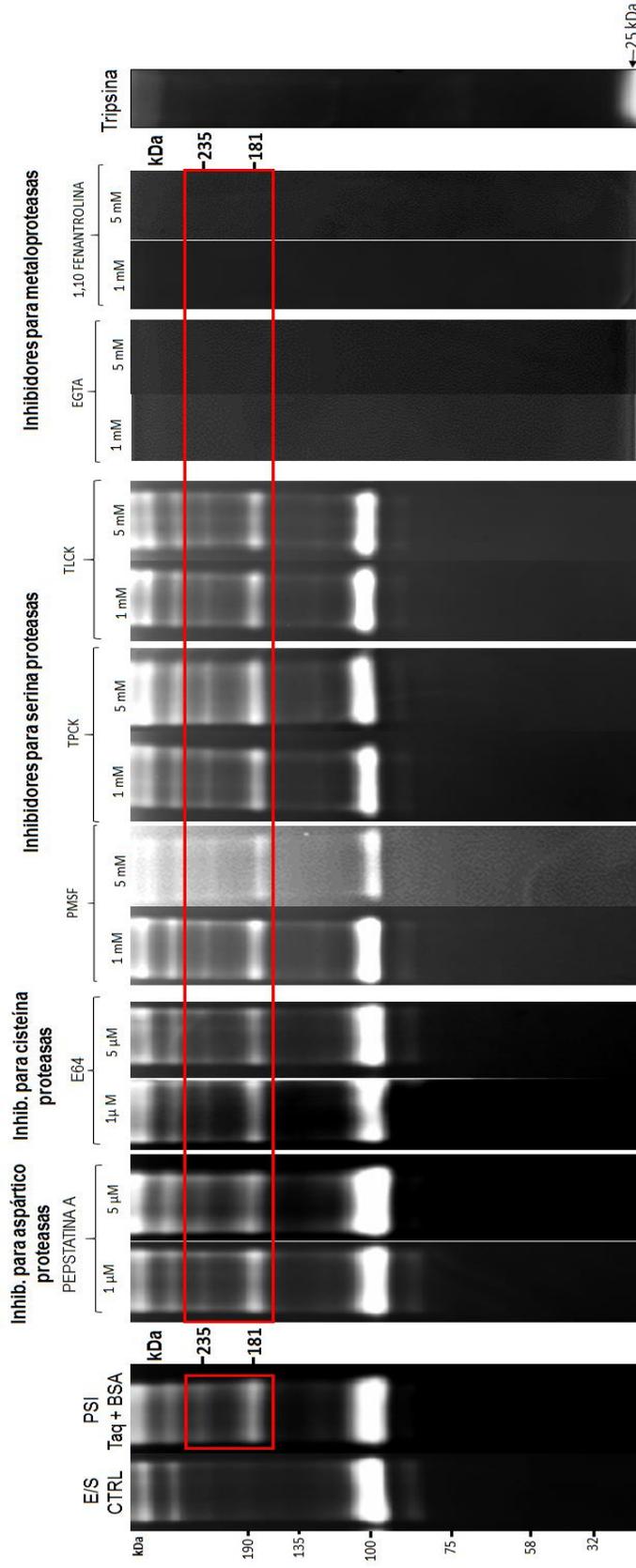
### **8.6 Identificación de las proteasas inducidas mediante el uso de inhibidores específicos**

Para identificar a qué familia pertenecen las proteasas inducidas en respuesta a interacción con BSA, utilizamos inhibidores para los diferentes grupos de proteasas. Como inhibidores para cada grupo se usaron: PMSF, TPCK y TLCK (1 y 5 mM) para Serina Proteasas; E64(1 y 5  $\mu\text{M}$ ) para cisteína proteasas; Pepstatina A (1 y 5  $\mu\text{M}$ ) para aspártico proteasas y EGTA y 1, 10 fenantrolina (1 y 5 mM) para Metaloproteasas. Las concentraciones para los ensayos fueron elegidas con base en las utilizadas por Ramírez-Flores

(2015) en su tesis de maestría, y considerando también los datos proporcionados en las hojas técnicas de dichos inhibidores.

Como resultado de la incubación de los geles con los inhibidores de proteasas, se observó la inhibición total de la actividad proteolítica con los inhibidores de metaloproteasas utilizados EGTA y 1, 10 fenantrolina, (Figura 20). En contraste, los inhibidores para los diferentes grupos adicionales de proteasas (serina-, aspártico- y cisteína proteasas) no afectaron la actividad de las dos bandas (181 y 235 kDa) de actividad proteolítica, indicando que aparentemente, estas no corresponden a este tipo de proteasas (Figura 22).

El resultado obtenido indica que las proteasas secretadas en respuesta a interacción con BSA pertenecen al grupo de las metaloproteasas, y que son dependientes de pH fisiológico y  $\text{Ca}^{+2}$  para su actividad, ya que fueron inhibidas mediante el uso de agentes quelantes de iones divalentes (EGTA y 1, 10 fenantrolina).

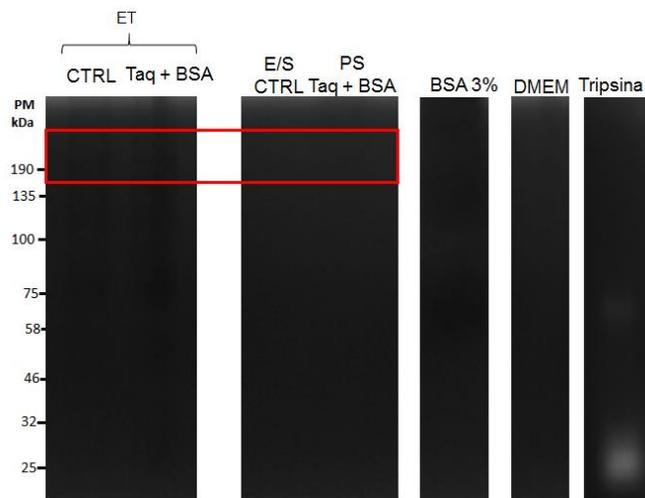


**Figura 20. Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados con BSA 3% .** Se evaluó el efecto de diferentes inhibidores en la actividad proteolítica de las proteasas inducidas. El gel se lavó e incubó en presencia de los inhibidores en diferentes concentraciones a pH 7.5 y en presencia de  $ZnCl_2$  5  $\mu$ M y  $CaCl_2$  1 mM. Los gels se incubaron durante 24 h a 37 °. Control positivo Tripsina 50 ng. Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. E/S: productos de excreción-secreción. PSI: productos de secreción inducida.

## 8.7 Zimografía en geles de poliacrilamida copolimerizados con BSA

Con la finalidad de evidenciar si albúmina la sérica bovina es la molécula blanco de hidrólisis de las proteasas inducidas, se realizó una zimografía utilizando geles copolimerizados con BSA y sin gelatina. Se analizaron muestras de ET y de productos de E/S de taquizoítos control y de productos de secreción inducida de taquizoítos tratados con BSA al 3%. Para ninguno de los casos se observó actividad proteolítica en el zimograma (Figura 21) procesado en condiciones ideales (pH 7.5,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{ZnCl}_2$  5  $\mu\text{M}$ ).

Con base en el resultado anterior, inferimos que la BSA no es la proteína blanco para su hidrólisis por las proteasas descritas tanto en productos de E/S como en la secreción inducida. En este sentido, la BSA la actúa únicamente como una molécula inductora de la secreción de las proteasas de 181 y 235 kDa. Será de interés determinar los blancos fisiológicos tanto de las proteasas presentes en los productos de E/S así como de las proteasas secretadas por un proceso inducido.

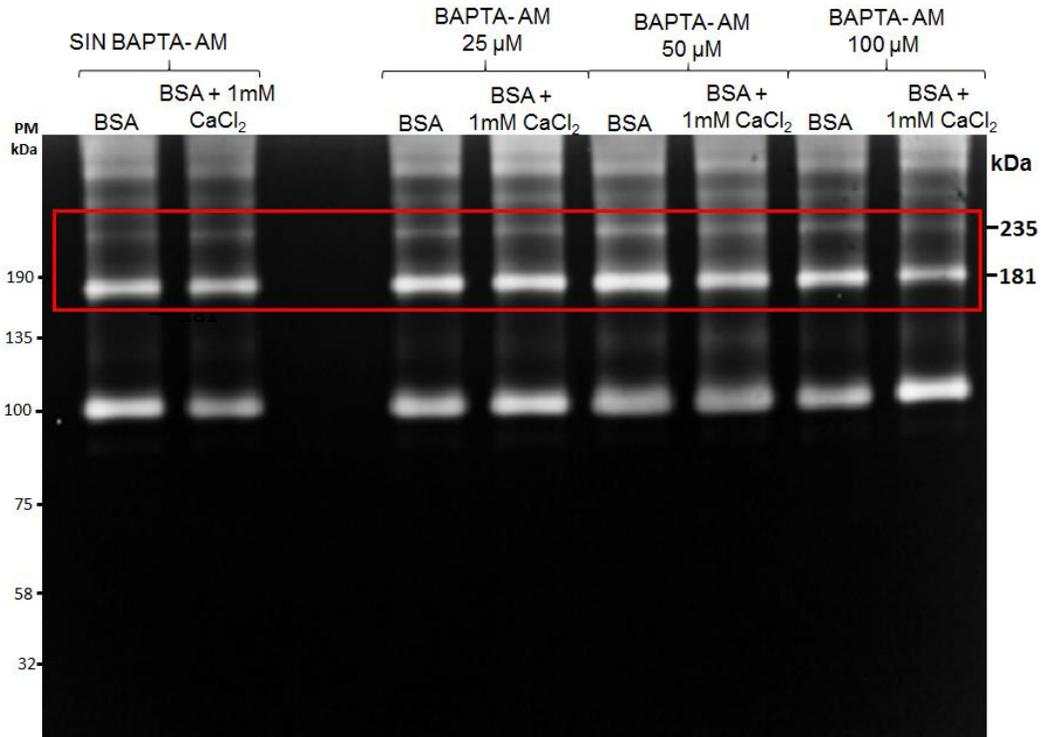


**Figura 21. Zimograma copolimerizado con BSA del perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) estimulados o no con BSA 3%** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón, estimulados con BSA 3% se evaluó. El gel se lavó e incubó 24 h a  $37^\circ\text{C}$  a pH 7.5 Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con BSA 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control. E/S: productos de excreción-secreción. PSI: productos de secreción inducida.

## 8.8 Papel del calcio intracelular

Debido a que se sabe que algunos procesos de importantes en *Toxoplasma gondii*, como la extrusión del conoide, la invasión, el egreso de la célula hospedera y la secreción de proteínas MIC son mediados por calcio intracelular (Carruthers et al, 1999; Endo et al, 1982; Mondragón y Frixione, 1996; Vieira y Moreno, 2000), se decidió averiguar si el mismo juega un rol en el proceso de secreción de las proteasas inducidas por exposición a BSA utilizando una solución salina libre de calcio y un quelante para calcio intracelular (BAPTA-AM). Para ello, se incubaron taquizoítos con diferentes concentraciones de BAPTA-AM de manera previa a la estimulación con BSA. Se utilizó para cada concentración del quelante, un control positivo conteniendo 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

En ninguna de las concentraciones de BAPTA-AM (Figura 22) utilizadas se observó la inhibición de la secreción de las dos proteasas inducidas. Lo anterior indica que aparentemente el calcio intracelular no participa directamente como el factor principal que media el proceso de secreción en respuesta a estimulación con BSA.



**Figura 22. Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) preincubados con BAPTA-AM.** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de  $20 \times 10^6$  taquizoítos preincubados con BAPTA-AM y luego estimulados con BSA 3% se evaluó. El gel se lavó e incubó 24 h a 37°C a pH 7.5 . Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control.

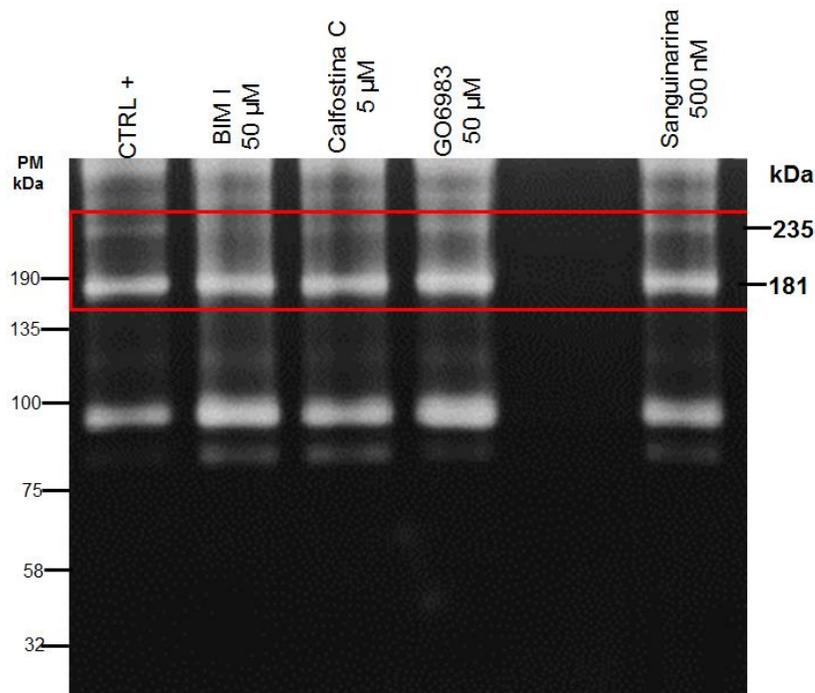
### 8.9 Análisis de la posible regulación de la secreción inducida utilizando inhibidores de proteínas de señalización

Anteriores reportes han mostrado que diversos procesos involucrados en la patogénesis de protozoarios son mediados por proteínas señaladoras (Flores-Robles, 2003; Garrison et al, 2012; González del Carmen et al, 2009; Guillen, 1993; Kebaier y Vanderberg, 2010; Soid-Raggi et al, 1998). Por ello, con la finalidad de indagar si proteínas cinasas o fosfatasa de *T. gondii* median el proceso de señalización relacionado con la secreción de proteasas inducida por BSA, preincubamos taquizoítos con diferentes inhibidores de manera previa la estimulación con BSA. Los inhibidores utilizados fueron:

BIM I, Calfostina C, Gö6983, inhibidores específicos para PKC, y Sanguinarina, un inhibidor específico para PP2C. La concentración utilizada de cada inhibidor fue la concentración efectiva más alta reportada por nuestro laboratorio para ensayos de extrusión del conoide, un proceso que tiene lugar durante el proceso de invasión activa del parásito a la célula hospedera.

Cabe destacar que los resultados que en adelante se presentan son ensayos únicos, por lo que serán considerados únicamente como resultados preliminares.

Al analizar el zimograma resultante tras el tratamiento antes descrito, observamos que no hubo afectaciones al proceso de secreción de proteasas inducido por BSA (Figura 23) cuando los parásitos fueron preincubados con los mencionados inhibidores, lo que preliminarmente parecería indicar que el proceso de secreción de las proteasas de 181 y 235 kDa inducidas por BSA no está mediado por proteínas de tipo PKC y tampoco depende de la participación de PP2C.



**Figura 23. Perfil proteolítico de productos de secreción inducida de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) preincubados con inhibidores de PKC y de PP2C.** La actividad proteolítica de productos de secreción inducida de  $20 \times 10^6$  taquizoítos preincubados con inhibidores de PKC y PP2C, y luego estimulados con BSA 3% se evaluó. El gel se lavó e incubó 24 h a 37°C a pH 7.5 . Gel de poliacrilamida 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular. CTRL: control.

### **8.10 Comparación de la composición de productos de secreción inducida y secreción constitutiva mediante análisis por isoelectroenfoque**

Con la finalidad de evaluar si además de las proteasas inducidas, existen otras proteínas que pudieran ser secretadas de manera diferencial bajo la inducción con BSA, decidimos analizar los productos de secreción inducida y constitutiva mediante isoelectroenfoque. Para este análisis se contó con el apoyo del M. en C. Carlos Jorge Ramírez Flores.

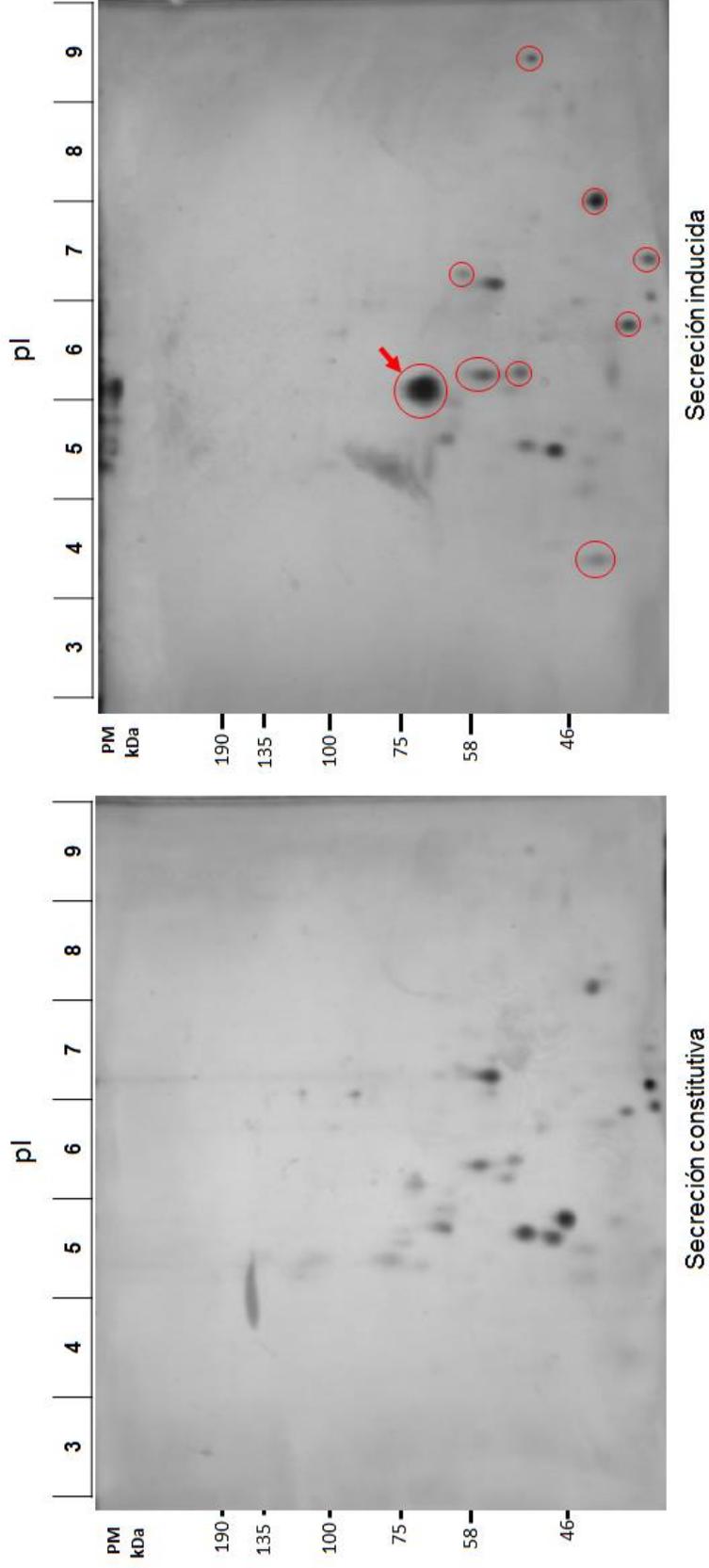
Al comparar los geles bidimensionales de ambas condiciones (Figura 24A y 24B), encontramos un patrón diferencial entre ambos, observándose que bajo las condiciones de inducción, disminuye la secreción de algunas proteínas (Figura 24A, círculos verdes, Tabla 2) mientras que otras son secretadas en mayor cantidad (Figura 24B, círculos rojos, Tabla 2) , entre estas últimas resalta de manera importante un spot de aproximadamente 68 kDa de peso molecular (Flecha roja). Cabe mencionar que esta proteína presenta un peso molecular similar al inductor utilizado (BSA con un PM de 66 kDa) por lo cual existe una ínfima probabilidad de a pesar de los lavados a los parásitos, el spot pudiera tratarse de un residuo del mismo, sin embargo, el punto isoeléctrico del spot aquí detectado es de aproximadamente 6.1, mientras que el punto isoeléctrico experimental para la albúmina sérica bovina es 4.8 (Brooks y Cramer, 1992) y el calculo de acuerdo a su secuencia de aminoácidos es de 5.4. Además de ello, en el gel de isoelectroenfoque de productos de secreción constitutiva hallamos una proteína con características similares en cuanto a peso molecular y punto isoeléctrico, por lo cual consideramos que el spot de mayor dimensión en el gel de productos de secreción inducida corresponde a esta proteína y no a un residuo del inductor. No logramos observar proteínas en el rango de pesos moleculares en el que hallamos las proteasas inducidas, esto debido probablemente a la concentración de proteína utilizada para el ensayo, o bien, a la sensibilidad de la técnica. Se realizó una búsqueda bioinformática en el genoma disponible en la base de datos ToxoDB (Toxoplasma Genomic Resource, <http://toxodb.org/toxo>) utilizando los datos de las proteínas que incrementan o disminuyen su secreción (P.M. y P.I.). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

De los anteriores resultados pudimos concluir que la BSA efectivamente estimula cambios importantes a nivel de proteínas diversas en el proceso y los patrones de secreción de *T. gondii*. Estos resultados, aunque son preliminares, hacen necesarios más ensayos que permitan confirmar los

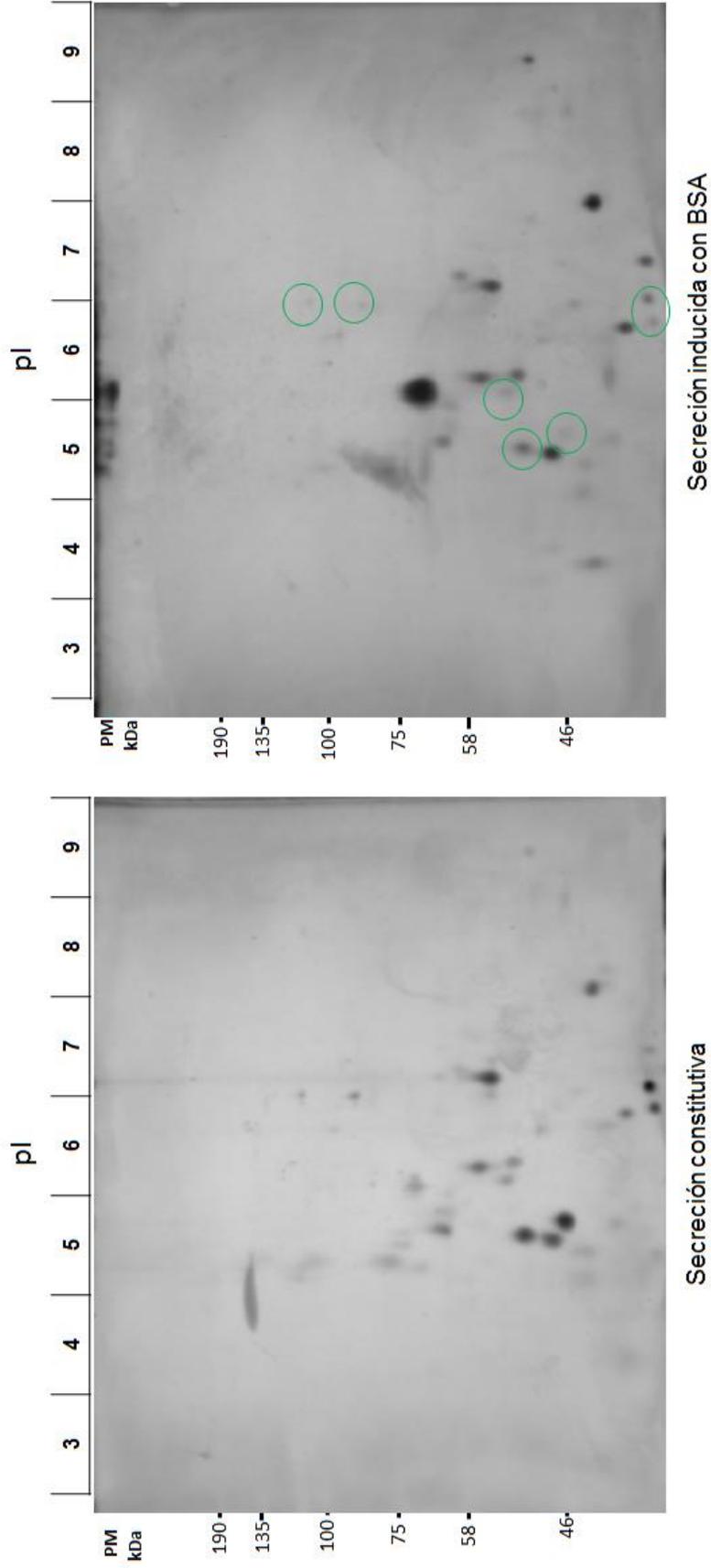
comportamientos ahora expuestos y posteriormente se deberá realizar un análisis a fondo individual para cada proteína variable en ambas condiciones.

<b>PROTEÍNAS CON SECRECIÓN INCREMENTADA</b>		
<b>~PM (kDa)</b>	<b>~pI</b>	<b>PROBABLE IDENTIDAD</b>
36	4.3	MIC6
68	6.1	-----
55	6.3	Armadillo/beta-catenin family repeat-containing protein
51	6.3	-----
30	6.8	Hypothetical protein TGGT1_269315
57	7.2	Catalase
28	7.5	Hypothetical protein TGGT1_224960
34	8.0	Hypothetical protein TGGT1_254310
49	9.5	Putative eukaryotic initiation factor-4E
<b>PROTEÍNAS CON SECRECIÓN DISMINUIDA</b>		
<b>~PM(kDa)</b>	<b>~pI</b>	<b>PROBABLE IDENTIDAD</b>
51	5.5	Hsp90 domain-containing protein
41	5.7	SAG-related sequence SRS54
53	6.2	TBC domain-containing protein GTPase activator activity
26	6.9	Hypothetical protein TGGT1_267500
28	7.1	Hypothetical protein TGGT1_247780
112	7.0	Hypothetical protein TGGT1_272590
89	7.0	SCP family extracellular subfamily protein

**Tabla 2. Proteínas con variaciones en la secreción estimulada por BSA.** Los datos de PM y pI se obtuvieron de los análisis bidimensionales; la búsqueda bioinformática fue realizada en la base de datos ToxoDB (Toxoplasma Genomic Resource, <http://toxodb.org/toxo>)



**Figura 24A. Análisis por isoelectrofoque de la secreción de proteínas inducida por BSA.** El gel se tiñó con nitrato de plata. La primera dimensión, pH 3-10; segunda dimensión SDS-PAGE al 7.5%. La proteína se ajustó a 40 µg para ambos casos. En círculos rojos se muestran las proteínas que incrementan su secreción. La flecha roja señala la proteína que más incrementa con respecto al control.



**Figura 24B. Análisis por isoelectroenfoque de la secreción de proteínas inducida por BSA.** El gel se tiñó con nitrato de plata. La primera dimensión, pH 3-10; segunda dimensión SDS-PAGE al 7.5%. La proteína se ajustó a 40  $\mu\text{g}$  para ambos casos. En círculos verdes se muestran las proteínas cuya secreción se ve disminuida.

## 9.0 Discusión

Uno de los procesos clave para la patogenicidad de *T. gondii* es su impresionante capacidad de diseminación, que le permite distribuirse por prácticamente todos los tejidos del hospedero. Para lograr lo anterior, el parásito hace uso de herramientas moleculares que le facilitan atravesar barreras inaccesibles a otros patógenos; en primer lugar, el epitelio intestinal, y tras alcanzar los capilares, las barreras biológicas inmunoprivilegiadas, como la placenta, la barrera hematoencefálica y la barrera hematorretiniana (Barragán y Sibley, 2003). Una vez que alcanza órganos importantes, el parásito causa problemas congénitos en el feto (Desmonts y Couvreur, 1974), complicaciones neurológicas severas en individuos inmunocomprometidos (Luft et al., 1993) y patologías oculares en individuos sanos (Roberts y McLeod, 1999). Sin embargo, y a pesar de su importancia, el mecanismo, así como las moléculas involucradas en la diseminación del parásito por todo el organismo permanecen sin entenderse por completo.

Consideramos que uno de los factores que podrían participar y/o potenciar la diseminación de nuestro modelo es la expresión y secreción de proteasas, de manera similar al proceso que tiene lugar en células cancerígenas.

Aunque se han realizado estudios de proteasas en *T. gondii*, los mismos son enfocados principalmente al procesamiento proteolítico intracelular de otras proteínas, o bien, al papel que pudieran tener en el proceso de invasión activa, como ocurre en otros Apicomplexa (Binder et al, 2008; Brossier et al, 2008; Laliberté y Carruthers, 2011; Shen et al, 2014; Rugarabamu et al, 2015; Parussini et al, 2010; Dou, 2012).

A la fecha, no tenemos conocimiento de reportes que relacionen a las proteasas con el proceso de diseminación de *T. gondii*, el cual ha sido mayoritariamente atribuido a células propias del hospedero infectadas con taquizoítos como los macrófagos, que funcionarían como transportadoras del parásito a través de los tejidos (Harker et al, 2015); sin embargo, es bien

sabido que el parásito es también capaz de diseminarse de forma libre.

La zimografía es una técnica utilizada de forma común para el estudio de enzimas proteolíticas, no así para estudios con *Toxoplasma gondii*, modelo en el que es apenas utilizada (Song y Nam, 2003). En nuestro laboratorio se ha logrado encontrar las condiciones óptimas para detectar las proteasas presentes en ET y productos de E/S de taquizoítos aislados de ratón. Interesantemente, el comportamiento proteolítico no es el mismo cuando se analizan ET y productos de E/S provenientes de parásitos mantenidos en cultivo celular (Ramírez-Flores, 2015), lo que lleva a proponer que, ya que en cultivo celular se carece de mecanismos de defensa que pudieran afectar al parásito, así como de otro tipo de moléculas fisiológicas inductoras que pudieran estar potenciando la expresión de dichas proteasas, el parásito dedicaría sus recursos únicamente a la interiorización en la célula hospedera, proliferación y exteriorización (Ramírez-Flores, 2015).

Si lo anterior resulta cierto, podría afirmarse que al exponer a los parásitos al componente fisiológico adecuado, éste sería reconocido por moléculas en el parásito que activarían mecanismos que desencadenen la expresión y/o secreción de proteasas. Por ello, en el presente trabajo nos propusimos llevar a cabo la búsqueda de éste inductor o inductores en *T. gondii*. Nuestro modelo de trabajo, aunque es de tipo intracelular obligado, permanece viable alrededor de 4 h fuera de las células, tiempo suficiente para permitirnos realizar ensayos de incubación (Chaturvedi et al, 1998), que fueron llevados a cabo como estrategia experimental.

En otros protozoarios patógenos tanto intracelulares como extracelulares (Piña- Vázquez et al, 2012), se ha observado que secretan proteasas que degradan componentes de matriz extracelular. Por ello, en una primera aproximación experimental, se expusieron parásitos aislados de cultivo celular con diferentes factores y moléculas fisiológicas con las que pudiera interaccionar *Toxoplasma* en el organismo como el gel ECM (matriz extracelular), fibronectina o colágena, todos ellos componentes de la matriz

extracelular. Posteriormente, buscando exponer a los parásitos a condiciones lo más cercanas posibles a las de un organismo, las incubaciones fueron realizadas con líquido peritoneal de un ratón sano, que es un líquido rico en diferentes componentes fisiológicos que pudieran ser reconocidos por el parásito, y que representa además el primer fluido con el que la cepa mantenida en nuestro laboratorio tiene contacto tras la inoculación intraperitoneal para su mantenimiento.

Adicionalmente, se han utilizado diversas estrategias para el estudio de procesos dinámicos del parásito *Toxoplasma* y de la secreción del contenido de los micronemos, relacionados con  $Ca^{2+}$  tales como los ionóforos para este catión (Endo et al, 1982; Mondragón y Frixione, 1996) y el etanol (Carruthers et al, 1999; González del Carmen et al, 2009). Con base en lo anterior, se decidió evaluar el papel de ionomicina y de etanol como posibles inductores en la secreción de proteasas por este parásito. Recientemente, se reportó que la albúmina sérica bovina (BSA) induce la secreción de proteínas MIC de micronemos (Brown et al, 2016), por lo que también se decidió indagar si esta proteína sérica podría inducir la secreción de enzimas proteolíticas por los taquizoítos.

Los resultados de la evaluación de las diferentes condiciones y moléculas arriba indicadas en la inducción de la secreción de proteasas en parásitos aislados de cultivo celular, no fueron exitosos, toda vez que no se detectaron proteasas. Esto probablemente se deba a que los parásitos de cultivo pudieron estar sujetos a una adaptación tal, que muy probablemente se reguló la capacidad secretoria o de biosíntesis de algunas proteínas que no fueran necesarias en el contexto del cultivo celular y dentro de ellos pudieran estar las proteasas. Esta adaptación ya ha sido reportada en otros protozoarios parásitos en anteriores trabajos con *Toxoplasma gondii* (Ramírez-Flores, 2015) y con *Naegleria fowleri* (Vyas et al, 2014), una ameba de vida libre, se ha reportado que existen diferencias en la expresión y actividad proteolítica entre ET de parásitos mantenidos en cultivo celular y de

los que están en contacto con modelos animales, y en ambos se propone que componentes propios del organismo, probablemente de Matriz extracelular influyan en estas diferencias. Por otra parte, en *Acanthamoeba healyi* se ha observado que existe una sobrerregulación de los genes relacionados con la actividad proteolítica y la virulencia después de que amebas de cultivo celular tienen contacto con ratones (Moon et al. 2014) y se han reportado también incluso diferencias fenotípicas entre parásitos aislados de cultivo celular y aquéllos que están en contacto directo con un organismo vivo, como sucede con *Acanthamoeba culbertsoni*, modelo en que se observa que tiene lugar una pérdida notable de gránulos electrodensos, organelos con capacidad proteolítica, cuando las amebas son mantenidas en cultivo celular (Chávez-Munguía et al, 2016).

Con base en lo anterior, se decidió que los parásitos aislados del modelo murino probablemente podían permitirnos encontrar con mayor facilidad un factor inductor de la secreción de proteasas.

De los ensayos de estimulación de la secreción de proteasas en los taquizoítos de *T. gondii* aislados de ratón con los diversos factores previamente descritos, se encontró que sólo la incubación con BSA, indujo la secreción de dos proteasas de 181 y 235 kDa que fueron detectadas en el sobrenadante de la suspensión parasitaria ensayada, sugiriendo una secreción activa mediada por la interacción con esta proteína sérica. Estas proteasas fueron detectadas mediante zimografía en presencia de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ , y su actividad fue sensible a EGTA y 1, 10 fenantrolina, ambos quelantes de iones divalentes, por lo cual se puede afirmar que se trata de metaloproteasas secretadas al medio extracelular. Estas proteínas inducidas resultaron de la misma naturaleza que las proteasas antes encontradas por Song y Nam (2003) en productos de E/S constitutiva y por Ramírez-Flores en 2015 en ET y productos de E/S constitutiva a otros pesos moleculares.

En los ET resultantes de los parásitos estimulados con BSA a diferentes concentraciones, no se evidenció la presencia de las dos proteasas

inducidas por la exposición a BSA. Esto podría deberse a dos posibilidades: a) que las proteasas sí están expresadas en el parásito y tal vez estas están alojadas en algún organelo secretor (roptrias, micronemos, gránulos densos) pero no tienen actividad enzimática, como se ha descrito para muchas enzimas que son sintetizadas como pro-enzimas y que posteriormente son activadas por escisión peptídica probablemente por alguna de las proteasas detectadas en la secreción constitutiva, o por cambio en la conformación terciaria (Nagase, 1997) y b) que las proteasas no se han sintetizado y esto se activa por la interacción con la BSA. Esta segunda alternativa es la menos posible, toda vez que la incubación con BSA solo es de 30 min adicionales a las 2 h de secreción, lo cual no sería tiempo suficiente para que se sintetizara la cantidad suficiente de proteasas detectables en el sistema de zimografía. Aunque en *T. gondii*, no se ha estudiado a fondo este tipo de relaciones entre proteasas, existe un reporte que da evidencias de que la expresión de la proteasa TgCPL, una cisteína proteasa, es esencial para la maduración de otra proteasa, la TgCPB. Ambas proteínas se almacenan en el Compartimiento ácido vacuolar del parásito (Dou et al, 2012) .

La albúmina sérica constituye la proteína mayoritaria en plasma de mamíferos, tiene un importante papel en la presión oncótica, que es una forma de presión en el sistema circulatorio que permite que el agua cruce la barrera de los vasos capilares y penetre en el sistema circulatorio, y constituye el mayor vehículo para moléculas no solubles en el torrente sanguíneo, especialmente para ácidos grasos y hormonas (Jun et al, 2017). Es importante mencionar que, durante la diseminación de los taquizoítos, después de una infección oral, los parásitos necesitan alcanzar el torrente sanguíneo para diseminarse, ya sea dentro de células infectadas (Harker et al, 2015) o de forma libre (Furhman y Joiner, 1989; Unno et al, 2008).

La albúmina sérica ha sido utilizada como inductor de la secreción de proteasas en organismos como *Trichoderma viride* (Simkovic et al, 2008), un hongo utilizado como biocontrolador de patógenos fúngicos, y *Aspergillus*

*fumigatus* (Gifford, 2002), un hongo patógeno oportunista, abundante productor de proteasas, que afecta a individuos inmunocomprometidos. En *T. gondii* se ha reportado que, en respuesta a BSA se estimula la secreción de proteínas de micronemos (proteínas MIC) de manera dependiente de proteínas de tipo PKG (Brown et al, 2016), por lo que se necesitará realizar diferentes análisis para determinar si las proteasas secretadas por interacción con BSA provienen de los micronemos o si son secretados desde otros organelos en el parásito.

Con el fin de determinar preliminarmente el papel del calcio en la regulación de la inducción de la secreción, se realizaron preincubaciones de los parásitos con un quelante de calcio intracelular, el BAPTA-AM y posteriormente fueron expuestos a BSA en las condiciones estandarizadas. Se encontró que aún en presencia de este agente quelante, los parásitos siguieron secretando a las dos proteasas antes mencionadas, lo cual sugirió que al menos en las condiciones evaluadas, este catión no tuvo un papel relevante en la regulación de la secreción de estas proteasas. Estos resultados son similares a los reportados por Brown et al., (2016), quienes evaluando el papel de ionóforos para calcio en *Toxoplasma* encontraron que una diferencia de aproximadamente de 4.4 veces en la concentración del calcio intracelular no fue un factor esencial para determinar diferencias particulares en la capacidad del parásito para secretar el contenido de los micronemos.

En relación a la regulación de la secreción inducida por BSA, a pesar de existir reportes que relacionan procesos medulares en otros protozoarios, incluido *Toxoplasma gondii* con proteínas cinasas (Billker et al, 2004; Billker et al, 2009; Garrison et al, 2012; González del Carmen et al, 2009; Guillen, 1993; Kebaier y Vanderberg, 2010; Lourido et al, 2012; Santiago et al, 1994; Soid-Raggi et al, 1998), en los análisis introductorios diseñados para el presente trabajo no encontramos evidencia de que el  $Ca^{2+}$  o proteínas de tipo PKC o PP2C estuvieran involucradas directamente en la secreción de las

proteasas inducidas. Consecuentemente, será necesario realizar estudios con un mayor número de inhibidores de diferentes tipos de proteínas señalizadoras y utilizar diferentes concentraciones y estrategias metodológicas para disectar la vía de señalización que media el proceso de reconocimiento y respuesta a moléculas fisiológicas como la albúmina sérica.

Anteriormente, Brown et al., (2016) reportó un incremento en la secreción de proteínas de micronemos (MIC2 y MIC10) cuando los parásitos fueron estimulados con BSA. Tras el análisis por isoelectroenfoque de las proteínas de secreción constitutiva y secreción inducida, en el presente trabajo pudimos advertir que efectivamente existen diferencias en la secreción de un número considerable de proteínas cuando los parásitos son expuestos a BSA, algunas de las cuáles ya habían sido identificadas en previos reportes en productos de secreción constitutiva (Zhou et al, 2005). Sin embargo, los resultados aquí presentados son preliminares, por ello, será preciso realizar nuevos experimentos y analizar los resultados mediante espectrometría de masas para determinar la identidad de las proteínas que muestran cambios en el patrón de secreción inducida.

## 10. Conclusiones

1. La exposición de taquizoítos a diversos componentes de matriz extracelular no activó a los taquizoítos para la secreción de proteasas.
2. Los taquizoítos aislados de cultivo celular no tuvieron secreción de proteasas bajo ninguna de las condiciones de inducción evaluadas.
3. En respuesta a interacción de taquizoítos aislados de modelo murino con BSA, se indujo la secreción de dos proteasas de 181 kDa y de 235 kDa con actividad no detectable en los extractos totales.
4. La actividad de ambas proteasas dependió de  $\text{Ca}^{2+}$  y tuvieron actividades óptimas a pH 7.5 y fueron inhibidas con los quelantes de iones divalentes EGTA y 1, 10 fenantrolina a concentraciones desde 1 mM.
5. La albúmina sérica bovina (BSA) fue un factor de inducción para la secreción de las dos proteasas, pero no correspondió al blanco de hidrólisis de las mismas.
6. El calcio intracelular, proteínas de tipo PKC y PP2C aparentemente no son factores medulares para el proceso de secreción de las proteasas inducidas.
7. Existe una secreción diferencial de proteínas por taquizoítos de *T. gondii* bajo el estímulo con BSA, con el incremento o disminución de la secreción de las mismas.

## 11. Perspectivas

1. Caracterización de las rutas de señalización involucradas en el proceso de secreción inducida en el parásito *Toxoplasma gondii*.
2. Identificación molecular de las proteasas inducidas para su secreción mediante espectrometría de masas en la modalidad Label-free.
3. Generación de anticuerpos específicos contra las proteasas inducidas a fin de determinar su ubicación espacial y su papel en el proceso de diseminación e invasión.
4. Caracterización de complejos moleculares asociados a estas proteasas mediante ensayos de inmunoprecipitación e identificación proteómica de los complejos formados.
5. Desarrollar una cepa KO de cada proteasa, para determinar su papel en los diferentes procesos biológicos llevados a cabo por el parásito durante la invasión, proliferación y diseminación tisular.
6. Análisis del resultado de la interacción con otras moléculas fisiológicas, o con mezclas de las mismas en la expresión o secreción de proteasas en taquizoítos aislados del modelo murino y de cultivo celular.
7. Análisis mediante espectrometría de masas de las proteínas que incrementan o disminuyen su secreción en respuesta a BSA, detectadas por isoelectroenfoque.

## 12. Bibliografía

- Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Utheman J.M., Forter B., Camus D., Dubremetz J.F. (1991). Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **47**: 223-232
- Aldape K., Huizinga H., Bouvier J., McKerrow J. (1994). *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Experimental Parasitology* **78** (2):230-41.
- Alvarez-Sánchez M.E., Avila-González L., Becerril-García C., Fattel-Facenda L.V., Ortega-López J., Arroyo R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis* **28**:193-202.
- Angosto M.C. y Álvarez-Gómez J.Á. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **76**(1):59-84.
- Bangs J.D., Ransom D.A., Nimick M., Christie G., Hooper N.M. (2001). In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of Leishmania major GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Molecular and Biochemical Parasitology* **114**(1): 111-117.
- Barragán A. y Sibley L.D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology* **11**(9): 426-430.
- Barrett A.J. (1994). Classification of peptidases. *Methods in Enzymology* **244**:1-15.
- Bart G., Frame M.J., Carter R., Coombs G.H., Mottram J.C. (1997). Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **88**:53-61.
- Besteiro S., Bertrand-Michel J., Lebrun M., Vial H., Dubremetz J.F. (2008). Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites rhoptries: further insights into the role of cholesterol. *Biochemistry J* **415**(1):87-96.
- Billker O., Dechamps S., Tewari R., Wenig G., Franke-Fayard B., Brinkmann V. (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**: 503-514
- Billker O., Lourido S., Sibley L.D. (2009). Calcium-dependent signaling and kinases in Apicomplexan parasites *Cell Host Microbe* **5**: 612-622.
- Binder E.M., Lagal V, Kim K. (2008). The prodomain of *Toxoplasma gondii* GPI-anchored subtilase TgSUB1 mediates its targeting to micronemes. *Traffic* **9**: 1485-1496.
- Black, M.W., y Boothroyd, J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(3): 607-623.

- Brown K.M., Lourido S., Sibley L.D. (2016). Serum albumin stimulates protein kinase G-dependent microneme secretion in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*, **291**(18):9554-9565.
- Boothroyd J.C. y Dubremetz J.F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology* **6**(1):79-88.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.
- Bradley P.J. y Sibley L.D. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Current Opinion in Microbiology* **10**(6): 582-587
- Brooks C.A y Cramer S.M. (1992). Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE Journal* **38**:1969-1978.
- Brossier F., Starnes G.L., Beatty W.L., Sibley L.D. (2008). Microneme rhomboid protease TgROM1 is required for efficient intracellular growth of *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* **7**(4):664-674
- Burnett A.J., Shortt S.G., Isaac-Renton J., King A., Werker D., Bowie W.R. (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* **105**:1032-1037.
- Carlton J.M., Hirt R.P., Silva, J.C., Delcher A.L., Schatz M., Zhao Q., Johnson P.J. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**(5809):207-212.
- Carruthers V. B. (1999). Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International* **48**(1): 1-10.
- Carruthers V.B. y Sibley L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology* **73**(2): 114-123.
- Carruthers V.B., Moreno S.N. y Sibley L.D. (1999). Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca<sup>2+</sup>] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *The Biochemical Journal*, **342** (2):379-86.
- Cesbron-Delaw M.F. (1994). Dense-granules organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitology Today* **10** (8): 293-296.
- Chaturvedi S., Qi H., Coleman D., Rodriguez A., Hanson P.S., Striepen B., Roos D.S., Joiner K.A. (1998). Constitutive, calcium independent secretion of *Toxoplasma gondii* dense granules is mediated by the NSF/SNARE/SNAP/Rab machinery. *Journal of Biological Chemistry* **274**:2424-2431
- Chávez-Munguía B., Salazar-Villatoro L., Omaña-Molina M., Espinosa-Cantellano M., Ramírez-Flores E., Lorenzo-Morales J., Martínez-Palomo A.

(2016). *Acanthamoeba culbertsoni*: Electron-Dense Granules in a Highly Virulent Clinical Isolate. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **63**(6):744-750.

Chen D.Q., Kolli B.K., Yadava N., Lu H.G., Gilman-Sachs A. (2000). Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infection and Immunity* **68**:80-86.

Coombs G.H. y Mottram J.C., (1997). Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology* **114** Suppl:S61-80.

Coradi S.T. y Guimaraes S. (2006). *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite proteases. *Parasitology Research* **99**(2):131-136.

Del Carmen M., Mondragón M., González S., Mondragón R. (2009). Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology* **11**(6):967-982.

Desmots G. y Couvreur J. (1974). Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *The New England Journal of Medicine* **290**:1110–1116.

Díaz-Martín R.D. y Mondragón R. (2014). Invasión celular. Capítulo V. En: Toxoplasmosis Animal. Galván Ma. L. 1ª Edición. Amaya Ediciones, México.

Dou Z., Coppens I., Carruthers V.B. (2013). Non-canonical maturation of two papain-family Proteases in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry* **288**(5):3523-3534.

Dubey J.P., Miller N.L., Frenkel J.K. (1970). Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii* *Journal of Parasitology* **56**: 447-456

Dubey J.P. (1994). Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **205**(11):1593-1598.

Dubey J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* **28**(7): 1019-1024.

Dubey J.P. y Frenkel J.K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *Journal of Protozoology* **23**(4):537-546.

Dubey J.P., Lindsay D.S., Speer C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews* **11**(2):267-299.

Dubremetz J.F. (1998) Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Microbiology* **6**:27-30

Endo T., Sethi K., Piekarski G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Experimental Parasitology* **53**(2):179-88.

Erez E., Fass D., Bibi E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**(7245):371–378.

Ferguson D.J. (2002). *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends in Parasitology* **18**(8): 355-359.

Ferguson D.J. (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International Journal for Parasitology* **9**;34(3): 347-360.

Ferguson D.J. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**(2):133-148.

Ferrante A. y Bates E.J. (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity* **56**(12):3320-3321.

Flores-Robles D., Rosales C., Rosales-Encina J.L., Talamás-Rohana P. (2003). *Entamoeba histolytica*: A  $\beta$ 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells. *Experimental Parasitology* **103**(1-2):8-15.

Foussard F., Leriche M.A. y Dubremetz J.F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology* **102**(3):367–370.

Francia M.E. y Strepén B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nature Reviews Microbiology* **12**(2):125-136.

Frenkel J.K., Dubey J.P., Miller N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts *Science* **167**: 893-896

Friedman D.B. y Lilley K.S. (2009). Quantitative proteomics for two-dimensional gels using difference gel electrophoresis (DIGE) technology in John M Walker, *Protein Protocols*, 3a Edición, Editorial Humana.

Fuhrman S.A., Joiner K.A. (1989). *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement mediated killing. *Journal of Immunology* **142**(3):940–947.

Gadasi H. y Kessler E. (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* **39**(2): 528–531.

Galván M. y Mondragón R. (2001). *Toxoplasmosis humana*. Ed. Cuéllar, México.

Garrison E., Treeck M., Ehret E., Butz H., Garbuz T., Oswald B.P., Settles M., Boothroyd J., Arrizabalaga G. (2012). A forward genetic screen reveals that calcium-dependent protein kinase 3 regulates egress in *Toxoplasma*. *PLoS Pathogens* 8e1003049.

Gifford A.H.T., Klippenstein J.R., Margo M., Moore M. (2002). Serum Stimulates Growth of and Proteinase Secretion by *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **70**(1):19-26.

Grab D.J., Garcia-Garcia J.C., Nikolskaia O.V., Kim Y.V., Brown A., Pardo C.A., Zhang Y., Becker K.G., Wilson B.A., De la Lima A.P., Scharfstein J., Dumler J.S. (2009). Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**(7).

Greenbaum D.C., Baruch A., Grainger M., Bozdech Z., Medzihradzsky K.F. (2002). A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite. *Science* **298**:2002-2006

Gómez de León C.T. y Mondragón R. (2014). Morfología celular. Capítulo II. En: Toxoplasmosis Animal. Galván Ma. L. 1ª Edición. Amaya Ediciones, México.

Guillén N. (1993). Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Today* **9**(10):364-369.

Hadas E., y Mazur T. (1993). Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Tropical Medicine and Parasitology* **44**(3): 197-200.

Hajagos B.E., Turetzky J.M., Peng E.D., Cheng S.J., Christopher M., Souda P., Whitelegge J.P., Lebrun M., Dubremetz J.F., Bradley P. (2013). Molecular dissection of novel trafficking and processing of the *T. gondii* rhoptyr metalloprotease Toxolysin-1. *NIH Public Access* **13**(2):292-304.

Harker K.S., Ueno N., Lodoen M.B. (2015). *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunology* **3**:141-149

Hellberg A., Nickel R., Lotter H., Tannich E., Bruchhaus I. (2001). Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoebainduced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cellular Microbiology* **3**:13-20.

Hernández-Gutiérrez R., Ávila-González L., Ortega-López J., Cruz-Talonia F., Gómez-Gutiérrez G., Arroyo, R. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology* **107**(3-4): 125-135

Heussen C. y Dowdle E. B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* **102**(1): 196-202.

Hu K., Roos D.S., Murray M.J. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Cell Biology* **156**:1039–1050.

- Huet G., Richet C., Demeyer D., BisiaU H., Soudan B., Tetaert D., Degand P. (1992). Characterization of different proteolytic activities in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1138**(3): 213-221.
- Hunter A., Sibley D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 766-788.
- Hutchison W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* **206**(987): 961-962.
- Jensen K.D., Camejo A., Melo M.B., Cordeiro C., Julien L., Grotenbreg G.M., Saeij J.P. (2015). *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *mBio* **6**(2), e02280.
- Joiner K.A., Fuhrman S.A., Miettinen H.M., Kasper L.H., Mellman I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* **249**(4969):641-646.
- Jonier K.A. y Dubremetz J.F. (1993). *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infection and Immunity* **61**:1169-1172
- Joiner K.A., Beckers J.M., Bermudez D., Ossorio P.N., Schwab J.C., Dubremetz J.F. (1994). Structure and function of the parasitophorous vacuole membrane surrounding *Toxoplasma gondii*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **730**: 1-6.
- Kasper L.H. (1989). Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* **57**:568-572.
- Kebaier C., Vanderberg J.P. (2010). Initiation of *Plasmodium* sporozoite motility by albumin is associated with induction of intracellular signalling. *Int. Journal of Parasitology* **40**:25–33.
- Khan N.A., Jarroll E.L., Panjwani N., Cao Z., Paget T.A. (2000). Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(8): 2858-2861.
- Kim K. (2004). Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Tropica* **91**(1): 69-81
- Kim Y.R., Yu H.S., Kong H.H., Chung D.I. (2003). Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. *Korean Journal of Parasitology* **41**(4), 189-196.
- Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. (1993). Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Current Opinion in Cell Biology* **5**:891-7.
- Lagal V., Binder E.M.M., Huynh M.H., Kafsack B.F.C., Harris P.K., Diez R., Chen D., Cole R.N., Carruthers V.B., Kim K. (2010). *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites. *Cellular Microbiology* **12**(12):1792-1808.

- Laliberté J. y Carruthers V.B. (2011). *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **177**(1):49–56.
- Lerliche M.A. y Dubremetz J.F. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitology Research* **76**(7):559-562.
- Lerliche M.A. y Dubremetz J.F. (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology* **45**(2):249–259.
- Li E., Yang W.G., Zhang T., Stanley S.L. (1995). Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infection and Immunity* **63**(10):4150–4153.
- Lourido S., Tang K., Sibley L.D. (2012). Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion, *EMBO Journal* **31**:4524–4534.
- Luaces A. L. y Barrett A.J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* *Biochemical Journal* **250**(3):903–909.
- Luft B.J., Hafner R., Korzun A.H., Lepore C., Antoniskis D., Bosler E.M. (1993). Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine* **329**: 995–1000.
- Lycke E. y Norrby R. (1966). Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured host cells. *British Journal of Experimental Pathology* **47**: 248-256.
- Lycke E., Norrby R., Remington J. (1968). Penetration-enhancing factor extracted from *Toxoplasma gondii* which increases its virulence for mice. *Journal of Bacteriology* **96**(3):785-788.
- Lycke E., Carlberg K., Norrby, R. (1975). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infection and immunity* **11**(4):853-61.
- Mackey Z.B., O'Brien T.C., Greenbaum D.C., Blank R.B., McKerrow J.H. (2004). A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(46): 48426-48433.
- Magno R.C., Lemgruber L., Vommaro R.C., De Souza W., Attias M. (2005). Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microscopy and microanalysis* **11**(2):166-174.
- Mayer R., Picard I., Lawton P., Grellier P., Barrault C. (1991). Peptide derivatives specific for a *Plasmodium falciparum* proteinase inhibit the human erythrocyte invasion by merozoites. *Journal of Medicinal Chemistry* **34**:3029-3035.

Mazzillo F.F., Shapiro K., Silver M.W. (2013). A new pathogen transmission mechanism in the ocean: the case of sea otter exposure to the land-parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* **8**(12):e82477.

McGwire B.S., Chang K.P., Engman D.M. (2003). Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity* **71**:1008-1010.

McKerrow J.H., Caffrey C., Kelly B., Loke P., Sajid M. (2006). Proteases in Parasitic Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **1**(1):497-536.

Mckerrow J.H., Sun E., Rosenthal P.J., Bouvier J. (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology* **47**:821-853.

Mendoza-lópez M.R., Becerril-Garcia C., Avila-Gonzalez L., Ortega-Lopez J., Arroyo R., Fattel-Facenda L.V., Rui M.E. (2000). CP30 , a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. *Infection and Immunity* **68**(9):4907–4912.

Mercier C., Adjogble K.D., Daubener W., Delauw M.F. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexan parasites? *International Journal of Parasitology* **35**(14):1611-1612

Michelin A., Bittame A., Bordat Y., Travier L., Mercier C., Dubremetz J.F., Lebrun M. (2009). GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *International Journal for Parasitology* **39**(3):299-306.

Miller S.A., Steven A.T., Vandana A., James W., Blackman M.J., Kim K. (2003). TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase. *Molecular Microbiology* **49**(4):883–894.

Mitro K., Bhagavathiammai A., Bobbett G., Mckerrow J.H., Chokshi R., Chokshi B., James E.R. (1994). Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Experimental Parasitology* **78**: 377-385.

Mondragon R. y Frixione E. (1996). Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *The Journal of eukaryotic microbiology* **43**(2):120-127.

Mordue D.G., Håkansson S., Niesman I., Sibley L.D. (1999). *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental parasitology* **92**:87–99.

Morisaki J.H., Heuser J.E., Sibley, L.D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of cell science* **108** (6):2457–64.

- Mott J.D. y Werb Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Cell Biology* **16**:558-564.
- Mottram J.C., Souza A.E., Hutchison J.E., Carter R., Frame M.J., Coombs G.H. (1996). Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:6008–6013.
- Mochizuki S. y Okada Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Science* **98**:621-628.
- Montfort I., Perez-Tamayo R., Canto A.G., Tello E. (1993). Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes in vitro. *Journal of Parasitology* **79**: 98-105.
- Moon E.K., Xuan Y.H., Kong, H.H. (2014). Microarray and KOG analysis of *Acanthamoeba healyi* genes up-regulated by mouse-brain passage. *Experimental Parasitology* **143**:69-73
- Muller N. y Von Allmen N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology* **35**(13): 1339-1347.
- Muñiz S., Mondragón R. (2009). *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *Revista de Educación Bioquímica* **28**(2):52-58.
- Muñoz M.D.L, Rojkind M., Calderón J., Tanimoto M., Arias - Negrete S., Martínez - Palomo A. (1984). *Entamoeba histolytica*: Collagenolytic Activity and Virulence. *The Journal of Protozoology* **31**(3): 468-470.
- Nagase, H.(1997).Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry* **378**: 151-160
- Nadipuram S.M., Kim E.W., Vashisht A.A., Lin A.H., Bell H.N., Coppens I., Wohlschlegel J.A., Bradley P.J. (2016). In Vivo Biotinylation of the Toxoplasma Parasitophorous Vacuole Reveals Novel Dense Granule Proteins Important for Parasite Growth and Pathogenesis. *MBio* **7**(4) e00808-16
- Nishi M., Hu K., Murray J.M., Roos D.S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* **121** (9):1559–68.
- Nichols, B.A y O' Connor G.R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoo *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Laboratory Investigation* **44**:324-335.
- Nicolle C. y Manceaux L. (1908). Sur une infection á corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **147**: 763.
- Nogueira de Melo A.C., de Souza E.P., Elias C.G., Dos Santos A.L., Branquinha M.H., d'Avila-Levy C.M., Vermelho A.B. (2010). Detection of

matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* **125**(3): 256-263.

Nopal-Guerrero T. (2003). Inducción de la secreción de proteasas de *Toxoplasma gondii* durante la invasión celular y la interacción con componentes de la matriz extracelular. (Maestría en Ciencias-Bioquímica), Tesis de Maestría. CINVESTAV-Zacatenco.

North M. J. (1991). Proteinases of trichomonads and *Giardia* in: *Biochemical Protozoology*: 234-244.

Ocádiz R., Quintas E., Ortega L.L.I., García P.J, Sánchez R.M, Castillo J. T, Beatriz A., García-Rodríguez M. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology* **7**(2): 221-232.

O'Farrell P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**(10): 4007-4021

Oliveira-Jr F.O., Alves C.R., Silva F.S., Cortes L.M., Toma, L., Boucas R. I., Pereira M.C. (2013). *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins present a flagellar membrane localization and serine proteinase activity. *Parasitology* **140**(2): 171-180.

Opitz C., Di Cristina M., Reiss M., Ruppert T., Crisanti A., Soldati D. (2002). Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO Journal* **21**:1577-1585.

Osorio P.N., Schwartzman J.D., Boothroyd J.C. (1992). A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Molecular and Biochemical Parasitology* **50**(1):1-15.

Otifi Y. Z. (2012). Movable Computer Ruler (MCR): A new method for measuring the size of *Toxoplasma gondii* cyst, tachyzoites and other selected parasites. *Experimental parasitology* **130**(1):1-5

Overall C. y Kleifeld O. (2006). Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *British Journal of Cancer* **94**: 941-946.

Paredes-Santos T.C., De Souza W., Attias M. (2012). Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *Journal of structural biology* **177**(2):420-430.

Parussini F., Coppens I., Shah P., Diamond S.L., Carruthers V. B. (2010). Cathepsin L occupies a vacuolar compartment and is a protein maturase within the endo/exocytic system of *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology* **76**: 1340–1357.

Piña-Vázquez C., Reyes-López M., Ortíz-Estrada G., De La Garza M., Serrano-Luna J. (2012). Host-parasite interaction: Parasite-derived and -induced proteases that degrade human extracellular matrix. *Journal of Parasitology Research* ID 748206

Powers J.C, Asgian J.L., Ekici O.D., James K.E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical Reviews* **102**(12):4639–4750.

Que X., Ngo H., Lawton J., Gray M., Liu Q., Engel J., Brinen L., Ghosh P., Joiner K.A., Reed S.L. (2002). The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25791–25797.

Rakash S., Rana F., Rafiq S., Masood A., Amin S. (2012). Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **7**(4):90–101.

Ramírez-Flores C.J. (2015). Expresión diferencial y caracterización de proteasas de taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* aislados de un modelo murino y de cultivo celular (Maestría en Ciencias-Bioquímica). Tesis de Maestría. CINVESTAV-Zacatenco.

Rani K., Rana R., Datt S. (2012). Review on Latest Overview of Proteases. *International Journal of Current Life Sciencs* **2**(1):12-18.

Reed S.L., Keene W.E., Mckerrow J.H. (1989). Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **27**(12):2772-2777

Remington J.S., McLeod R., Desmonts G. (1995). Toxoplasmosis. En: *Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant*. Philadelphia: W.B. Saunders Company: 140–267

Roberts F., y McLeod R. (1999). Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitology Today* **15**: 51–57.

Robertson C. D., North M.J., Lockwood B.C., Coombs G. H . (1990). Analysis of the proteinases of *Trypanosoma brucei*. *Journal of General Microbiology* **136**:92 1-925

Rosenblum G., Meroueh S., Toth M., Fisher J.F., Fridman R., Mobashery S., Sagi I. (2007). Molecular structures and dynamics of the stepwise activation mechanism of a matrix metalloproteinase zymogen: Challenging the cysteine switch dogma. *Journal of the American Chemical Society* **129**(44):13566–13574.

Rugarabamu G., Marq J.B., Guérin A., Lebrun M., Soldati-Favre D. (2015). Distinct contribution of *Toxoplasma gondii* rhomboid proteases 4 and 5 to micronemal protein protease 1 activity during invasion. *Molecular Microbiology* **97**(2):244-262.

Russell D.G. y Sinden R.E. (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *Journal of Cell Science* **50**:345–359.

Saboia-Vahia L., Cuervo P., Borges-Veloso A., de Souza N. P., Britto C., Diaz-Lopez G., De Jesus J.B. (2014). The midgut of *Aedes albopictus*

females expresses active trypsin-like serine peptidases. *Parasit Vectors* **7**: 253

Sadak A., Taghy Z., Fortier B., Dubremetz J.F. (1988). Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **29**(2-3):203-211.

Sajid M. y McKerrow J.H., (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* **120**(1):1–21.

Sampieri C.L., de la Pena S., Ochoa-Lara M., Zenteno-Cuevas R., Leon-Cordoba K. (2010). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis. *World Journal Gastroenterology* **16**(12): 1500-1505.

Santiago A., Carbajal M.E., Benítez-King G., Meza I. (1994). PKC Transduction pathway Activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Experimental Parasitology* **79**:436- 444

Schrevel J., Grellier P., Mayer R., Monsigny M. (1988). Neutral proteases involved in the reinvasion of erythrocytes by *Plasmodium merozoites*. *Biol Cell* **64**:233-244.

Schwartzman J.D., Krug E.C. (1989). *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. *Experimental parasitology* **68**(1):74-82

Serrano-Luna, J., Cervantes-Sandoval I., Calderon J., Navarro-Garcia F., Tsutsumi V., Shibayama M. (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Canadian Journal of Microbiology* **52**(1): 16-23.

Sharma P. y Chitnis C.E. (2013). Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. *Current Opinion in Microbiology* **16**(4):432-437.

Shaw M.K., Roos D.S., Tilney L.G. (1998). Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii* . *Parasitology* **117**:435-443.

Schulte W. y Scholze H. (1989). Action of the Major Protease from *Entamoeba histolytica* on Proteins of the Extracellular Matrix. *The Journal of Protozoology* **36**(6): 538-543.

Sheiner L., Santos J.M., Klages N., Parussini F., Jemmely N., Friedrich N., Ward G.E., Soldati-Favre D. (2010). *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Molecular Microbiology* **77**: 912-929.

Shen B., Buguliskis J.S., Lee T.D., Sibley L.D. (2014). Functional analysis of rhomboid proteases during *Toxoplasma* invasion. *mBio* **5**(5):1-14.

Sibley L.D. (1993). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. *Seminars in Cell Biology* **4**(5):335–344.

Sibley L.D. y Krahenbuhl J.L. (1988). Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. *European Journal of Cell Biology* **47**(1):81–87.

Sibley L.D, Krahenbuhl J.L., Adams G.M.W., Weidner E. (1986). *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *Journal of Cell Biology* **103**(3):867–874.

Sibley L.D. (2010). How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Current Opinion in Biotechnology* **21**(5):592–598.

Sibley L.D., Weidner E., Krahenbuhl J.L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* **315**(6018):416–9.

Sissons J., Alsam S., Goldsworthy G., Lightfoot M., Jarroll E. L., Khan N.A. (2006). Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiology* **6**: 42

Simkovi M., Kurucova A., Hunova M., Varecka L. (2008). Induction of Secretion of Extracellular Proteases from *Trichoderma viride*. *Acta Chimica Slovaca* **1**(1):.250–264

Soid-Raggi L.G., Torres-Márquez M.E., Meza I. (1998). *Entamoeba histolytica*: identification of functional Gs and Gi proteins as possible signal transduction elements in the interaction of trophozoites with fibronectin. *Experimental parasitology* **90**(3):262–269

Speer C.A., Clark S., Dubey J.P. (1998). Ultrastructure of the oocyst, sporocyst and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* **84**(3):505-512.

Splendore A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de'conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* **5**: 167

Springman E. B., Angleton E. L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H. E. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 364-368.

Sternlicht, M. D. y Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 463-516.

Tenter A.M., Heckeroth A.R., Weiss L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* **30**: 1217-1258.

Unno A., Suzuki K., Xuan X., Nishikawa Y., Kitoh K., Takashima Y. (2008). Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitology International* **57**(4):515-518.

Vyas I.K., Jamerson M., Cabral G., Marciano-Cabral F. (2015). Identification of peptidases in highly pathogenic vs. weakly pathogenic *Naegleria fowleri* amoebae. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **62**(1): 51–59.

Visse R., y Nagase H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92(8): 827-839.

Werk R. (1985). How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Reviews of Infectious Diseases* **7**(4):449–457.

Wessel D. y Flüggé U.I. (1984). A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Analytical Biochemistry* **138**:141–143

Williams A. G. y Coombs G. H. (1995). Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *International Journal for Parasitology* **25**(7): 771-778.

Zhang Z., Wang L., Seydel K.B., Li E., Ankri S. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Molecular Microbiology* **37**:542–48.

Zhou X.W., Kafsack B.F., Cole R.N., Beckett P., Shen R.F., Carruthers V.B. (2005). The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **280**:34233–44.