



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA

“Caracterización de una cinasa apical de *Toxoplasma gondii* involucrada en la extrusión del conoide”

TESIS

Que presenta el

BIÓL. NOÉ LAGUNAS CORTÉS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

Director de la tesis: Dr. Ricardo Mondragón Flores

Ciudad de México

Septiembre 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.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca crédito otorgada de Agosto del 2015 a Agosto del 2017, con número de registro 589929.

El presente proyecto se desarrolló con apoyo del apoyo a la Investigación Médica otorgada al Dr. Ricardo Mondragón por la Fundación Miguel Alemán A.C. Año 2016.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Mondragón Flores, por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, por su asesoría e ideas que permitieron cumplir con las metas de este trabajo, por su apoyo y dirección que contribuyó a formarme profesionalmente durante el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco a mis sinodales:

Dr. Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes (Departamento de Bioquímica)

Dr. José Manuel Hernández Hernández (Departamento de Biología Celular)

Por sus comentarios y puntos de vista que sin duda enriquecieron el contenido de esta tesis, además por el tiempo invertido en ella.

Agradezco a la Q.F.B Mónica Mondragón Castelán, auxiliar de investigación del laboratorio 16 del departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN por la asistencia proporcionada.

Agradezco a la Q.F.B. Sirenia González Pozos de la Unidad de Microscopia Electrónica por la asistencia técnica proporcionada durante el análisis de microscopía electrónica.

Agradezco a la Dra. Carmen Tlazoltéotl Gómez de León por brindarme las bases de este trabajo.

Agradezco al Ing. José Claudio Jiménez Vargas por brindarme el material necesario.

Agradezco a Lic. Priscila González Ceja, secretaria de la Coordinación Académica Departamental, por su apoyo en los tramites académicos.

Agradezco a la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco por el apoyo proporcionado.

Esta tesis está dedicada a:

Este trabajo se realizó gracias al esfuerzo de muchas personas que me ayudaron a crecer en lo académico y personal.

Quisiera agradecer de manera muy especial al, apoyo, cariño y al esfuerzo realizado por mi mamá Concepción y a mi papá Mario Antonio, que sin cuestionarme nada me apoyaron en todo lo que pudieron, los quiero mucho papá y mamá.

A mis hermanas Andrómeda y Ana Iris, las quiero mucho.

De igual manera quisiera reconocer, agradecer y dedicar esta tesis a todos mis amigos que estuvieron presentes en el desarrollo de este trabajo, sin embargo, quisiera agradecer de manera especial a:

Carlos Jorge porque siempre confió en mí, por su amistad, por sus consejos, por el tiempo dedicado y por todas esas salidas improvisadas.

A Rosalba porque siempre estuvo al tanto de mi avance y también por sus sabios consejos.

A Mónica porque siempre me ayudó y me aconsejó incondicionalmente.

A Pancho porque siempre está dispuesto a ayudar sin importar nada.

A Kitzia por sus consejos y amistad.

A Felipe, Jonnatan y Suriel porque siempre estuvieron al pendiente de mi avance.

A Fernando, Diego, Sebastián, Amadeo, Alina, Mireya, Aldo y Frodo por su amistad.

Contenido

Índice de figuras.....	X
Abreviaturas.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
Introducción.....	1
Generalidades.....	1
Ciclo de vida.....	2
Invasión celular.....	4
Formas parasitarias de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Morfología.....	9
Complejo apical.....	9
Películo.....	9
Citoesqueleto.....	10
Organelos secretores.....	10
Citoesqueleto.....	12
Microtúbulos.....	12
Conoide.....	14
Extrusión del conoide y su regulación en <i>Toxoplasma gondii</i>	15
Cinasas en <i>Toxoplasma gondii</i>	18
AGC cinasas.....	18
Casein cinasa I.....	20
Familia de las CMCG (cinasas dependientes de ciclina).....	21
Familia de las CDPK (cinasas dependientes de calcio).....	21
ROP cinasas.....	24
Hipótesis.....	29
Justificación.....	30
Objetivo general:.....	31
Objetivos particulares:.....	31
Metodología.....	32

Animales.....	32
Obtención y mantenimiento de la cepa de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
Obtención del extracto total	32
Obtención de la fracción de citoesqueleto.....	32
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	33
Tinción con azul de Coomassie.....	33
Tinción de los geles de PAGE-SDS con nitrato de plata	33
Electroforesis.....	34
Western blot	34
Inmunofluorescencia.....	35
Gel bidimensional.....	36
Purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad	37
Inmunoprecipitación.....	37
Cromatografía de afinidad para la purificación de la TgAGC cinasa.....	38
Espectrometría de masas de alta definición.....	39
Análisis bioinformático	39
Resultados.....	40
Caracterización bioinformática de la cinasa perteneciente a la familia AGC de <i>Toxoplasma gondii</i>	40
Aislamiento del citoesqueleto	42
Validación del correcto aislamiento del citoesqueleto.....	42
Obtención del anticuerpo y purificación	45
Purificación de anticuerpo α -AGC	47
Análisis de del epítipo del anticuerpo anti-AGC cinasa en la base de datos de NCBI..	48
Identificación de las proteínas presentes en las bandas de 80, 55 y 36 kDa mediante espectrometría de masas	51
Inmunoprecipitación en condiciones reductoras y nativas	59
Análisis del inmunoprecipitado de citoesqueleto mediante espectrometría de masas	61
Geles bidimensionales.....	62
Purificación de la AGC cinasa.....	62
Análisis del purificado mediante cromatografía de afinidad de citoesqueleto mediante espectrometría de masas	65

Discusión 69

Conclusiones 76

Perspectivas 77

REFERENCIAS..... 78

Índice de figuras

Figura 01. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Figura 02. Ciclo intracelular de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 03. Diagrama del taquizoíto de <i>T. gondii</i>	7
Figura 04. Películo de <i>Toxoplasma gondii</i>	13
Figura 05. Diagramas de la organización de los microtúbulos.....	14
Figura 06. Estructura del conoide.....	15
Figura 07. Participación de PKC en la extrusión del conoide inducida por etanol.....	17
Figura 08. La secreción de <i>T. gondii</i> es controlada por cinasas.....	20
Figura 09. Análisis filogenético de las cinasas dependientes de calcio en Apicomplexas y plantas.....	23
Figura 10. Secuencia de aminoácidos de la AGC cinasa.....	26
Figura 11. Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal.....	27
Figura 12. Distribución conoidal y perinuclear de AGC.....	28
Figura 13. Identificación de los dominios de la AGC cinasa mediante PROSITE.....	41
Figura 14. Aislamiento del citoesqueleto subpelicular de taquizoítos de <i>T. gondii</i> y observación mediante MET.....	43
Figura 15. Perfil electroforético diferencial de la fracción de citoesqueleto.....	44
Figura 16. Western blot para validar el aislamiento de citoesqueleto.....	45
Figura 17. Western blot de los 6 hibridomas obtenidas.....	46
Figura 18. Determinación de la dilución de anticuerpo a utilizar.....	47
Figura 19. Espectro de elución del anticuerpo 1B1E9B7.....	48
Figura 20. SDS-PAGE del anticuerpo purificado.....	48
Figura 21. BLAST del epítipo TRRGDFSPREKREA en la base de datos de NCBI.....	49
Figura 22. Ensayo de bloqueo de anticuerpo con el antígeno (péptido B7).....	50
Figura 23. Western blot nativo de citoesqueleto.....	51
Figura 24. SDS-PAGE de citoesqueleto y su Western Blot.....	52
Figura 25. Gráfica de pastel de las proteínas encontradas en la banda correspondiente al peso molecular de 36 kDa.....	56
Figura 26. Gráfica de pastel de las proteínas encontradas en la banda correspondiente al peso molecular de 55 kDa.....	57
Figura 27: Gráfica de pastel de las proteínas encontradas en la banda correspondiente al peso molecular de 80 kDa.....	58
Figura 28. Inmunoprecipitación de AGC cinasa en citoesqueletos aislados.....	59
Figura 29. Inmunoprecipitación nativa de AGC cinasa en citoesqueletos aislados.....	61

Figura 30: Gráfica de pastel de las proteínas encontradas en el inmunoprecipitado de citoesqueleto.	71
Figura 31. Perfil electroforético 2D de citoesqueleto <i>Toxoplasma gondii</i>.	62
Figura 32. Purificación de la AGC cinasa por columna de afinidad.	63
Figura 33. Separación electroforética de la AGC cinasa purificada y su detección por Western blot.	64
Figura 34: Gráfica de pastel de las proteínas encontradas en el purificado mediante cromatografía de afinidad.	66

Abreviaturas

VP	Vacuola parasitófora
CMI	Complejo membranar interno
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
TgPKG	Proteín cinasa G de <i>T. gondii</i>
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
PKA	Proteína cinasa A
RE	Retículo endoplásmico
CK1	Casein cinasa
CMCG	Cinasas dependientes de ciclina
CDPK	Cinasas dependientes de calcio
MET	Microscopia electrónica de transmisión
ET	Extracto total
CK	Citoesqueleto

RESUMEN

Durante la invasión activa por *Toxoplasma*, se llevan a cabo dos procesos dinámicos: a) un movimiento de deslizamiento sobre la membrana plasmática de la célula hospedera y b) la extrusión del conoide. En parásitos extracelulares, la extrusión del conoide puede ser activada mediante la exposición a etanol 0.5 M en un proceso reversible y reinducible. La caracterización funcional de la extrusión del conoide mostró que es un proceso que depende de Ca^{2+} intracelular. Mediante el uso de inhibidores específicos, se demostró que en la extrusión del conoide participa: a) una fosfolipasa C, b) el receptor de IP3. Los inhibidores de cinasas estaurosporina, callostina C, BIM I y Gö6983, que son inhibidores de cinasas treonina/serina, causaron la inhibición de la extrusión del conoide de manera dependiente de la concentración, quedando así caracterizada parcialmente la vía que regula la extrusión del conoide con la participación de cinasas tipo PKC. En una búsqueda previa de una PKC en el genoma de *T. gondii*, no obstante, no se encontró una PKC como tal, pero sí se encontró una cinasa perteneciente a la familia AGC con un dominio C-terminal de PKC. Se realizó el análisis de antigenicidad y accesibilidad de esta proteína a fin de determinar algún péptido inmunogénico que se pudiera utilizar para inmunizar ratones a fin de generar anticuerpos. Se escogió y se sintetizó un péptido de 14 aminoácidos con el que se inmunizaron dos ratones Balb-c (supermouse libre de patógenos) para producir anticuerpos monoclonales generándose varias clonas productoras de anticuerpos monoclonales. Se determinó mediante Western blot la presencia de una proteína que se encuentra enriquecida en la fracción de citoesqueleto del parásito. El análisis de distribución mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, evidenció a la molécula reconocida con los anticuerpos ubicada en la región del conoide. En el presente trabajo, se corroboró la información obtenida previamente mediante métodos bioinformáticos, encontrándose adicionalmente que esta cinasa tiene un pI teórico de 5.3 y PM de 103 kDa. Mediante isoelectroenfoque y Wb se detectaron varias aparentes isoformas de la proteína, incluyendo entre ellas a la que corresponde al punto isoelectrónico teórico. Las moléculas purificadas mediante cromatografía de afinidad así como los productos de la inmunoprecipitación se analizaron mediante espectrometría de masas a fin de poder identificarlas. De las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas algunas son cinasas, sin embargo, no poseen el epítipo de reconocimiento del anticuerpo. Algunas proteínas no cinasas como la proteína hipotética TGME49_220510 posee 6 de 14 aminoácidos que corresponden al epítipo completo. Adicionalmente se determinó la existencia de dos cinasas dependientes de Ca^{2+} ; la CDPK1 y CDPK3 con un 40 y 35% de identidad. Debido al requerimiento del catión calcio, se propone su posible participación en el proceso de extrusión del conoide. A pesar de los esfuerzos realizados, considero que la razón por la cual no se pudo detectar o aislar a la cinasa de nuestro interés pudo deberse a que algunos residuos del epítipo se encuentra parcialmente presente en muchas más proteínas en *Toxoplasma gondii*, además de la proteína de estudio

ABSTRACT

During the active invasion by *Toxoplasma*, two dynamic processes are carried out: a) a sliding movement on the plasma membrane of the host cell and b) the extrusion of the conoid. In extracellular parasites, conoid extrusion can be activated by exposure to 0.5 M ethanol in a reversible and re-inducible process. The functional characterization of the conoid extrusion showed that it is a process that depends on intracellular Ca^{2+} . By the use of specific inhibitors, it was demonstrated that in the extrusion of the conoid participates: a) a phospholipase C, b) the receptor of IP₃. The kinase inhibitors staurosporine, calphostin C, BIM I and Gö6983, which are inhibitors of threonine / serine kinases, caused the inhibition of conoid extrusion in a concentration-dependent manner, thus partially characterizing the pathway regulating the conoid extrusion with the participation of kinases type PKC. In a previous search for a PKC in the genome of *T. gondii*, however, no PKC was found as such, but a kinase belonging to the AGC family with a C-terminal domain of PKC was found. The antigenicity and accessibility analysis of this protein was performed in order to determine some immunogenic peptide that could be used to immunize mice in order to generate antibodies. A 14 amino acid peptide was chosen and synthesized with which two Balb-c mice (pathogen free supermouse) were immunized to produce monoclonal antibodies generating several clones producing monoclonal antibodies. The presence of a protein enriched in the cytoskeleton fraction of the parasite was determined by Western blotting. The analysis of distribution by immunofluorescence and confocal microscopy, evidenced the molecule recognized with the antibodies located in the conoid region. In the present work, the previously obtained information was corroborated by bioinformatic methods, and it was found that this kinase has a theoretical pI of 5.3 and PM of 103 kDa. By means of isoelectrofocusing and Wb several apparent isoforms of the protein were detected, including among them corresponding to the theoretical isoelectric point. The molecules purified by affinity chromatography as well as the products of the immunoprecipitation were analyzed by mass spectrometry in order to be able to identify them. Of the proteins identified by mass spectrometry some are kinases, however, they do not possess the antibody recognition epitope. Some non-kinase proteins such as the hypothetical TGME49_220510 protein have 6 of 14 amino acids corresponding to the complete epitope. Additionally, the existence of two Ca^{2+} -dependent kinases was determined; the CDPK1 and CDPK3 with a 40 and 35% identity. Due to the calcium cation requirement, its possible participation in the conoid extrusion process is proposed. In spite of the efforts made, I consider that the reason why the kinase could not be detected or isolated from our interest could be due to the fact that some epitope residues are partially present in many more proteins in *Toxoplasma gondii*, in addition to the protein study

Introducción.

Generalidades

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado perteneciente al reino protozoa. El nombre de *Toxoplasma* significa “forma de arco” en griego, llamado así por su morfología en forma de media luna, y de *Ctenodactylus gondii*, roedor del cual fue aislado por primera vez *T. gondii* en 1908 en el norte de África por Nicolle y Manceaux (Joynson, D. h. m. & wreghitt 2001). Perteneció al *phylum* Apicomplexa el cual contiene otros organismos patógenos para el ser humano como son *Plasmodium spp.* (malaria), *Cryptosporidium spp.* (cryptosporidiosis), y *Eimeria spp.* (poultry coccidiosis). Forma parte de la clase Sporozoa y subclase coccidia siendo la única especie del género *Toxoplasma* (DUBEY 1994). Es uno de los parásitos más exitosos a nivel mundial ya que puede infectar a todos los animales de sangre caliente incluyendo al hombre, se estima que un tercio de población mundial se encuentra infectada con *Toxoplasma gondii* (Innes 2010).

La toxoplasmosis es una de las infecciones parasitarias más comunes en el hombre, su prevalencia varía de lugar a lugar, en los Estados Unidos y en Reino Unido se estima que del 16 al 40% de la población se encuentra infectada, mientras que en México representa aproximadamente un 34-65% de prevalencia de anticuerpos, principalmente en las zonas costeras del país (Hill & Dubey 2002; Castrejon et al. 1992)

Toxoplasma produce una parasitosis crónica normalmente asintomática en individuos inmunocompetentes, pero en personas que presentan estados de inmunosupresión como son los enfermos de SIDA o que se encuentran sometidas a tratamientos anti-cancerígenos o inmunosupresores generalmente ocasiona encefalitis y muerte (McFadden et al. 2001). En mujeres embarazadas *Toxoplasma* es capaz de atravesar la barrera placentaria ocasionando diversos daños en el

producto dependiendo del periodo de gestación en el cual se lleva a cabo la infección. Si la infección se adquiere durante el primer trimestre del embarazo existe un alto riesgo de aborto. La infección durante el segundo y tercer trimestre del embarazo se asocia con malformaciones, coriorretinitis y ceguera, así como daños pulmonares, en corazón y cerebro, esta infección es conocida como toxoplasmosis congénita (Calil 1981).

La terapia más efectiva usada contra la toxoplasmosis consiste en el empleo de fármacos con actividad anti-folato, tales como la combinación de pirimetamina y sulfadiazina, sin embargo la baja eficacia y la presencia de efectos secundarios junto con su incapacidad de atravesar la pared quística representan un problema para su empleo contra el parásito (Haverkos 1987).

Ciclo de vida

Toxoplasma gondii es capaz de replicarse e infectar cualquier célula nucleada en animales de sangre caliente, su ciclo de vida se divide entre sus hospederos intermediarios en donde se incluye a todos los animales de sangre caliente (mamíferos, aves y hombre) y sus hospederos definitivos los cuales abarcan a todos los felinos, que es donde se lleva a cabo el ciclo asexual y sexual respectivamente (Black & Boothroyd 2000).

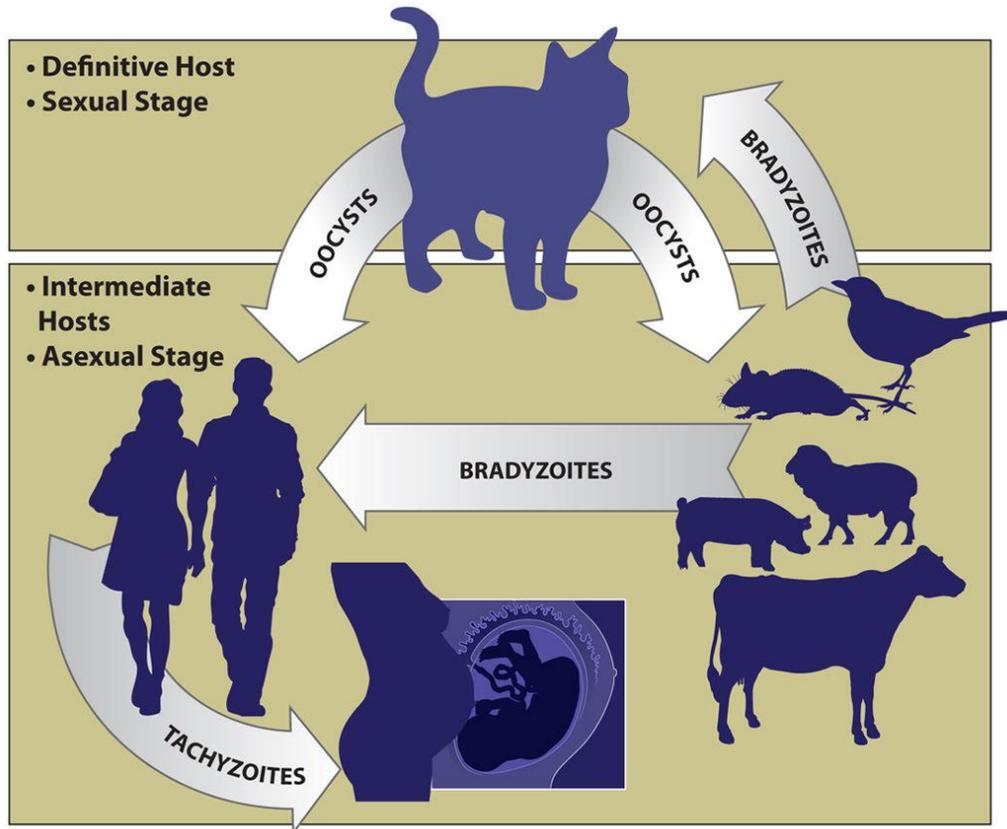


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. El hospedero definitivo de *Toxoplasma* es el gato, es el único organismo capaz de desarrollar el estadio sexual del parásito. El gato infectado excreta los ooquistes en el medio ambiente, estos son los responsables de infectar a los animales de sangre caliente que sirven como hospederos intermedios, dentro de los hospederos intermedios *Toxoplasma* persiste como bradizoítos dentro del quiste tisular. Los humanos se infectan de dos formas: exposición directa mediante consumo de agua contaminada o vegetales, y la ingestión de quistes tisulares en la carne mal cocida. Infección primario del feto puede ocurrir durante el embarazo si los taquizoítos cruzan la barrera placentaria produciendo defectos de nacimiento o aborto (Lin & Scott 2012).

Cuando los hospederos intermediarios consumen a los ooquistes maduros presentes en agua y alimentos contaminados o a los quistes tisulares presentes en los tejidos de animales infectados da inicio la fase de replicación asexual del parásito. En el hombre, la infección puede darse directamente por el consumo de ooquistes o mediante el consumo de carne mal cocida contaminada con quistes tisulares (DUBEY 1994). Luego de la ingesta, la capa quitinosa del ooquiste o

quiste tisular es destruida a nivel intestinal, liberando a los esporozoitos o bradizoítos respectivamente, invadiendo de forma inmediata a las células del epitelio intestinal, alojándose dentro de una vacuola parasitófora (VP) en donde proliferan y se diferencian a taquizoítos altamente móviles e infectivos, los taquizoítos atraviesan la barrera intestinal y se diseminan de manera rápida e incontrolada mediante la circulación sanguínea y dentro de macrófagos a lo largo de todo el cuerpo, invadiendo a todas las células nucleadas del hospedero intermediario (Figura 1). Cuando la respuesta inmune del hospedero se activa en presencia del parásito, se producen anticuerpos específicos y se activan células T específicas con la liberación de citocinas como el interferón, desencadenando una respuesta de diferenciación del parásito que se conoce como cistogénesis, la cual consiste en la transformación del taquizoíto a la forma de lenta proliferación, el bradizoíto, modificando a la célula hospedera en un quiste tisular el cual es resistente a la acción de los fármacos y de las células efectoras de la respuesta inmune. Los bradizoítos entran en un estadio de proliferación lenta y latencia que les permite sobrevivir dentro del quiste tisular por toda la vida del individuo (DUBEY 1994; Ferguson 2004).

Invasión celular

Toxoplasma gondii presenta 2 tipos de invasión, la invasión pasiva que se lleva a cabo en células fagocíticas como son los macrófagos y neutrófilos y la invasión activa en células no fagocíticas. El éxito de *Toxoplasma* se debe en gran medida a su capacidad para invadir y replicarse dentro de casi todos los tipos de células. La invasión pasiva se lleva a cabo por la fagocitosis de los parásitos principalmente por los macrófagos los cuales en caso de no estar activados con INF- γ son incapaces de degradar al parásito ya que éste transforma rápidamente el fagosoma en una VP, llegando a funcionar los macrófagos como un sistema de transporte y diseminación de *T. gondii* por todo el cuerpo. Por otro lado, la invasión activa se lleva a cabo en la gran mayoría de las células del organismo que carecen de propiedades fagocíticas, involucra una serie de eventos en los cuales

el parásito es la célula efectora. Esta invasión inicia cuando *Toxoplasma* reconoce y se adhiere a la célula hospedera mediante la secreción del contenido de los micronemos (Carruthers & Sibley 1999).

El parásito entonces se desliza sobre la superficie de la célula hospedera y extruye su conoide orientándolo sobre la membrana plasmática, simultáneamente secreta el contenido de las roptrías en el punto de contacto con la célula hospedera generando una horadación de menos de 1 μm de a través de la cual el parásito se internaliza mediante una constricción de su cuerpo y mediante movimientos de tipo tornillo (Dubremetz et al. 1998; Werk, 1985).

Inmediatamente después de la entrada del parásito se forma la VP, la cual es un compartimento que evita la acidificación y fusión con otras vesículas endocíticas, incluyendo lisosomas y endosomas, evitando la degradación del parásito (Mordue et al. 1999). Una vez dentro de la VP, los parásitos secretan el contenido de los gránulos densos para formar una red de estructuras nanotubulares intravacuolares. La membrana de la VP forma la interfase entre el parásito y la célula hospedera, y así regula la captación de metabolitos, transporte de nutrientes y tráfico de proteínas del parásito (Sibley et al. 1995). Después de 48 h, los taquizoítos dentro de la VP saturan el espacio intravacuolar y salen, destruyendo a la célula infectada e iniciando la invasión de células vecinas (Figura 2).

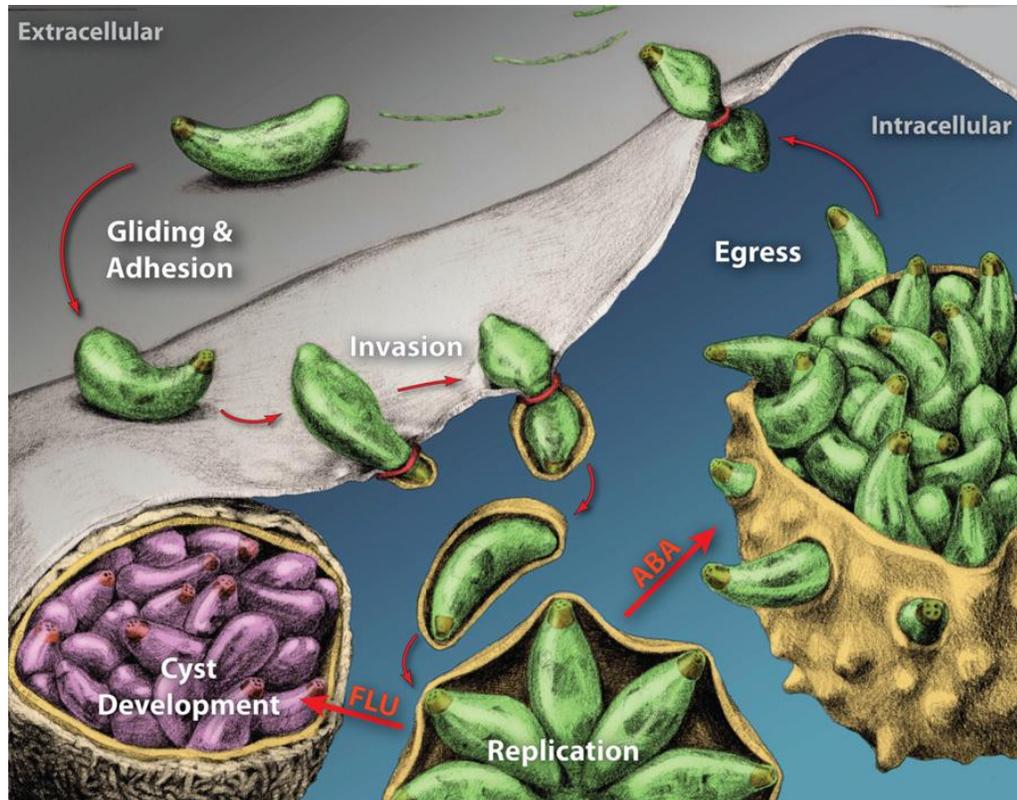


Figura 2. Ciclo intracelular de *Toxoplasma gondii*. Los taquizoítos se adhieren a la superficie de la célula y utiliza su motilidad basada en actina-miosina para invadir la célula hospedera. La adhesión esta mediada por las proteínas de los micronemos y al momento de la invasión se forma el anillo de constricción entre las membranas del hospedero y el parásito formado por proteínas de las roptrías (anillo rojo). Una vez dentro, el parásito se replica provocando el agrandamiento de la vacuola y la acumulación de ácido abscísico (ABA), el cual eventualmente gatilla el egress y conduce a la formación de un quiste en reposo (Tomado de Billker et al. 2009).

Formas parasitarias de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma presenta 3 estadios infecciosos durante su ciclo de vida, el taquizoíto, que es altamente móvil e infeccioso, el bradizoíto, de lenta proliferación encontrado dentro de quistes tisulares y el esporozoíto, localizado en el interior de ooquistes maduros. De los 3 estadios diferentes, el taquizoíto es el más estudiado.

Taquizoíto

El taquizoíto es la forma sexual invasiva de *Toxoplasma* presente solamente en los hospederos intermediarios, es capaz de infectar a todas las células del cuerpo alojándose dentro de una VP, en donde prolifera rápidamente por un proceso asexual llamado endodiogenia, es decir por la formación de 2 células hijas en el interior de una célula madre, su tiempo de división le lleva aproximadamente 6 h (Dubey 1998). El taquizoíto tiene forma de arco o media luna y mide de 4-7 μm de longitud y 2-3 μm de ancho. Posee un películo trimembranal, un núcleo situado en la parte central, una única mitocondria alargada localizada generalmente cerca del núcleo, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, una serie de almacenes acídicos de calcio denominados ácidocalcisomas, y un apicoplasto de 4 membranas, el cual es un plástido no fotosintético adquirido por endosimbiosis primitiva (Figura 3) (DUBEY 1994). El parásito presenta un extremo posterior el cual es redondeado y un extremo anterior que termina en punta también conocido como extremo apical, que es donde se localizan diversos organelos como el conoide, los anillos anteriores y el anillo polar, presenta además tres organelos secretores involucrados en la invasión celular llamados roptrías, micronemos y gránulos densos (Leriche & Dubremetz 1991).

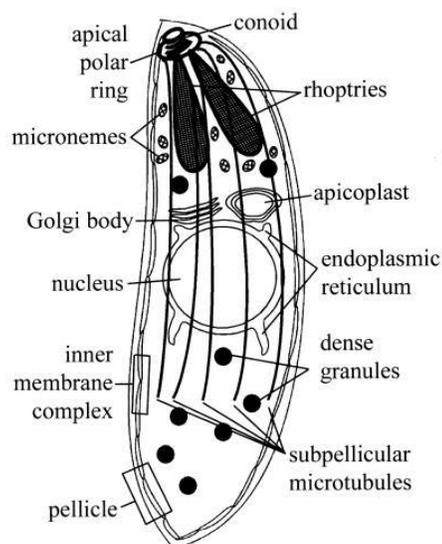


Figura 3. Diagrama del taquizoíto de *T. gondii*. Los principales componentes como películo, organelos secretores y componentes de complejo apical, y apicoplasto son indicados (Morrissette & Sibley 2002).

Bradizoíto

El término bradizoíto (*brady* = lento en griego) fue acuñado por Frenkel para describir al estado presente dentro de los quistes tisulares, también llamado *cistocito*, comparado con los *taquizoítos*, ésta es la forma de lenta reproducción del parásito, poseen una forma de media luna y miden de 7 x 1.5 μm . (Dubey et al., 1998). Los bradizoítos se desarrollan dentro de los quistes tisulares en el interior de células hospederas en una amplia variedad de tejidos, pero son más comunes en tejidos musculares y neuronales como el cerebro, corazón y músculo esquelético y retina (Ferguson DJ 1987).

Ultraestructuralmente los bradizoítos difieren ligeramente de los *taquizoítos*, en que en ellos el núcleo se encuentra situado en la región posterior, mientras que en los *taquizoítos* está localizado más centralmente, además el contenido de las roptrías es usualmente más electrodensa, lo cual varía dependiendo de la edad del quiste tisular, mientras más viejo sea el quiste más electro densas son las roptrías, la mayoría de los bradizoítos poseen de 1 a 3 roptrías. En los bradizoítos se observa un incremento en el número de micronemos, así como la presencia de gránulos de amilo pectina, estos últimos se encuentran ausentes o en cantidades muy discretas en los *taquizoítos* (Dubey 1998; Weiss & Kim 2000).

Esporozoíto

El esporozoíto es el estadio que se desarrolla dentro de los ooquistes. Estas son estructuras esféricas rodeadas por una doble pared de naturaleza quitinosa. El ooquiste que se libera en las heces de los gatos infectados, esporula en el medio ambiente en un lapso de 1 a 5 días después de la excreción adquiriendo una forma ovoide con un tamaño de 10-12 μm , generándose por división celular 8 esporozoítos infectivos. Ultraestructuralmente, el esporozoíto es similar al *taquizoíto* excepto por que tiene más micronemos y roptrías. El ooquiste puede permanecer más tiempo

viable si hay humedad relativamente alta en el ambiente (Frenkel et al. 1970; Dubey 1998).

Morfología

Complejo apical

Dentro de las características que distinguen al phylum Apicomplexa, se encuentran orgánulos que forman el complejo apical tales como: el conoide, el anillo polar apical, los anillos preconoidales, y 2 microtúbulos cortos centrales (Nichols & Chiappino 1987).

Películo

Es un complejo trimembranal constituido por la membrana plasmática la cual cubre totalmente al organismo y por el complejo membranal interno (CMI) que se forma a partir de 11 vesículas aplanadas en forma de mosaico provenientes del sistema Golgi-RE, las cuales se encuentran abiertas hacia los extremos anterior y posterior. El películo está involucrado en eventos dinámicos de secreción, motilidad y evasión de la respuesta inmune (Mann & Beckers 2001). Los componentes de la membrana son liberados durante la motilidad a través de un proceso denominado capping, en el cual algunos elementos pueden ser desplazados desde el extremo apical con dirección hacia el extremo posterior en donde dichos elementos son liberados. El películo posee proteínas relacionadas al citoesqueleto como actina, lo cual apoya la propuesta de ser una estructura implicada en motilidad (Foussard et al. 1990). Asimismo, se han detectado una serie de partículas intramembranales (PIM) embebidas en el IMC con una disposición alineada siguiendo una dirección helicoidal que podrían estar funcionando para anclar al citoesqueleto subpelicular de microtúbulos (Nichols & Chiappino 1987).

Citoesqueleto

Toxoplasma posee una red de 22 microtúbulos subpeliculares organizados desde el extremo apical y a partir del anillo polar anterior que se extienden helicoidalmente en sentido contrario a las manecillas del reloj a lo largo de dos terceras partes de la longitud del parásito hacia el extremo posterior (Nichols & Chiappino 1987). Estos microtúbulos determinan la forma de media luna del parásito y su disposición en forma de espiral determina la naturaleza de su movilidad para el desplazamiento y la invasión celular. Asociado a los microtúbulos subpeliculares existe una red subpelicular rica en actina constituida por múltiples filamentos longitudinales entrecruzados, esta red se asocia por un lado con el complejo membranal interno y por otro a los 22 microtúbulos subpeliculares (Patrón S et al. 2005).

Organelos secretores

Toxoplasma gondii posee 3 tipos de organelos secretores denominados micronemos, roptrías y gránulos densos, los cuales pueden variar en cantidad a lo largo del ciclo de vida del parásito, estos organelos secretan una variedad de proteínas que participan durante la invasión celular y la replicación intracelular (Shaw et al. 1998).

Micronemos

Son pequeños organelos vesiculares con forma ovoide de 30 nm de diámetro ubicados predominantemente en el extremo apical, contienen un conjunto de proteínas adhesivas conocidas como proteínas MIC de las cuales han sido identificadas al menos 11. Las proteínas MIC son secretadas durante la invasión facilitando la adhesión del parásito con la célula hospedero así como el deslizamiento sobre la misma. Su secreción depende de incrementos de calcio intracelular y puede ser inducida *in vitro* y en ausencia de células hospedero utilizando ionóforos para calcio como la ionomicina (Carruthers & Sibley 1999). Dentro de las proteínas MIC se incluyen proteínas solubles y transmembranales que expresan diferentes dominios de

adhesión, generalmente estas proteínas funcionan en complejos, los cuales consisten de una proteína transmembranal y una o más proteínas no ancladas en las cuales por lo menos una proteína contiene un propéptido escindible (Meissner et al. 2002). Las proteínas MIC1, MIC3 y MIC4 poseen dominios extracelulares adhesivos carentes de un dominio transmembranal que aparentemente se unen a moléculas aún no identificadas de la membrana de la célula hospedera (Fourmaux et al. 1996; Cérède et al. 2002). La eliminación de MIC1 reduce considerablemente la invasión activa de *Toxoplasma* en fibroblastos, sugiriendo que es necesaria esta proteína para dicho proceso (Cérède et al. 2002). MIC2 es movilizada desde los micronemos para ocupar la superficie apical del parásito al momento de la invasión celular para posteriormente re-localizarse en el extremo posterior del parásito al momento de la interiorización de la célula hospedero, esta proteína puede ser recuperada en sobrenadantes de taquizoítos expuestos a ionóforos, sugiriendo su liberación del parásito (Carruthers & Sibley 1999). Algunas proteínas MIC como la MIC 6 y MIC8 se expresan en taquizoítos, mientras que los genes de MIC7 y MIC 9 son expresados predominantemente en bradizoítos (Meissner et al, 2002).

Roptrías

Son organelos en forma de sacos alargados ubicados en el extremo apical. Morfológicamente están divididos en dos compartimentos sub organelares distintos, la parte bulbosa en la parte mas posterior y un conducto más fino insertado en el interior del conoide y a través del cual las proteínas son secretadas. El extremo anterior de las roptrías se caracteriza por ser electrodensito visto en un microscopio electrónico mientras que en la región posterior de las mismas hay una serie de componentes membranosos empaçados en forma vesicular (Dubremetz 2007) (Shaw et al. 1998). El contenido de las roptrías es secretado durante la invasión, alterando la integridad de la membrana de la célula hospedera, facilitando la penetración del parásito (Nichols BA 1981). Una de las

proteínas más estudiadas es la ROP1 la cual es una proteína soluble que es secretada y se detecta en la zona de penetración, sugiriendo un papel temprano en el proceso de invasión (Saffer et al. 1992).

Gránulos densos

Son organelos esferoidales electrodensos de aproximadamente 200 nm de diámetro rodeados por una membrana única, se encuentran ubicados por todo el cuerpo del parásito, aunque mayoritariamente en la porción media posterior. Las proteínas provenientes de estos gránulos reciben el nombre de proteínas GRA, de las cuales hasta el momento se han identificado al menos 23 (Zhu et al. 2017). Se ha descrito que a los 10 min post-invasión se presenta la secreción de vesículas multilamelares desde el extremo posterior de parásitos intracelulares aparentemente provenientes de gránulos densos (Sibley et al. 1995). Las proteínas GRA 1, 2, 4 y 6 son secretadas en el espacio intravacuolar dando origen a la red vesículo-tubular, la cual se extiende desde la membrana del parásito hasta la VP llenando el lumen intravacuolar (Sibley et al. 1985). Mientras que las proteínas GRA 3, 5, 7 y 8 son proteínas que constituyen parte de la membrana de la VP confiriéndole cierta protección contra la acidificación y fusión lisosomal, de tal manera que los parásitos no son degradados por los mecanismos de defensa de la célula hospedera (Sibley et al. 1985).

Citoesqueleto

Microtúbulos

Toxoplasma tiene tres poblaciones de microtúbulos, los microtúbulos subpeliculares, dos microtúbulos cortos intraconoidales y los microtúbulos del huso mitótico necesarios para la replicación. Los 22 microtúbulos subpeliculares se extienden helicoidalmente desde el anillo polar apical que sirve como su centro

organizador hasta tres cuartas partes (aproximadamente 5 micras) de la longitud completa del parásito. El extremo más alejado al anillo polar apical es el extremo + y no parecen estar bloqueados por alguna proteína cap que limite su crecimiento. Los microtúbulos subpeliculares le confieren a *Toxoplasma* su forma típica, el sentido del movimiento y la polaridad apical.

Los 22 microtúbulos subpeliculares se encuentran estrechamente asociados a la cara interna del complejo membranal interno por medio de partículas intramembranales (pim) las cuales fueron observadas dentro del CMI formando líneas longitudinales sencillas o dobles por criofractura en 1978 por Dubremetz y por medio de análisis de Fourier, Morrissette en 1997 demostró que las líneas dobles se formaban cada 32 nm y coincidían con los microtúbulos subpeliculares (Figura 4) actuando como proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). La composición bioquímica de estas partículas se desconoce.

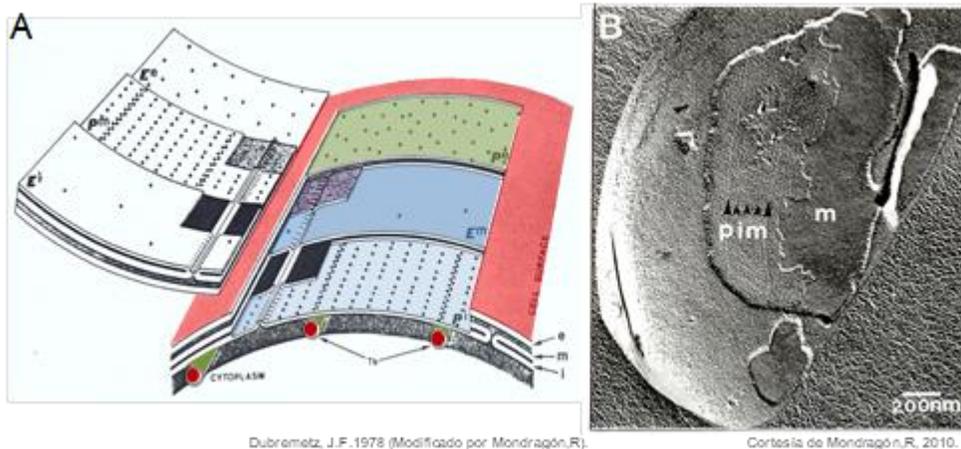


Figura 4. Películo de *Toxoplasma gondii*. A. Diagrama del películo que incluye a la membrana plasmática, el complejo membranal interno y las partículas intramembranales a las cual se asocian los 22 microtúbulos subpeliculares. B. Micrografía de criofractura mostrando las partículas intramembranales formando líneas dobles o sencillas (Mondragón, 2010).

Los microtúbulos intraconoidales aparentemente sirven para orientar la disposición del cuello de las roptrías al interior del conoide a fin de facilitar una secreción unidireccional durante la invasión (Figura 5) (Nichols & Chiappino 1987).

Conoide

El conoide es un organelo contráctil altamente móvil en forma de cono hueco truncado de 280 nm de longitud y 380 nm de diámetro, que está constituido por subunidades de α -tubulina localizado en el extremo apical del parásito, las subunidades de α -tubulina se encuentran organizadas longitudinalmente y con una orientación helicoidal (Figura 6) (Nichols & Chiappino 1987; Hu et al. 2006). En condiciones de reposo el conoide se encuentra introducido en el citoplasma, sin embargo es protruido o elongado durante la invasión sobre la membrana de la célula hospedera (Nichols & Chiappino 1987).

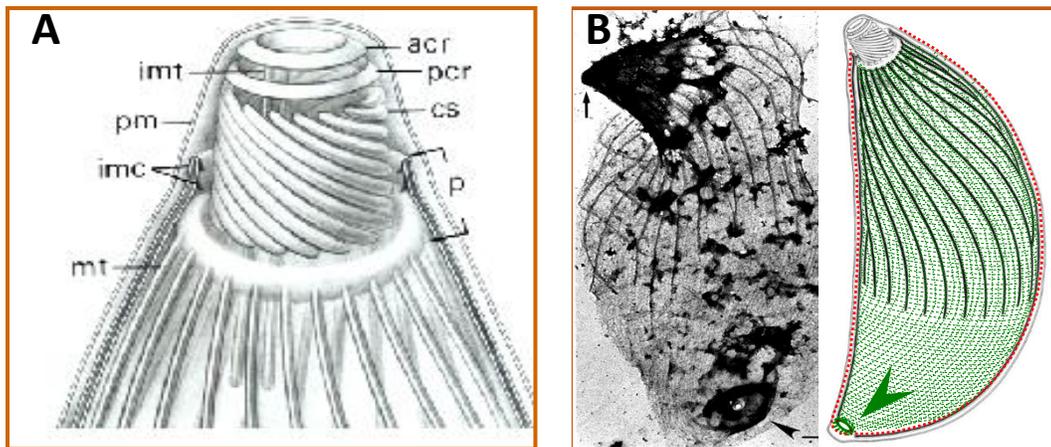


Figura 5. Diagramas de la organización de los microtúbulos. A: componentes del conoide. Acr, anillo anterior preconoidal; pcr, anillo posterior preconoidal; imt, microtúbulos intraconoidales; pm, membrana citoplásmica; imc, complejo membranar interno; mt, microtúbulos; cs, subunidades del conoide; p, B) Corresponde a la distribución de los microtúbulos subpeliculares con arreglo helicoidal. En el panel izquierdo la flecha señala el conoide, la cabeza de flecha señala el anillo polar posterior, en el panel derecho se hace una representación esquemática del citoesqueleto subpelicular donde la flecha indica el anillo polar posterior (Tomado de Morrissette & Sibley 2002)

Dentro del conoide hay 2 microtúbulos cortos asociados a la cara interna del conoide, los cuales se encuentran fuertemente unidos uno al otro, se ha descrito además la presencia de dos anillos ubicados por encima del conoide llamados anillos preconoidales, el anillo anterior de 215 nm de y el posterior de 260 nm de naturaleza desconocida (Nichols & Chiappino 1987).

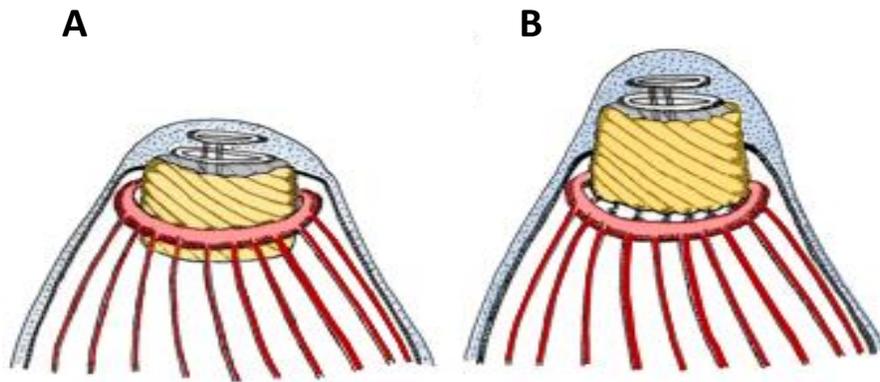


Figura 6. Estructura del conoide. Inserto A: el conoide en estado de reposo ubicado parcialmente dentro del anillo polar; Inserto B: en estado activado el conoide es protruido a manera de estilete (Nichols & Chiappino 1987)

Extrusión del conoide y su regulación en *Toxoplasma gondii*

La extrusión del conoide es un evento clave en el desarrollo de la invasión activa, y consiste en la proyección del conoide sobre la membrana de la célula hospedera, presionando y desestabilizando la membrana celular. La importancia de la extrusión del conoide no sólo radica en presionar la membrana sino también en servir de guía y medio para poder vaciar los componentes de las roptrías sobre la

membrana celular, lo cual trae como consecuencia una invasión celular exitosa. Los procesos implicados en la regulación de la extrusión del conoide solo se han estudiado parcialmente debido a la falta de inductores fisiológicos. Se ha reportado que mediante el uso de ionóforos para calcio se puede inducir la extrusión del conoide, siendo el aumento de calcio citoplásmico desde los reservorios intracelulares, el inductor del proceso, y que puede ser inhibido por la preincubación de los parásitos con el quelante de calcio intracelular, BAPTA-AM (Mondragon & Frixione 1996; Monteiro et al. 2001; Song et al. 2004). No obstante el uso de ionóforos para inducir la salida de calcio provoca una acumulación masiva de este catión en el citoplasma de los parásitos ocasionando el bloqueo de cualquier actividad dinámica y la muerte de los taquizoítos (Mondragon & Frixione 1996; Monteiro et al. 2001; Arrizabalaga & Boothroyd 2004). Adicionalmente se reportó que utilizando etanol, también se puede inducir la extrusión del conoide como un proceso reversible y que no afecta la viabilidad y capacidad invasiva de los taquizoítos (Del Carmen et al. 2009). Utilizando el etanol como inductor de la extrusión del conoide, se han caracterizado las señales de transducción que pudieran estar involucradas. Mediante el uso de quelantes de calcio intracelular (BAPTA-AM) y extracelular (EGTA) y estimulando a los parásitos con etanol 0.5 M se observó que el proceso dependía de calcio intracelular pero no del extracelular. La liberación de calcio intracelular en *Toxoplasma gondii* se puede dar por la unión de IP₃ (que se da por la escisión de PIP₂ por la PLC) a su receptor, IP₃R, ya que se observó que utilizando inhibidores para esta vía como U73122 (inhibidor de PLC) y xestonpongina D (inhibidor de IP₃R) había una clara disminución en el proceso de extrusión del conoide. Adicionalmente, se evaluó la posible participación de proteínas cinasas en este proceso dinámico. Se usaron inhibidores como: 1) Estaurosporina, inhibidor de cinasas de serina-treonina, e 2) Inhibidores específicos para PKC como Calfofostina C, BIM I y Gö6983. Los resultados demostraron que había la participación de una cinasa tipo PKC en el proceso de regulación de extrusión del conoide (Figura 7) (Del Carmen et al. 2009).

Se sabe que la participación de los componentes del citoesqueleto es muy importante en los procesos de motilidad, particularmente se ha observado que el sistema actina-miosina cumple un papel indispensable durante el proceso de invasión celular, ya que la generación de mutantes para ambas proteínas provoca tasas de invasión retardadas y menores respecto a las cepas silvestres (Egarter et al. 2014). Evaluando el papel de estos componentes del citoesqueleto en la extrusión del conoide, se observó que particularmente había la participación de actina y moléculas de miosina en este proceso dinámico, ya que al utilizar Citocalasina D (que despolimeriza filamentos de actina) y Butanedione Monoxime (que inhibe a la ATPasa de la cadena ligera de la miosina) este proceso se vio bloqueado. Sin embargo, drogas que despolimerizan los microtúbulos (Colchicina y Nocodazol) no tuvieron efecto en la extrusión del conoide inducida por etanol (Del Carmen et al. 2009).

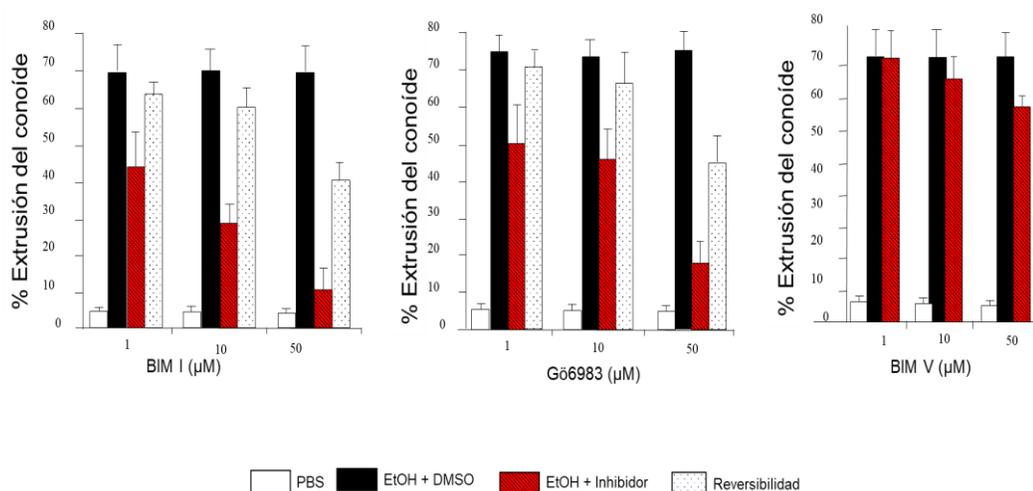


Figura 7. Participación de PKC en la extrusión del conoide inducida por etanol. Taquizoítos aislados fueron incubados por 30 min a 37°C con drogas inhibitoras de PKC, y posteriormente expuestos a etanol 0.5 M para activar la extrusión del conoide. Como controles se utilizaron taquizoítos mantenidos en PBS o activados con 0.5 M de etanol sin inhibidor. Para experimentos de reversibilidad, los taquizoítos tratados con inhibidores se lavaron con PBS y se expusieron a etanol 0.5 M. Gráfica A) ensayos con BIM I. B) Gö6983. C) BIM V análogo inactivo de BIM I. Los porcentajes de conoides

extruidos y SD fueron determinados en 3 experimentos independientes (Del Carmen et al. 2009).

Con base en estos resultados se sugirió la existencia de una proteína cinasa tipo PKC en *Toxoplasma gondii* involucrada en el proceso de extrusión del conoide; sin embargo, a la fecha no existen reportes de la presencia de este tipo de enzimas en el parásito, ni tampoco hay datos en el genoma del parásito que así lo indiquen; no obstante, se ha encontrado que *T. gondii* posee un receptor para la cinasa C activa (RACK1) que se localiza en el citoplasma del parásito y núcleo (Moran et al. 2007). Y por otro lado, se determinó una afectación del proceso de exteriorización cuando los parásitos eran expuestos a wortmanina y estaurosporina, sugiriendo la existencia de una probable proteína PKC (Caldas et al. 2013).

Cinasas en Toxoplasma gondii

La fosforilación de proteínas es un tipo de modificación reversible que es realizada por proteínas cinasas, siendo las fosfatasa las moléculas que regulan dichas fosforilaciones, las cinasas y fosfatasa regulan cada aspecto de la vida celular. Las cinasas son una superfamilia que están incluidas en ocho familias; AGC, CAMK, CK1, CMGC, RGC, STE, TK y TLK (Miranda-Saavedra et al. 2012). De las cuales están presentes en *Toxoplasma gondii* las AGC, CAMK, CK1 y las CMGC, adicionalmente encontramos las cinasas de las roptrías ROPK (Wei et al. 2013).

AGC cinasas

Su nombre es debido a que en este grupo están incluidas la PKA, PKG y PKC. La PKG descrita en *Toxoplasma gondii* está implicada en la regulación de la interacción parásito-hospedero ya que regula la secreción de los micronemos, motilidad, adhesión e invasión (Figura 8). La TgPKG, incluyendo las isoformas I y II, son codificadas por un solo gen. Mientras que la isoforma II es citosólica, la isoforma I se localiza primariamente en la membrana plasmática del parásito

(Wei et al. 2013). La actividad de TgPKG residen en sus tres sitios de unión a cGMP, especialmente el tercer sitio, el cual es diferente en las PKG de vertebrados e insectos. El inhibidor específico “pyrrole 4-[2-(4-fluorophenyl)-5-(1-methylpiperidine-4-yl)-1H-pyrrol-3-yl] pyridine (compound 1)” de PKG ha mostrado actividad cistostática en contra de *T. gondii in vitro* y puede proteger a ratones contra *T. gondii* pero no puede matar completamente al parásito (Wei et al. 2013).

Otra cinasa perteneciente a la familia de las AGC es la PKA, esta cinasa regula la expresión génica, apoptosis celular, diferenciación y proliferación en todos los eucariotes (Taylor et al. 1988). La PKA de *T. gondii* está implicada en la replicación de taquizoítos, esta enzima contiene dos subunidades catalíticas (TgPKA-C) y dos subunidades regulatorias (TgPKA_R). El inhibidor competitivo H89 tiene un efecto inhibitorio sobre la TgPKA-C y puede inhibir el crecimiento de los taquizoítos *in vitro* (Kurokawa et al. 2011).

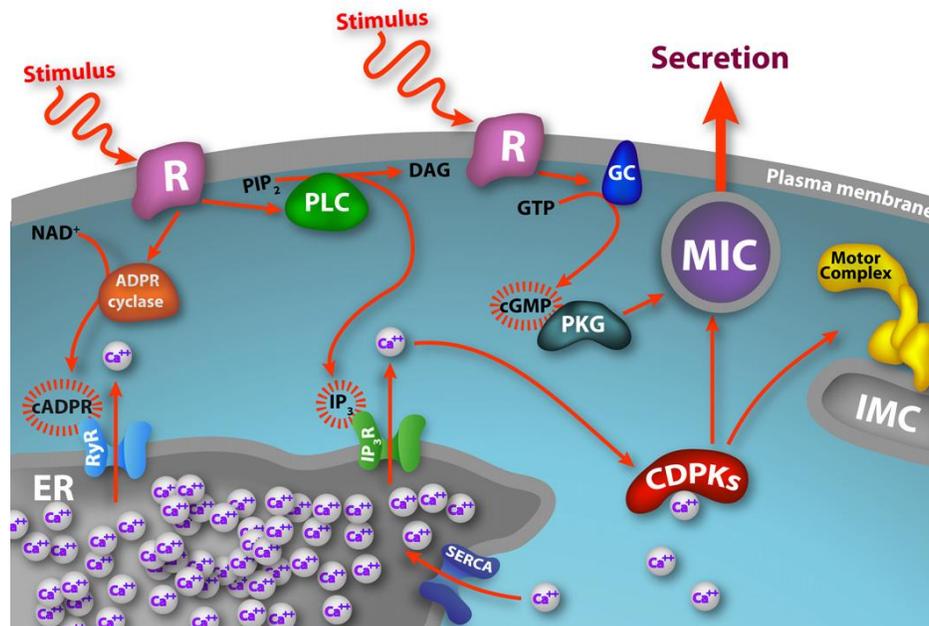


Figura 8. La secreción en *T. gondii* es controlada por cinasas. El almacén principal de calcio en *T. gondii* es el retículo endoplasmático (ER), que se rellena con la acción de una ATPasa Ca^{2+} llamada SERCA. La estimulación de los receptores no identificados (R) en la membrana plasmática genera trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidil inositol bisfosfato (PIP_2) a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC). La señalización, a través de un receptor único o común, también da como resultado la activación de ADP ribosa ciclasa (ADPR) para producir cADPR. La evidencia farmacológica y bioquímica apoya la existencia de canales de liberación de calcio que responden a cADPR (receptores de rianodina (RyR) y a través de receptores IP_3 (IP_3R). El calcio liberado activa las proteínas quinasas dependientes del calcio tales como TgCDPK1, que ha sido implicada en la secreción de micronemos (MIC) en *T. gondii*. Independientemente, la activación de guanilil ciclasa para generar GMP cíclico (GMPc) es importante para activar la PKG que también controla la secreción de micronemos. Otros estudios en *P. falciparum* indican que CDPKs pueden actuar en el complejo motor de la miosina, que está anclado en el complejo de membrana interna (IMC) (Billker et al. 2009).

Casein cinasa I

Casein cinasa I (CK1) es una familia conservada de cinasas serina/treonina responsable de la reparación de DNA, tráfico vesicular, citocinesis y ciclo celular en organismos eucariontes (Wei et al. 2013). Por cromatografía de afinidad utilizando el inhibidor específico de cinasa dependiente de ciclina (CDK); purvanol B, se determinó que se unió con más afinidad a CK1 que a CDK, sin

embargo siguiendo la misma metodología pero utilizando extracto de tejido de vertebrado se identificó CDK pero no CK1, este resultado diferencial sugiere que existe suficiente diversidad estructural entre cinasas, lo que sugiere que el purbanol B es un antiparasitario potencial (Knockaert et al. 2000).

Familia de las CMCG (cinasas dependientes de ciclina)

Las cinasas dependientes de ciclina es un grupo conservado de cinasas que regulan el ciclo celular en eucariontes. Se ha encontrado un homólogo de CDK en *T. gondii*; la TPK2, la cual es una cinasa capaz de unirse al ciclinas de mamífero A, B1, D3 y E, y fosforilar la histona H1. La sobreexpresión de una dominante negativa de TPK2 inhibe la replicación del taquizoíto, cuando la sobreexpresión de TPK2 no afecta este parámetro, tampoco bloquea de ciclo celular, sugiriendo que los checkpoints de las células eucariotas difieren de *T. gondii* (Khan et al. 2002).

Familia de las CDPK (cinasas dependientes de calcio)

La concentración de calcio intracelular es importante para la invasión, secreción y diferenciación, dichos procesos son controlados por una familia cinasas dependientes de calcio encontrados en plantas, ciliados y algas verdes (Harper & Harmon 2005). La concentración de calcio citosólico en *T. gondii* se mantiene baja durante condiciones de reposo al igual que en una célula eucarionte típica. Los sitios de almacenamiento de calcio incluyen al retículo endoplasmático (ER), mitocondria y acidocalisoma (Moreno & Docampo 2003). El depósito primario de calcio es el ER y el calcio intracelular es una señal que dispara un número importante de eventos. Los apicomplexas contienen la ATPasa de retículo SERCA que bombea calcio hacia el lumen del RE. La bomba SERCA de *T. gondii* ha mostrado ser sensible a los compuestos tapsigargina y artemisina. El calcio citoplasmático en *T. gondii* controla la secreción de micronemas como se ha

mostrado con agentes farmacológicos como ionóforos, la quelación de calcio intracelular con BABTA-AM que previene la secreción de los micronemos, también afecta la motilidad y la invasión (Del Carmen et al. 2009)(Carruthers & Sibley 1999). En cuanto a las cinasas dependientes de calcio en *Toxoplasma gondii*, muchos miembros de CDPK se han detectado en *T. gondii*, la cinasa dependiente de calcio I de *T. gondii* TgCDPK1 se expresa en taquizoítos. TgCDPK1 puede ser inhibida con el fármaco KT5926, un inhibidor de CDPKs en otros sistemas, el cual puede afectar la adhesión del parásito hacia la célula hospedera, lo que sugiere que la TgCDPK1 participa en la regulación de la motilidad y la invasión (Donald et al. 2006).

LA TgCDPK2 es solo un transcrito en el mRNA en taquizoítos, pero no se ha encontrado la proteína correspondiente (Kieschnick et al. 2001). La isoforma 3 esta expresada en taquizoítos y está implicada en la invasión, fosforila la aldolasa 1 (TgALD1) de manera dependiente de concentración de Ca^{2+} y transloca desde el citosol a la periferia del espacio extracelular (Sugi et al. 2009).

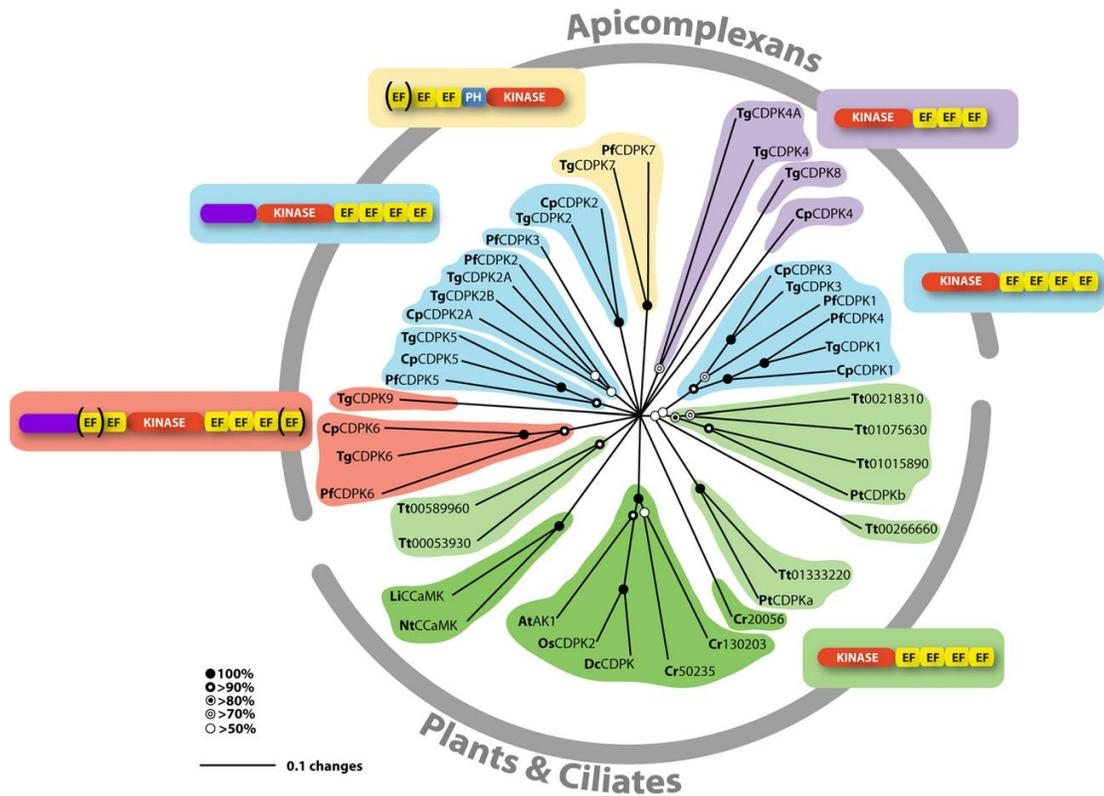


Figura 9: Análisis filogenético de las cinasas dependientes de calcio en Apicomplexans y plantas. Comparación de las cinasas dependientes de calcio en plantas (verdes), ciliados (verde claro) y apicomplexans. La arquitectura del dominio canónico está representada por CDPK de plantas que consisten en un dominio de cinasa N-terminal seguido por cuatro dominios de mano EF (EF). Dos grupos de CDPKs de apicomplexans se ajustan a este perfil canónico (azul). Un grupo tiene regiones N-terminales relativamente cortas (lado derecho), mientras que la mayoría de los miembros del otro tienen un extremo N terminado que no es homólogo a otros dominios conocidos (lado izquierdo). Se muestran estructuras de dominio alternativas para otros CDPKs de apicomplexans, incluyendo un grupo con solamente tres dominios de mano EF de C-terminal (púrpura), un grupo con dos o tres dominios de mano EF N-terminal seguidos de homología de plekstrina (PH) y dominios de quinasa (Amarillo), un grupo con uno o más dominios de la mano EF N-terminal, un dominio quinasa y tres o cuatro dominios mano EF C-terminal (rojo). Se muestran modelos representativos; () Indica un número variable de dominios. Los nombres de los genes se basan en nombres publicados previamente o se basan en agrupaciones ortólogas definidas aquí. Árbol filogenético dibujado usando una matriz de distancia basada en la comparación de los dominios de quinasa utilizando Neighbor joining, algoritmo de BioNJ en PAUP* (Swofford, 1991); Valores de bootstrap mostrados en círculos rellenos (n = 100). Taxa: Tg, *T. gondii*; Pf, *P. falciparum*; Cp, *C. parvum*; Tt, *Tetrahymena thermophila*; At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Dc, *Daucus carota*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Pt, *Paramecium tetraurelia*; Li, *Lilium longiflorum*; Nt, *Nicotiana tabacum*.

ROP cinasas

Las roptrías son organelos secretores en *T. gondii*. Las proteínas del cuello de las roptrías contribuyen a la formación del complejo de la unión móvil, una oposición transitoria entre la membrana del parásito y la del hospedero, la cual ubica al parásito dentro de la VP en desarrollo. La VP se deriva de la membrana del hospedero y de los componentes de la roptría, la cual constituye una interface esencial entre el parásito y el hospedero (Wei et al. 2013).

Las proteínas de las roptrías (ROP) son secretadas por el parásito en la célula hospedero y algunas de ellas son cinsas. Entre estas cinsas, muchos miembros pertenecen a la familia ROP2-like (ROP2s). Algunas ROP2 se dirigen al núcleo de la célula (ROP16) mientras que la mayoría de las demás se asocian con el PV. La familia similar a ROP2 contiene al menos 12 miembros que comparten una región C-terminal común relacionada con protein cinsas, y que posee una señal peptídica, que es una prosequencia escindida durante la formación de las roptrías para dejar una cola N-terminal antes de su plegamiento. El conjunto completo de residuos catalíticos necesarios para la fosforilación dependiente de ATP se conserva en algunas ROP2 (como ROP11, 16, 17 y 18), pero no en otras (ROP2, 4, 5, 7 y 8). Esto denota diferentes funciones y modos de acción de cada ROP2 (Wei et al. 2013).

La ROP2 participa en la formación de PV, y se localiza en la PV con su N-terminal expuesto al citoplasma de la célula hospedero y sirven como el enlace molecular entre las mitocondrias y la PV. El N-terminal incluye una señal de direccionamiento mitocondrial, y la delección de la secuencia conduce a la localización de la proteína truncada en el ER (Sinai & Joiner 2001).

ROP4 es un miembro nuevo de la familia de las proteínas ROP2 y contiene un dominio cinasa serina/treonina predicho en el extremo C-term, pero no tiene el

ácido aspártico conservado en bucle catalítico crítico para la actividad de fosfotransferasa (Hanks & Hunter 1995).

ROP5 es otra proteína de secreción de la familia ROP2 que se secreta durante la invasión. Los rasgos característicos de la familia ROP2, tales como la localización, el tamaño de la proteína y la homología de la quinasa, también corresponden a la ROP5. Sin embargo, la ROP5 no experimenta el procesamiento proteolítico post-Golgi, y expone su extremo C- terminal hacia el citoplasma de la célula hospedero, con una topología inversa de ROP2 y ROP4, estos hallazgos no han sido claramente explicados (El Hajj et al. 2007).

ROP16 es un factor de virulencia clave de *T. gondii* y regulador de la transcripción de la célula hospedero. La eliminación de ROP16 en la cepa de tipo I puede convertir el parásito en fenotipo tipo II, mientras que la complementación de parásitos ROP16-knockout con ROP16 de tipo I puede rescatar completamente el fenotipo (Butcher et al. 2011). ROP16 se puede unir con STAT3, y fosforilarlo directamente, y también inhibir la señalización de citocinas proinflamatorias en los macrófagos (Denkers et al., 2012). Una sola sustitución de aminoácidos en el dominio cinasa de ROP16 afecta la diferenciación de la cepa en términos de activación de STAT3 (Yamamoto et al. 2009). ROP16 también tiene actividad intrínseca de cinasa de tirosina y puede fosforilar directamente el residuo tirosina clave de STAT6, mediante el cual puede inducir una activación extremadamente rápida y sostenida de STAT6 (Ong et al. 2010).

ROP18 se considera un factor clave de virulencia en *T. gondii*, que se secreta en el citoplasma de la célula hospedero durante la infección y se localiza en VP (Fentress et al., 2012). La proteína recombinante tiene actividad de cinasa y puede fosforilar sustratos de taquizoítos. La sobreexpresión de ROP18 aumenta la replicación del parásito, pero este efecto se limita a la vacuola que contiene estos parásitos (El Hajj et al., 2007a). ROP18 puede regular a la baja la respuesta inmune adaptativa del tipo I mediadas por células T CD8, mediante la degradación del factor de transcripción localizador de retículo endoplásmico ATF6 β , así como los

IRG fosforilados, mediante los cuales la infección por *T. gondii* inactiva las respuestas inmunes innatas y adaptativas del hospedero (Fentress y Sibley 2011, Yamamoto y otros 2009, 2011, Yamamoto y Takeda 2012).

Con base en lo anterior Sánchez Barajas en su tesis de maestría se dio a la tarea de buscar una cinasa tipo PKC en el genoma de *T. gondii*. Utilizando la plataforma de NCBI alineó la secuencia de PKC alfa humana en el genoma de *T. gondii* (los resultados no mostraron una PKC pero sí una cinasa perteneciente a la familia AGC con una longitud de 951 aminoácidos (familia a la cual pertenece la PKC) y con el 44% de identidad, en la figura 10 se muestra la secuencia de esta proteína, en color rojo se resalta el dominio cinasa conservado.

```

MLPRGGRGVSSRWEQAGTFRGESAVFCRARADEHPDFTLYDAQCGYAEAPGYRVNPFCCRE
MYASPRDTSENSLFSVAPVELNDQAREDLASEQALLQMIRSQGNETYSPVDSHSPYLPL
RTSGPAGVPDQRIACGGSSREEPPFGSLGAPVSCRDFHFPSSARATNNSGGLPLSPASGAL
RSPFRLDAASSRGSVPARPPAAGTSRSLGVERGCAGLVSDAERVEFYFPGRDSELEKS
EAFVSFEETDCERLGLGAPPPREHCGDTRRGDFSPREKREAAGEEGSDEASWARTSPSEKW
TDSFSMTRRPGGTHAQEAGDRFRGEAPAHFNVSWTRGPESEMRRGVATPETVEFWRRGAP
TLRGLPLGDHQKAREKRCRCRFRGGSEARPARSGVSWATQGKTERPAFDDEEGPSAESGTG
NEQDGEAREDDLVYLQNMASVATRMALFRNKRLSPEDFQLLRVIGKGSYGKVMLVQFHQ
DGGVYAMKMLRKEAVVRRNQVEHTRTERDVLAWVSHFFIVQMHYAFQTRKKLYFVLEYCP
GGELFFHLSRAGRKEYAACFYAAEVLLALEHLHKYNVVYRDLKPENVLLEHGHVRLTD
FGLSKEGVEDNCSARSLCGTPEYLAPEILSQQGHGKAVDWWSLGALIYEMLTGLPPFFYTG
DRERLFENIRSSSELQYPSYMSRAAVHLLRGLFQRDPNRRLLGGGPGDAEEIKRHFFFGRID
WEALQAKRMRPFRPRLQSPDQYFDNEFVKLPVINSEVQESPIGVAAGEPEATPPRAFW
PSGAGADFGAEACVQPPDVRAASPSPASSLTPAAPPSLPGAAASEPGAGAANDEACAASG
DPRRVPERGTFFPAGAVGCERFQGSPEVSAMWPSGELQKFFAANGARVEEAKTEPLRFGD
QYPPGAYGQGVHFNMLAPPDDESDDSMFEGFTYDERDTSALGEEAAAAMSW

```

Figura 10. Secuencia de aminoácidos de la AGC cinasa. En color rojo se muestra el dominio cinasa conservado y en color azul es la secuencia de los péptidos que se mandaron a sintetizar para inmunizar los ratones.

Posteriormente con base en su accesibilidad y antigenicidad, se eligieron dos péptidos que no estuvieran en el dominio cinasa conservado con la finalidad de que fueran específicos de la AGC cinasa, con el método de Emini Surface Accessibility prediction se obtuvo un péptido de 14 aa: TRRGDFSPREKREA y con el método de Kolaskar y Tongaonkar Antigenicity se obtuvo un péptido de 18 aa: AEACVQPPDVRAASPSPA, la posición de los péptidos se muestra en azul en la figura 10. Posteriormente se inmunizaron ratones con ayuda del

adyuvante Titer Max Gold, después de 38 días se hizo la fusión de los linfocitos B con las células Ag8. Una vez obtenido el anticuerpo monoclonal, se caracterizaron las propiedades del anticuerpo encontrando que su isotipo es IgG3, se evaluó su reactividad mediante inmunofluorescencia y Western blot, en inmunofluorescencia se encontró marca en la zona del conoide y si se permeabiliza un poco más también se marca la zona perinuclear (Figura 12) manteniéndose la marca del conoide, en cuanto al Western blot se evaluó su reactividad usando extracto de cerebro de rata y fracciones de extracto total, citoesqueleto y fracción soluble (sobrenadante) encontrándose un reconocimiento específico en las fracciones de *Toxoplasma* de una banda correspondiente al PM de 80 kDa y otra banda en el PM de 50 kDa. La de 80 kDa se conservó en la fracción de citoesqueleto y la de 50 kDa se encontró en la fracción soluble (sobrenadante). La banda de 80 podría corresponder a la que se encuentra a la parte conoidal y la de 50 a la de la parte perinuclear (Figura 11) (Sánchez Barajas 2012).

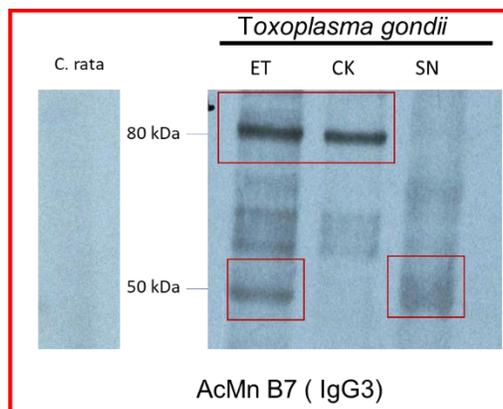


Figura 11. Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal. Se analizó tres fracciones; extracto total, citoesqueleto y sobrenadante, como control se utilizó cerebro de rata que expresa todas las isoformas de PKC. ET; extracto total, CK; citoesqueleto, SN; sobrenadante.

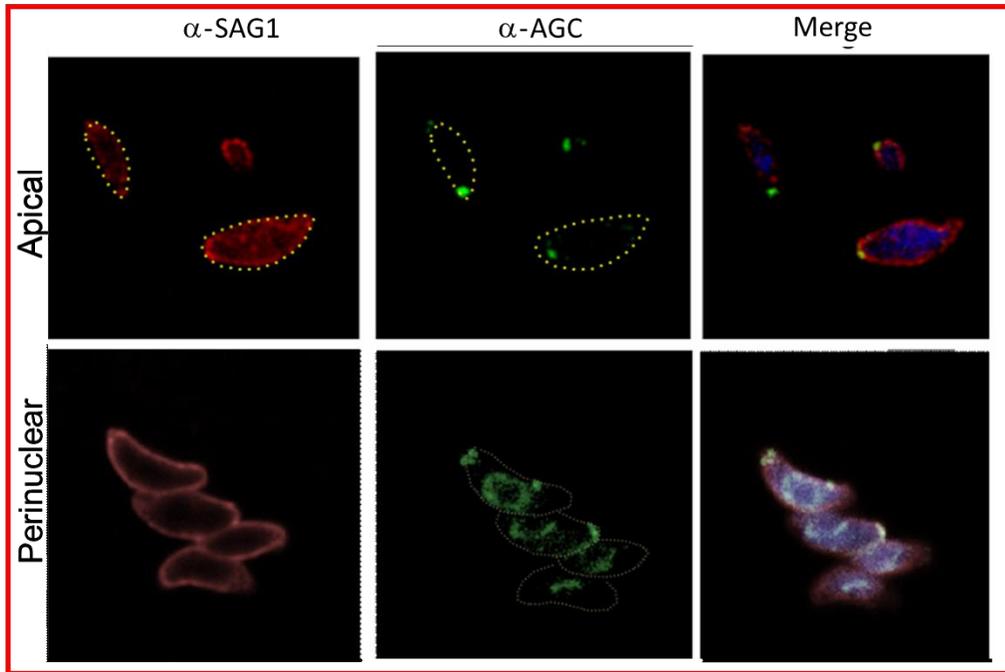


Figura 12. Distribución conoidal y perinuclear de AGC. Se fijaron y permeabilizaron taquizoítos durante 2 min para ver la zona del conoide y 7 min de para acceder a la zona perinuclear, se utilizó como anticuerpos primarios α -SAG (proteína de la membrana plasmática) y el anticuerpo monoclonal α -AGC cinasa.

A la fecha se desconoce la identidad precisa de la cinasa apical y su papel en el proceso molecular de regulación de la extrusión del conoide y su participación en otros procesos biológicos del parásito.

Hipótesis

En *Toxoplasma gondii* existe una cinasa apical tipo PKC, que por su ubicación posiblemente está involucrada en el proceso de extrusión del conoide. Su purificación por cromatografía de afinidad y su identificación por espectrometría de masas revelará su identidad, por lo cual sabremos su papel en la vía que regula la extrusión del conoide.

Justificación

Estudios previos en nuestro laboratorio han sugerido la presencia de una cinasa con ubicación apical que está posiblemente involucrada en la regulación de la extrusión del conoide y por lo tanto en la invasión. A la fecha no se ha reportado una cinasa con ubicación definida (apical) que esté involucrada en la regulación de la extrusión del conoide. Debido a la importancia que tiene la extrusión del conoide en el proceso de internalización del parásito a la célula hospedero, es de gran relevancia caracterizar en detalle los eventos celulares y moleculares que ocurren en esta etapa de la invasión.

La identificación molecular de la cinasa y de las proteínas con las cuales pudiera interactuar, permitirá la caracterización de los mecanismos que participan en la regulación de este evento dinámico y abre la posibilidad para el diseño futuro de estrategias farmacológicas dirigidas a inhibir a dicha tipo de cinasas a fin de bloquear el proceso de invasión.

Objetivo general:

Aislar, identificar y caracterizar a la cinasa apical de *Toxoplasma gondii* involucrada en la extrusión del conoide.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar la propiedad estructural (dominios y sitios de fosforilación) de la cinasa, los posibles substratos de fosforilación y las posibles vías de activación río arriba y río abajo mediante herramientas bioinformáticas.
2. Expandir el hibridoma y purificar el anticuerpo monoclonal contra la cinasa de *Toxoplasma gondii* mediante cromatografía de afinidad.
3. Preparar una columna de afinidad con el anticuerpo contra la cinasa apical
4. Purificar la cinasa apical
5. Identificar la cinasa apical mediante espectrometría de masas a partir de una fracción enriquecida de cinasa purificada mediante cromatografía de afinidad
6. Estudiar la presencia de complejos moleculares asociados a la cinasa apical mediante inmunoprecipitación y su identificación mediante espectrometría de masas.

Metodología

Animales.

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c para el mantenimiento de la cepa de *Toxoplasma*. Los ratones fueron mantenidos en la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN bajo condiciones reguladas de temperatura, humedad y aire y de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV con el protocolo número 190-16 aprobado por el UPEAL.

Obtención y mantenimiento de la cepa de *Toxoplasma gondii*

La cepa Rh de *T. gondii* se mantuvo mediante la inoculación intraperitoneal de 5×10^4 taquizoítos en ratones Balb/c. Después de 3 a 4 días, los parásitos fueron recuperados del exudado peritoneal e inmediatamente purificados mediante diversos ciclos de centrifugación (1700 rpm) con PBS seguidos por la filtración de la suspensión parasitaria a través de filtros de policarbonato de 5 μm de diámetro (Millipore, Bedford MA). Durante el manejo de taquizoítos se siguieron medidas de bioseguridad para el manejo de patógenos del tipo II (CDC. U.S. 2009), como son el uso de bata, guantes, cubreboca y en condiciones de esterilidad.

Obtención del extracto total

Para el extracto total, se tomaron los taquizoitos purificados y se solubilizaron en buffer de lisis que contenía 2% de β -mercaptoetanol, SDS 1%, EGTA 20 mM, TRIS-HCl 2 mM pH 7.5, y una mezcla de inhibidores de proteasas.

Obtención de la fracción de citoesqueleto

Los taquizoítos purificados se resuspendieron en 5 ml de PHEM- Tritón X-100 que contiene Hepes 100 mM, EGTA 10 mM, MgCl_2 1 mM, Tritón X-100 0.005%, e inhibidores de proteasas (TPCK, PMSF y TLCK todos de SIGMA). La mezcla fue incubada por 5 minutos y se centrifugaron a 45,000 rpm por 15 minutos a 4°C. El botón correspondiente a la fracción insoluble de citoesqueleto, fue resuspendido

con 1 ml de PHEM sin Tritón y centrifugado a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C, el exceso de PHEM fue retirado y el botón se resuspendió en buffer de lisis. Las proteínas del sobrenadante correspondientes a la fracción soluble se precipitaron por incubación volumen a volumen con isopropanol a -20°C. El precipitado se centrifugó a 4,500 rpm por 10 minutos a 4°C y el botón se resuspendió en buffer de lisis. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Se realizó una curva de calibración con albumina sérica bovina (BSA) en un rango de 50 µg/ml a 500 µg/ml. Para la determinación de proteínas se tomaron 10 µl de cada concentración estándar y de las diluciones correspondientes a la muestra problema y se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford 1:4 en placas de 96 pozos, se incubó por 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se graficó la curva de calibración y la obtención de la concentración de proteínas de la muestra se determinó mediante la ecuación de la recta.

Tinción con azul de Coomassie

Los geles de poliacrilamida se lavaron por 5 minutos con agua destilada y se tñeron con una solución de Azul de Coomassie al 13% disuelto en la mezcla de metanol al 50% y ácido acético al 10% durante toda la noche a 4°C y en agitación. El gel se destñó con una solución de metanol al 50% más ácido acético al 10% hasta observar las bandas.

Tinción de los geles de PAGE-SDS con nitrato de plata

Para su tinción, los geles se colocaron en recipientes de vidrio y se lavaron dos veces con 50 ml de agua destilada por 10 minutos en agitación. Se adicionó la solución fijadora (metanol al 40% y 50 µl de formaldehído al 37%) por 10 min en agitación, se lavó con agua destilada dos veces por 5 minutos y se le agregó la solución de tiosulfato de sodio (0.2 mg/ml) por 1 minuto en agitación. Se lavó con agua destilada dos veces por 20 segundos y posteriormente se incubó con una solución de nitrato de plata al 0.1 % por 10 minutos en agitación. Se le colocó la solución reveladora (carbonato de sodio al 3%, tiosulfato de sodio al 0.0004% y

50 µl de formaldehído al 37%) en agitación hasta que se observaran las bandas. Se detuvo la reacción con ácido cítrico 2.3 M en agitación durante 10 minutos.

Electroforesis

Las proteínas obtenidas de extractos totales, citoesqueletos y de taquizoítos de parásitos se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en geles de 0.75 mm de grosor. El gel de poliacrilamida al 10% conteniendo las proteínas se tiñó con azul de Coomassie R-250), teñido con nitrato de plata o bien transferido a membrana de nitrocelulosa para su análisis mediante Western Blot.

Western blot

La técnica de Western Blot para la detección de la cinasa se realizó como se reporta en (Gómez de León et al., 2014). Las proteínas de citoesqueleto, extracto total y la fracción soluble (sobrenadante) fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 70 min a 200 mA, se bloquearon con leche descremada al 6% disuelta en TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 75 mM pH 8.0 y Tween 20 al 0.1%) durante 2 horas a TA. Posteriormente, la membrana se incubó por toda la noche a 4 °C, las membranas se lavaron cinco veces con TBST 0.1% por 5 min cada lavado, y se incubó con el anticuerpo secundario. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón α -AGC en una dilución 1:100 en TBST 0.1%. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-ratón conjugado a HRP en una dilución 1:7,000 en TBST 0.1%. La detección de la reacción se realizó por quimioluminiscencia basada en la oxidación del luminol catalizado por HRP-peróxido de hidrogeno en condiciones alcalinas (ECL Western blot detection, GE Healthcare, UK). El papel con la inmunodetección se digitalizó utilizando un fotodocumentador (EZ Imager, BioRad, Hercules, CA, USA), mediante el programa Image™ Lab Software Versión 4.1 (BioRad, Hercules, CA, USA). El mismo programa nos proporcionó los pesos moleculares aproximados de cada banda de inmunodetección.

Inmunofluorescencia

La inmunodetección de la AGC cinasa se realizó en taquizoítos extracelulares en reposo y con el conoide extruído así como en las etapas de invasión y proliferación celular. Para taquizoítos extracelulares se prepararon cubreobjetos recubiertos con Poli-L-lisina 2 ug/ml por 30 minutos a temperatura ambiente y se dejaron secar bajo la luz. Se utilizaron 1×10^6 taquizoítos (en reposo y con el conoide extruido) y se extendieron por toda el área, se dejaron reposar por 20 min. La inducción de la extrusión del conoide se realizó llevando los taquizoítos a un volumen de 100 μ l e incubando con 100 μ l de etanol 1 M para que quedara 0.5 M por 30 segundos. Los intracelulares se analizaron durante la invasión de células HEp-2 a diferentes etapas, por 30 minutos que representa la etapa de invasión del parásito, por 2 horas cuando ya se encuentra internalizado y alojado en la vacuola parasitófora, por 6 horas que es el periodo aproximado donde el parásito se comienza a replicar, por 12 horas cuando está formado el racimo de parásitos, por 24 horas cuando se encuentra la roseta de parásitos y por 48 hrs cuando el espacio intravacuolar está saturado. Tanto las muestras de parásitos extracelulares como en las distintas etapas de invasión y proliferación celular fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS por 30 minutos y se lavaron 5 veces con PBS en agitación, posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS por 5 minutos para extracelulares y 15 minutos para intracelulares. Posteriormente, las células se bloquearon con suero fetal bovino al 1% en PBS por 30 minutos y se incubó el anticuerpo primario α -AGC a una dilución 1:50 toda la noche a 4°C. Después de 5 lavados con PBS se colocó el anticuerpo secundario α -ratón acoplado a FITC ó (1:100) por una hora. En el caso de los ensayos de co-localización se adicionó el segundo anticuerpo primario que en este caso fue α -GAP45 en una concentración 1:1000 y se incubó toda la noche a 4°C, se realizaron 5 lavados con PBS y se colocó el anticuerpo secundario acoplado a TRITC (rodamina). Posteriormente se realizaron nuevamente 5 lavados con PBS y se tiñeron los núcleos del parásito y las células con DAPI (1 μ g/ml) por 20 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con agua y se montaron en portaobjetos con 7 μ l de Vectashield (Vector Laboratories, UK). Las laminillas fueron

observadas en el microscopio de fluorescencia ZEISS AxioScope 2 Mot Plus, y en el microscopio confocal LSM 700 ZEN 2009 ambos de Carl Zeiss Inc. (Gottingen, Germany).

Gel bidimensional

Los taquizoítos purificados obtenidos de dos ratones o de cultivo celular se lisaron con amortiguador de lisis para electroforesis 2-D (Urea 7 M, Thiourea 2 M, Chaps al 4%, DTT 60 mM, amortiguador de anfotericina B 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 tres 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, Thiourea 2 M, Chaps al 4% y Azul de bromofenol). La muestra se colocó en la placa de corrida sobre tira de isoelectroenfoque, 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 corrió la segunda dimensión durante 80 min a 120V. Una vez hecha la segunda dimensión, el gel se tiñó con azul de coomassie o bien con nitrato de plata. En otros

casos se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para ser analizadas por Western Blot.

Purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad

Con la finalidad de concentrar y purificar los anticuerpos monoclonales contra la cinasa apical para posteriormente acoplarlos a perlas de sepharose 4B, se realizó una cromatografía de afinidad utilizando proteína A-sepharose en interacción con los sobrenadantes de los hibridomas o líquido de ascitis pre-clarificado por centrifugación por 5000 rpm/5 min. Se colocó el líquido de ascitis o sobrenadantes de los hibridomas en la columna y se dejó incubar por toda la noche a 4°C. Se lavó la columna con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm fuera de cero. Para eluir los anticuerpos acoplados, se agregó glicina (0.1M, pH 2.5), se recuperó y se leyó la absorbancia a 280 nm. Cuando el valor de la absorbancia presentó un pico, que corresponde al anticuerpo purificado, se neutralizó el pH a 7.0 con Tris base (1 M, pH 8.0). Las fracciones correspondientes al pico de anticuerpo se dializó contra PBS (500 ml/4^o C) a través de una membrana de diálisis previamente preparada por ebullición en EGTA (1 mM, pH 7.0). Se hicieron 3 cambios de PBS. Los anticuerpos purificados se guardaron en alícuotas a -20° C con azida de sodio al 0.1%.

Inmunoprecipitación

Con el fin de identificar a aquellas proteínas que pudieran estar en interaccionando con la cinasa apical, se realizó la técnica de inmunoprecipitación. Los citoesqueletos de taquizoítos se colocaron en 500 µl de buffer RIPA I (Tris-OH 50mM pH 8.0, NP40 1 %, Tritón 1 %, NaCl 150 mM, deoxicolato de sodio 1 %, SDS 0.1 %, EDTA 2.5 mM, PMSF, TLCK, TPCK) hasta disolver. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Se incubó 1 mg de proteína con el AcMn contra la cinasa apical toda la noche a 4° C en agitación constante y suave. Se incubó el complejo proteína-anticuerpo con la proteína G-agarosa (40 µl/mg de proteína) toda la noche a 4° C. Se centrifugó el complejo proteína-anticuerpo-proteína G a 14 000 rpm durante 10 min a 4° C, se recuperó el sobrenadante y se guardó hasta su uso. Se lavó el botón 2 veces con 100µl de RIPA II (Tris-OH 50 mM pH 8.0, NaCl

150 mM, Tritón 0.2 %, deoxicolato de sodio 0.2 %, SDS 0.02 %, PMSF, TLCK, TPCK), entre cada lavado se centrifugó a 14 000 rpm/10 min. El botón (el complejo (antígeno-anticuerpo-perlas) se resuspendieron en buffer de muestra 2X sin β -mercaptoeanol y se hirvieron durante 5 min. El sobrenadante se disolvió en buffer de muestra 4X sin β -mercaptoeanol, posteriormente las muestras se corrieron en en geles de poliacrilamida de 5 pozos al 10 % a 120V y los geles fueron, transferidos para su análisis por Western blot, o teñidos con azul de Coomassie para su análisis por espectrometría de masas.

Cromatografía de afinidad para la purificación de la TgAGC cinasa

Para el acoplamiento del anticuerpo monoclonal α -AGC a perlas de sepharose, se inchó 1 gramo de sepharose (Cyanogen bromide-activated agarose matrices, SIGMA-ALDRICH) con 2.5 mL de buffer de acoplamiento. Se preparó buffer de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1M + NaCl 0.5, pH 8.35) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las esferas de sepharose se lavaron consecutivamente con una solución de HCl 1mM frío por 30 min, agua destilada 10 mL y buffer de acoplamiento 2.5 mL, se centrifugó 5 min a 1000 rpm entre cada lavado. En un tubo de 15 mL se interaccionaron las perlas de sepharose con el anticuerpo monoclonal α -AGC (650 μ g) toda la noche a 4 °C en agitación suave. Al día siguiente se lavó la sepharose acoplada al anticuerpo con el buffer de acoplamiento y el sobrenadante se cuantificó para saber cuál fue la eficiencia del acoplamiento. Posteriormente se bloquearon los sitios activos con glicina 0.1 M en buffer de carbonatos pH 9.5 toda la noche 4°C en agitación suave. Posteriormente se montó una columna y se guardó a 4°C hasta su uso.

Para la purificación de la AGC cinasa se preparó un extracto de citoesqueleto (10 mg cuantificado por el método de Bradford) en una solución de extracción que contenía buffer de fosfatos 0.1 M, Tritón 0.5 %, Np 40 0.5%, NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas TPCK, TLCK y PMSF. La proteína solubilizada en buffer de extracción se pasó al menos 5 veces por la columna y se dejó toda la noche a 4 °C. La elución del antígeno se hizo después de un lavado exhaustivo de la columna con PBS hasta que la absorbancia fuera 0. La elución del antígeno se llevó a cabo a

pH alcalino empleando sucesivamente los amortiguadores Pre-strip (glicina 50 mM pH 9.3) y Alk-strip (dietilamina 50 mM pH 11.5) de acuerdo a las lecturas de absorbancia de las fracciones colectadas. Las fracciones una vez eluidas se neutralizaron de inmediato con una solución de Tris-HCl 1 M, terminada la cromatografía se regeneró la columna con PBS y las fracciones colectadas fueron dializadas inmediatamente en contra de PBS.

Espectrometría de masas de alta definición

Se cortaron las bandas del patrón electroforético las cuales fueron reconocidas por el anticuerpo ya sea del gel unidimensional, inmunoprecipitado o purificado por cromatografía de afinidad, las bandas cortadas se destiñeron con solución decolorante (metanol 50%, ácido acético 10%), se digirieron con tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI) 20ng/μl en bicarbonato de amonio 50mM por 10 minutos. El volumen fue reducido por evaporación en una centrífuga al vacío y ajustado a 20μl con ácido fórmico al 1%. Las muestras fueron desaladas por inyección del líquido en una columna de cromatografía Millipore® Ziptips, usando un gradiente lineal de acetonitrilo 2-70% y lavada con ácido fórmico al 0.1%. El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo en un equipo Waters de espectrometría de masas de alta definición SYNAPT G2-Si.

Se utilizaron cuatro criterios de exclusión para la selección de las proteínas identificadas de interés. El primero fue que el “score” dado fuera igual o mayor a 100, el segundo fue que el péptido no perteneciera a una secuencia “REVERSE”, el tercero fuera que las proteínas identificadas tuvieran al menos 3 péptidos detectados y por último que los péptidos detectados tuvieran carga diferente a 0.

Análisis bioinformático

Para la búsqueda de secuencias, dominios y BLAST (Basic lineal alignment search tool) se utilizó la base de datos de www.ncbi.nlm.nih.gov. Para la búsqueda de secuencias en el genoma de *Toxoplasma gondii* se utilizó la base de datos www.toxodb.org, para el análisis y modelamiento de los dominios de la AGC

cinasa se utilizó el programa informático “ILUSTRATOR FOR BIOLOGICAL SEQUENCES” disponible en la página ibs.biocuckoo.org.

Resultados

Caracterización bioinformática de la cinasa perteneciente a la familia AGC de *Toxoplasma gondii*.

Los resultados previos por Del Carmen et al. 2009 de inhibición de la extrusión de conoide con los inhibidores de PKC BIM I y Gö6983 indican que hay una cinasa tipo PKC en *Toxoplasma gondii* que participa en la extrusión del conoide. Sin embargo, no se encontró una PKC particular en el genoma de *Toxoplasma gondii* con los dominios propios de la isoforma α , como los son los dominios C1 de unión a esteres de phorbol y diacilglicerol y el dominio C2 de unión a calcio. Sin embargo, en su lugar se encontró una proteína homóloga a esta, que fue identificada como una AGC cinasa.

Para cumplir el primer objetivo se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína perteneciente a la familia AGC cinasa con el código de acceso ToxoDB; TGME49_267540.

Con base al análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de esta proteína realizada en PROSITE (sitio web: prosite.expasy.org). El análisis mostró que la TgAGC cinasa presenta 3 dominios de cinasas serina/treonina, los cuales son: a) STKc_AGC que es el sitio conservado de las cinasas pertenecientes a la familia AGC, b) S_TK_X que es un sitio conservado de cinasas serina/treonina y c) PKC_Cterm que es el sitio carboxilo terminal de PKC. PROSITE también mostró 4 posibles sitios de fosforilaciones: T18, S414, T419 y S808 (figura 13).

AGC cinasa de *Toxoplasma gondii*

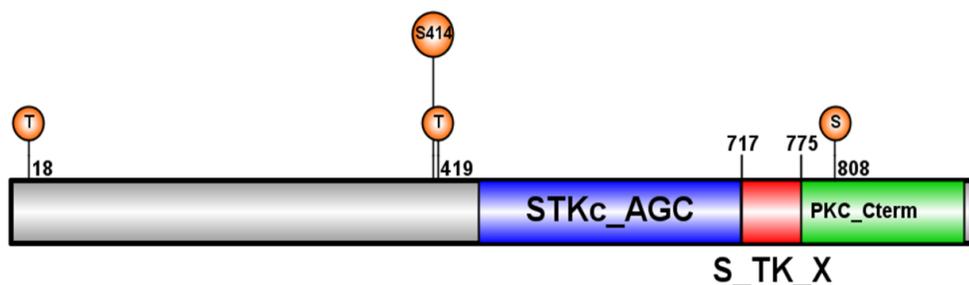


Figura 13: Identificación de los dominios de la AGC cinasa mediante PROSITE. La secuencia de la AGC cinasa con ID de ToxoDB TgME49_267540 se analizó en la base de datos de PROSITE. STKc_AGC; Sitio catalítico de la familia Serina/Treonina AGC cinasas, PKC_Cterm; Dominio C-terminal de PKC, S_TK_X; Sitio conservado de cinasas Ser/Thr. La imagen fué realizada utilizando el programa informático “Ilustrator for biological secuencias”.

Adicionalmente se hizo el análisis comparativo de todas las cinasas reportadas en *T. gondii* (Tabla 1), esto para descartar que la cinasa de nuestro interés no estuviera reportada bajo otros nombres, cabe resaltar que no hay ninguna PKC en *Toxoplasma gondii*, y la mas parecida a la AGC cinasa es la PKG que es otra cinasa perteneciente a la familia AGC. Nuestro análisis indicó que a la fecha no hay reportada en *T. gondii* la información sobre alguna AGC cinasa y sobre todo con ubicación apical y relacionada con la extrusión del conoide.

Cinasas			
MAPK1	TgCDPK3	TgCDPK7	ROP 17
MAPK2	TgCDPK4	TgCDPK7A	ROP18
TgPKG	TgCDPK4A	TgCDPK8	
TgPKA	TgCDPK4B	TgCDPK9	
TgPKA-R	TgCDPK5	ROP2	
TgCDPK1	TgCDPK6	ROP4	
TgCDPK2	TgCDPK7	ROP5	

Tabla 1: Cinasas reportadas en *Toxoplasma gondii*.

Aislamiento del citoesqueleto

Validación del correcto aislamiento del citoesqueleto

Una vez hecha la caracterización bioinformática de la cinasa fue necesario validar el aislamiento correcto del citoesqueleto, mediante microscopia electrónica de transmisión (MET) a fin de poder determinar mediante los métodos de Western blot e inmunoprecipitación si efectivamente nuestra TgAGC cinasa estaba asociada a la fracción del citoesqueleto. Como se puede observar en la figura 14, después del tratamiento con PHEM-Tritón x se pierde el contenido citoplasmático, así como la membrana plasmática y únicamente queda el citoesqueleto subpeliclar. En el inserto A se observa una amplificación de la zona apical en donde está ubicado el conoide, en el inserto B se observa la red subpeliclar y la parte terminal de los microtúbulos subpeliclares (flecha), en el inserto C la zona electrodensa corresponde al anillo polar posterior. En el panel de la derecha se muestra el conoide, observándose los filamentos de tubulina que conforman esta estructura.

Otra forma de comprobar que el citoesqueleto se aísla de forma adecuada es

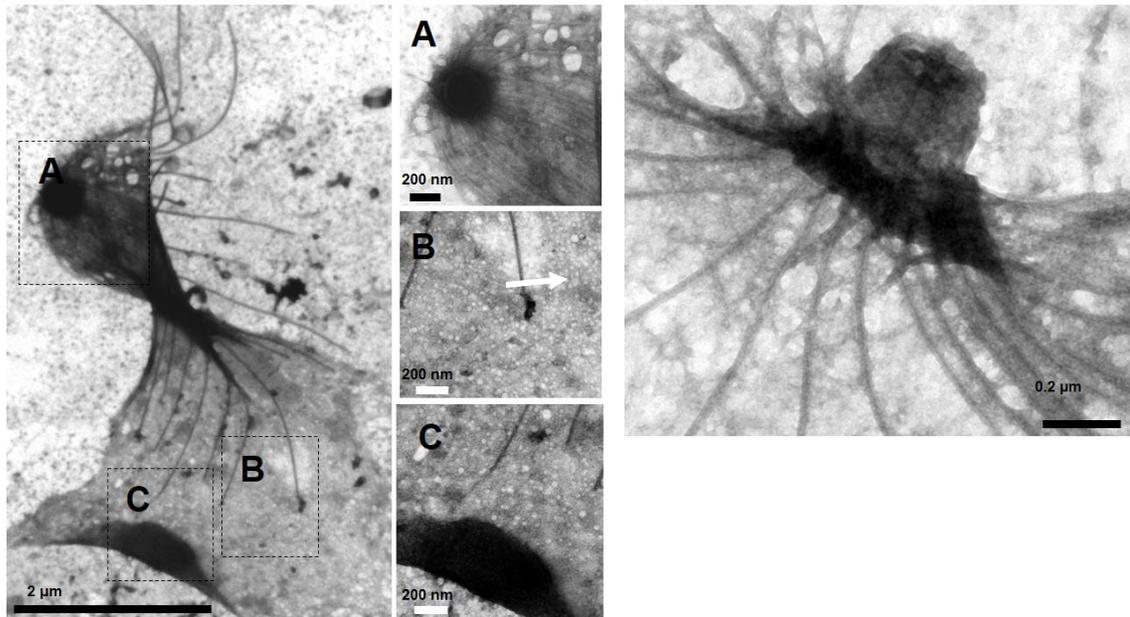


Figura 14: Aislamiento del citoesqueleto subpellicular de taquizoítos de *T. gondii* y observación mediante MET. Los citoesqueletos fueron teñidos y fijados en rejillas de níquel y observados al microscopio electrónico de transmisión JEOL 200EX (JEOL LTD, Japan)

mediante electroforesis en gel como se muestra en la figura 15. Los patrones electroforéticos del extracto total (ET), citoesqueleto (CK) y de la fracción soluble (Snte) son completamente diferentes, además hay bandas enriquecidas en la fracción de citoesqueleto que no están en el ET o Snte (flechas) y vice-versa, si sumamos los perfiles electroforéticos del Ck y del Snte es igual al perfil del ET, este resultado nos indica que estamos separando adecuadamente el CK del resto de las proteínas, cabe resaltar que las bandas presentes en el carril de CK y Snte son muchas más intensas que las presentes en el ET ya que son enriquecidos.

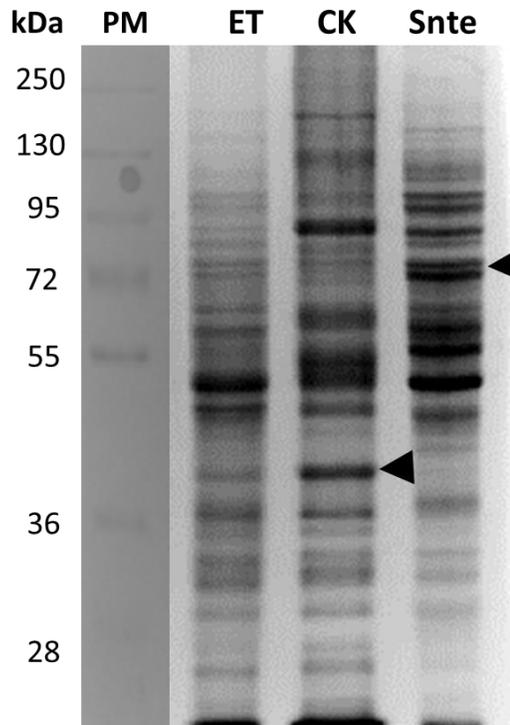


Figura 15: Perfil electroforético diferencial de la fracción de citoesqueleto. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de coomassie, en todos los carriles se aplicaron 20 μ g de proteína, PM; peso molecular, ET; extracto total, CK; citoesqueleto, Snte; sobrenadante. n=3

Para corroborar que efectivamente se tenía aislada la fracción de citoesqueleto, se realizaron ensayos de Wb utilizando para ello tres marcadores moleculares específicos: a) el primero de ellos es IMC 1 que es una proteína asociada al CMI y este complejo está asociado al citoesqueleto del parásito, esta proteína solo lo vemos como se esperaba en mi fracción de ET y en el citoesqueleto como se puede observar en la figura 16; b) GAP 45 es una proteínas también usada como marcador y que está presente en el CMI; y c) SAG1, que es una proteína específica de la membrana plasmática. Los resultados mostraron que IMC1 y GAP45 solo estuvieron presentes en la fracción del extracto total y en la fracción del citoesqueleto mientras que la proteína SAG1 solo estuvo en la fracción total y en la fracción soluble en donde están los componentes de la membrana plasmática y de organelos solubilizados por el tratamiento con el detergente Tritón X-100 (Figura 16). Con esta estrategia se corroboró el correcto aislamiento de CK.

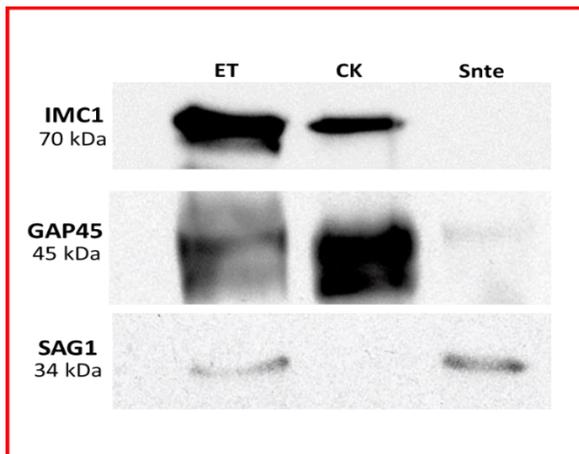


Figura 16: Western blot para validar el aislamiento de citoesqueleto. Se corrió el extracto total de taquizoíto, citoesqueleto y sobrenadante, se transfirió a nitrocelulosa y se reveló con anti-IMC1, GAP45 y SAG 1. ET; extracto total, CK; citoesqueleto, Snte; sobrenadante. n=2

Obtención del anticuerpo y purificación

En la producción del anticuerpo monoclonal anti-TgAGC cinasa se generaron al menos 6 clonas de hibridomas positivas. Se probaron los sobrenadantes para determinar el patrón de bandas reconocidas mediante Wb. La figura 17 muestra los inmuno-blots realizados durante el screening de todas las clonas obtenidas sin titular al anticuerpo. Con todos los hibridomas evaluados, no se detectó reactividad con el extracto total de cerebro de rata indicando la especificidad hacia la molécula de *Toxoplasma*

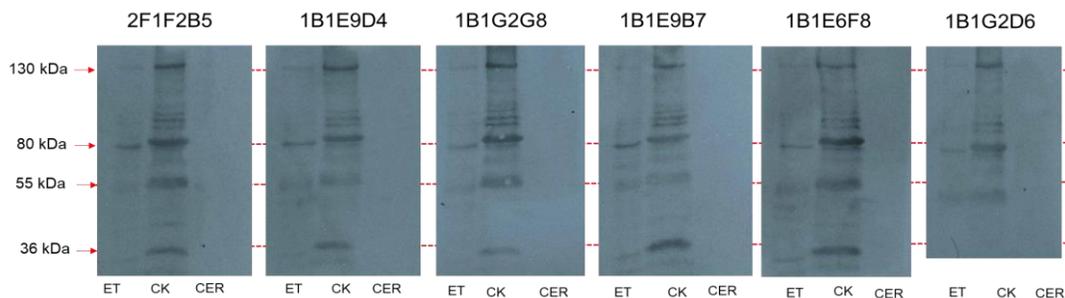


Figura 17: Western blot de los 6 hibridomas anti TgAGC cinasa obtenidas. Se corrió electroforéticamente el extracto total (ET), el citoesqueleto (CK) y como control cerebro de rata (CER), se transfirió en nitrocelulosa y se probaron los sobrenadantes de las 6 clonas obtenidas dando como resultado al menos 4 bandas; una en 130 kDa, otra en 80 kDa, una de 55 kDa y por ultimo una de 36 kDa. n=2

Se eligió el hibridoma de la clona 1B1E9B7 ya que es la que mejor estaba creciendo y dio una buena reactividad. Los resultados de Western blots (Figura 17) muestran al menos 4 bandas de interés correspondientes a los pesos moleculares de 130, 80, 55 y 36 kDa. Posteriormente se tituló el sobrenadante de la clona seleccionada en WB evaluando diferentes diluciones del anticuerpo anti TgAGC cinasa con el fin de determinar cuál era el título óptimo para trabajar. Se analizaron 8 diluciones (figura 18), desde 1/1 hasta 1/8000 en TBS-T, se escogió la dilución 1/100 (encerrada en el recuadro rojo) para trabajar, porque no dio fondo y se vieron intensas las bandas de interés.

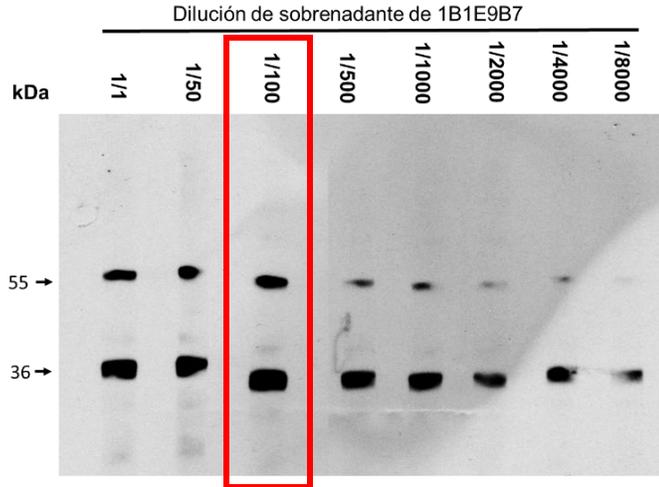


Figura 18: Titulación del anticuerpo anti TgAGC cinasa. Se separaron electroforéticamente muestras de citoesqueleto aislado de *T. gondii* en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas por quimioluminiscencia utilizando diferentes diluciones de sobrenadante de la clona 1B1E9B7, las cuales se indican en la parte superior de la imagen. CK: citoesqueleto, kDa: kilodaltones. n=2

El anticuerpo se obtuvo en dos fuentes, aquel presente en el sobrenadante y en líquido de ascitis para producirlo en mayor escala.

Purificación de anticuerpo α -AGC

El siguiente paso fue purificar el anticuerpo anti TgAGC cinasa a partir del sobrenadante y de líquido de ascitis. Para ello se montó una columna de proteína A acoplada a sepharose. Se pasó el líquido de anticuerpos al menos tres veces por la columna para después hacer la elución del anticuerpo con glicina pH 2.5. La figura 19 muestra el cromatograma con el pico de elución correspondiente al anticuerpo purificado. Para verificar que el anticuerpo purificado estuviera libre de impurezas se decidió correrlo en un gel de poliacrilamida al 10% y teñirlo mediante la técnica de nitrato de plata dada su sensibilidad. En la figura 20 se muestra el resultado de la purificación en el cual se observa las bandas correspondientes a la cadena ligera y pesadas, es importante resaltar que la cantidad total de anticuerpo obtenido del líquido de ascitis fue mucho mayor por cada experimento (200 ug en total) que el obtenido del sobrenadante (50 ug en total).

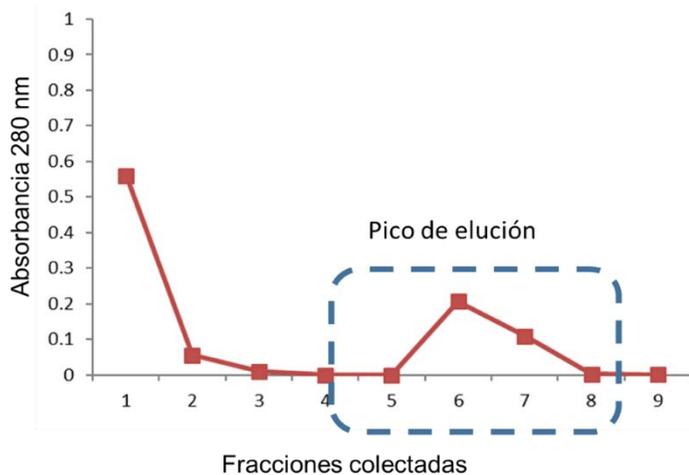


Figura 19: Cromatograma de la purificación del anticuerpo 1B1E9B7 (B7). Se pasó líquido de ascitis a través de la columna de afinidad y se eluyó mediante cambio de pH (de neutro a ácido). El eluido se colectó en fracciones de 3 mL y se neutralizó de inmediato con Tris-Base pH 8 y se cuantificó por absorbancia a 280 nm. N=10

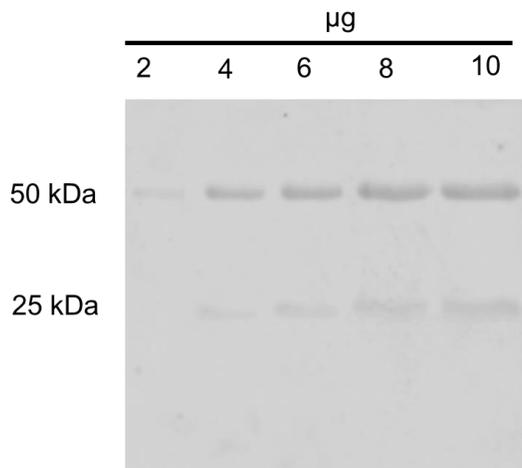


Figura 20: SDS-PAGE del anticuerpo purificado. Se corrió electroforéticamente diferentes cantidades de anticuerpo observándose tanto la cadena pesada en el peso molecular de 50 kDa y la cadena ligera de 25 kDa. Gel al 12%, condiciones desnaturalizantes, tinción de nitrato de plata n=2

Análisis de del epítipo del anticuerpo anti-AGC cinasa en la base de datos de NCBI

Debido a que obtuvo un reconocimiento por Wb con el anticuerpo anti-TgAGC cinasa de al menos 4 moléculas de citoesqueleto, fue necesario descartar interacciones inespecíficas. El péptido con el que se inmunizaron los ratones tiene la secuencia TRRGDFSPREKREA como se describió en los antecedentes, esta secuencia pertenece a la TgAGC cinasa aquí estudiada. Con el fin de descartar que dicho epítipo no estuviera en otras proteínas, se hizo un análisis de BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool) utilizando toda la base de datos de NCBI. El resultado (Figura 21) indica que el epítipo únicamente está en nuestra proteína de interés, y también está presente en las diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*. Este resultado es importante porque descarta posibles interacciones del anticuerpo con otras proteínas no deseadas. Adicionalmente, indica que el anticuerpo está dirigido contra el epítipo presente en la cinasa de nuestro interés y que las bandas encontradas por Western blot no son artificios.

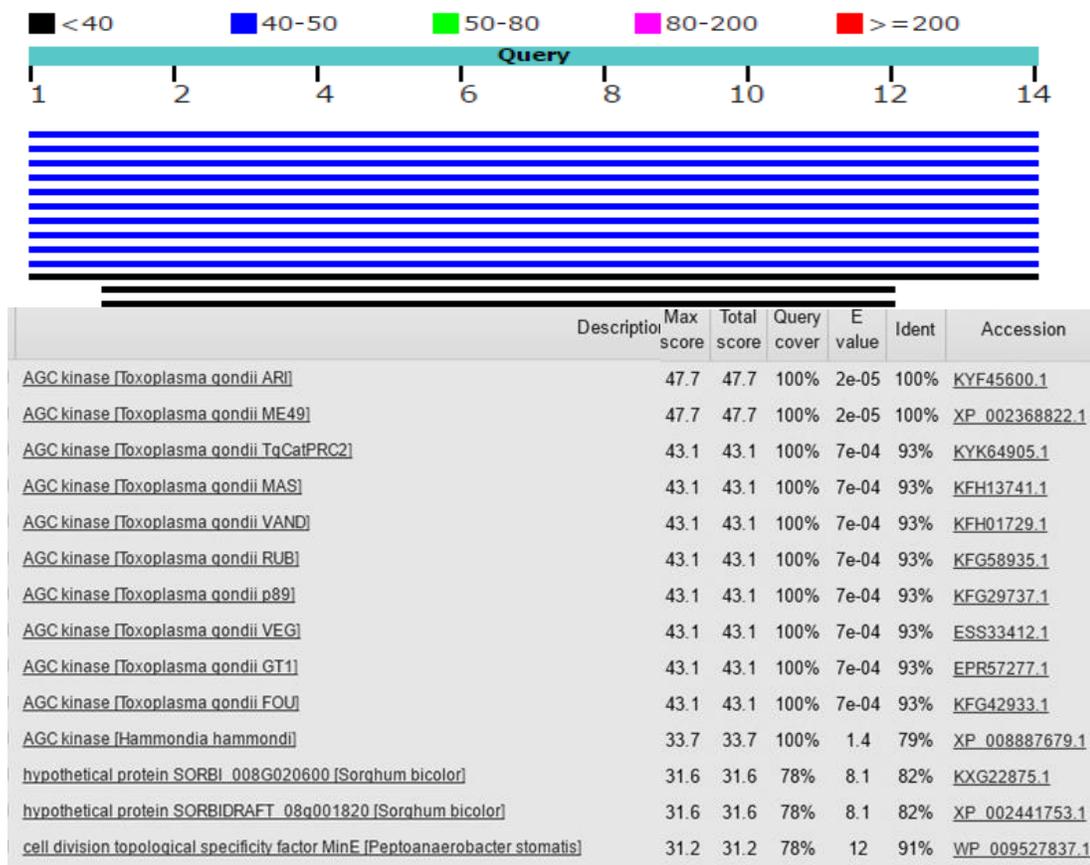


Figura 21. BLAST del epítipo TRRGDFSPREKREA en la base de datos de NCBI.

Una forma experimental para evaluar la especificidad del anticuerpo es mediante un ensayo de bloqueo, es decir, se incuba el anticuerpo primario, en este caso el

α -TgAGC cinasa, con el péptido utilizado para inmunizar los ratones. Posteriormente la mezcla de anticuerpo y el péptido B7 se utiliza como anticuerpo primario en membranas de Wb conteniendo un extracto de citoesqueleto. El resultado obtenido mostró que la incubación con esta solución presentó una disminución de la intensidad de las bandas de acuerdo a la concentración del péptido adicionado sin llegar a desaparecer ya que posiblemente no se llegó al punto de saturación del anticuerpo. Esto evidenció que el péptido compitió por el anticuerpo dejando menos moléculas del anticuerpo disponibles para su reacción con las tiras de nitrocelulosa conteniendo el extracto de citoesqueleto enriquecido (Figura 22).

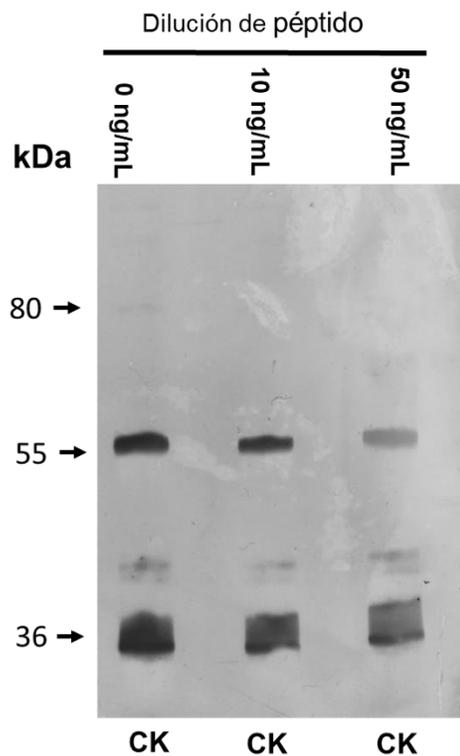


Figura 22: Ensayo de bloqueo de anticuerpo con el antígeno (péptido B7).

Se separaron electroforéticamente muestras de citoesqueleto aislado de *T. gondii* en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas por quimioluminiscencia utilizando las diluciones del péptido B7 indicadas en la parte superior de la figura. CK: citoesqueleto, kDa: kilodaltones. n=3

Una vez que se determinó que el anticuerpo es específico para la cinasa en cuestión, el siguiente objetivo fue analizar si las proteínas alojadas en las bandas de 36, 55 y 80 kDa fueran proteínas únicas y no subunidades de una única proteína. Para descartar esta posibilidad se hizo un gel en condiciones nativas, es decir, se disolvieron las muestras en los buffers sin calentar y sin utilizar agentes

reductores. En la figura 23 se muestra el Western blot correspondiente en el cual se muestra el mismo patrón de bandeo observado que cuando se hace en condiciones reductoras. Estos resultados mostraron tres bandas ya descritas anteriormente de 80, 55 y 36 kDa. Es pertinente aclarar que la banda de 80 fue la de menor intensidad sugiriendo una menor concentración de esta molécula.

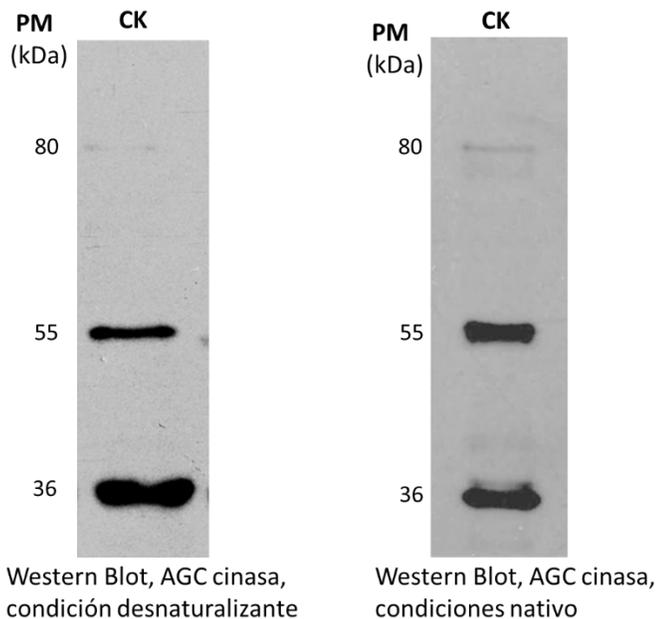


Figura 23: Western blot nativo de citoesqueleto. Se aisló citoesqueleto de *T. gondii* en buffers sin agentes reductores, se separó electroforéticamente las proteínas y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se reveló por quimioluminiscencia. CK: citoesqueleto, kDa: kilodaltones. n=2

Identificación de las proteínas presentes en las bandas de 80, 55 y 36 kDa mediante espectrometría de masas

Con la finalidad de identificar la cinasa apical de *Toxoplasma gondii* se separaron electroforéticamente las proteínas en un gel de poliacrilamida al 10 % por duplicado, uno se transfirió a nitrocelulosa y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el anticuerpo monoclonal α -AGC cinasa (Figura 24 B), el gel restante se tiñó con azul de Coomssie. Utilizado el patrón de bandeo del Western blot, se

localizaron las bandas de reconocimiento del anticuerpo α -AGC cinasa (Figura 24 A) y se cortaron para posterior su procesamiento para el espectrómetro de masas.

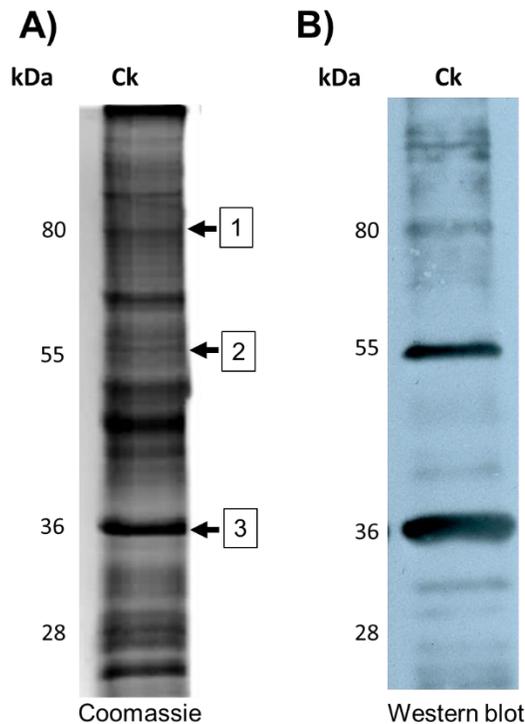


Figura 24: SDS-PAGE de citoesqueleto y su Western Blot. Se separaron electroforéticamente muestras de citoesqueleto aislado de *T. gondii* en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas por quimioluminiscencia utilizando el anticuerpo α -AGC cinasa. Los números del panel A indican las bandas que se cortaron y procesaron para espectrometría de masas. CK: citoesqueleto, kDa: kilodaltones. n= 2

Cuando se analizaron las proteínas por espectrometría de masas de la banda de 36 kDa, se encontraron varias proteínas con el dominio cinasa, entre ellas ROP5, ROP8, ROP 35 y ROP 40, una ULK cinasa y además una casein cinasa putativa. Se hizo la comparación de sus secuencias respecto a la AGC cinasa en el genoma del parásito y a fin de verificar su similitud se utilizó la herramienta bioinformática BLAST proporcionada por NCBI, se encontró que son semejantes en una porción de su secuencia, sin embargo, estas moléculas no contienen el epítipo de 15 aminoácidos que inicialmente fue utilizado para inmunizar a los ratones, lo que indica que de las moléculas detectadas, ninguna corresponde a la cinasa de interés (Tabla 2).

En relación a la banda de 55 kDa, se encontraron 11 proteínas cinasa, de las cuales únicamente la ROP45 se alineó con solo 4 aminoácidos de los 14 que conforman el epítipo, sin embargo, está proteína es putativa y tiene un peso molecular de 61

kDa, además de un punto isoeléctrico de 6.8 (Tabla 3), por lo cual no corresponde a la AGC cinasa de interés.

Respecto a la banda de 80 kDa y siguiendo el mismo tipo de análisis comparativo, únicamente se encontraron 3 cinasas de las cuales ninguna coincidió con la AGC cinasa y tampoco contienen el epítipo mencionado (Tabla 4).

Las proteínas encontradas en las bandas de 36, 55 y 80 kDa, se clasificaron como: putativas, de los gránulos densos, micronemos (MIC), SAG, hipotéticas, de las roptrías (ROP), enzimas metabólicas, de unión a ácidos nucleicos, cinasas, ribosomales, de choque término (HSP), asociadas a tRNA, fosfatasa, proteasas, factores de traducción, relacionadas a actina y factor de elongación (Figuras 25 a la 27).

Proteína	ID de ToxoDB	Función	Identidad AGC cinasa (C, cobertura; I, identidad)	Identidad Péptido B7 (C, cobertura; I, identidad)	Peso molecular (kDa)
ROP40	TGME49_291960	Virulencia	14 % C 33 % I	0 %	57
ULK kinase	TGME49_235750	Autofagia (mamífero)	34 % C 29 % I	0%	41
ROP35	TGME49_304740	No está claro	34 % C 27 % I	0 %	71
Casein Cinase I, putativa	TGME49_289320	No determinado	26 % C 34 % C	0 %	48
ROP 5	TGME49_308090	Virulencia	55 % C 23 % C	0 %	61
ROP 8	TGME49_215775	Virulencia	26 % C 28 % C	0 %	65

Tabla 2: Cinasas encontradas en la banda de 36 kDa. Se hizo el análisis mediante BLAST a las cinasas encontradas en la banda de 36 kDa, los resultados se muestran en porcentaje de cobertura e identidad con la AGC cinasa y el péptido (epítipo) así como su peso molecular.

Proteína	ID de ToxoDB	Función	Identidad AGC cinasa (C, cobertura; I, identidad)	Identidad Péptido B7 (C, cobertura; I, identidad)	Peso molecular (kDa)
ROP40	TGME49_291960	Virulencia	14 % C	0%	57
			33 % I		
CMCG cinasa	TGME49_263070	Ciclo celular	30 % C	0%	60
			31 % I		
ROP24	TGME49_252360	Virulencia	24 % C	0 %	61
			32 % I		
ROP39	TGME49_262050	Virulencia	55 % C	0 %	48
			36 % I		
Diacilglicerol cinasa	TGME49_259830	Virulencia	19 % C	0 %	69
			26 % I		
CDPK1	TGME49_301440	Exocitosis, motilidad e invasión	45 % C	0 %	65
			35 % I		
ERK 7 (putativa)	TGME49_233010	Ciclo celular	35 % C	0 %	73
			26 % I		
Protein cinasa	TGME49_234950	No determinado	21 % C	0%	56
			26 % I		
CDPK3	TGME49_252360	Egreso	34 % C	0 %	60
			29 % I		
Selenide water dikinase	TGME49_280560	No determinada	18 % C	0 %	140
			31 % I		
ROP 45 (putativa)	TGME49_240090	Virulencia	33 % C	5/14 (45%)	61
			27 % I		

Tabla 3: Cinasas encontradas en la banda de 55 kDa. Se hizo el análisis mediante BLAST a las cinasas encontradas en la banda de 36 kDa, los resultados se muestran en porcentaje de cobertura e identidad con la AGC cinasa y el péptido (epítipo) así como su peso molecular.

Proteína	ID de ToxoDB	Función	Identidad AGC cinasa (C, cobertura; I, identidad)	Identidad Péptido B7	Peso molecular (kDa)
PEP-carboxicinasas I	TGME49_289650	Metabólica	6	0 %	75
			20		
Selenide water dikinase	TGME49_280560	No determinada	18 % C	0 %	140
			31 % I		
Ribosa-fosfato difosfocinasas	TGME49_284580	Metabolismo	10	0%	69
			47		

Tabla 4: Cinasas encontradas en la banda de 80 kDa. Se hizo el análisis mediante BLAST a las cinasas encontradas en la banda de 36 kDa, los resultados se muestran en porcentaje de cobertura e identidad con la AGC cinasa y el péptido (epítipo) así como su peso molecular.

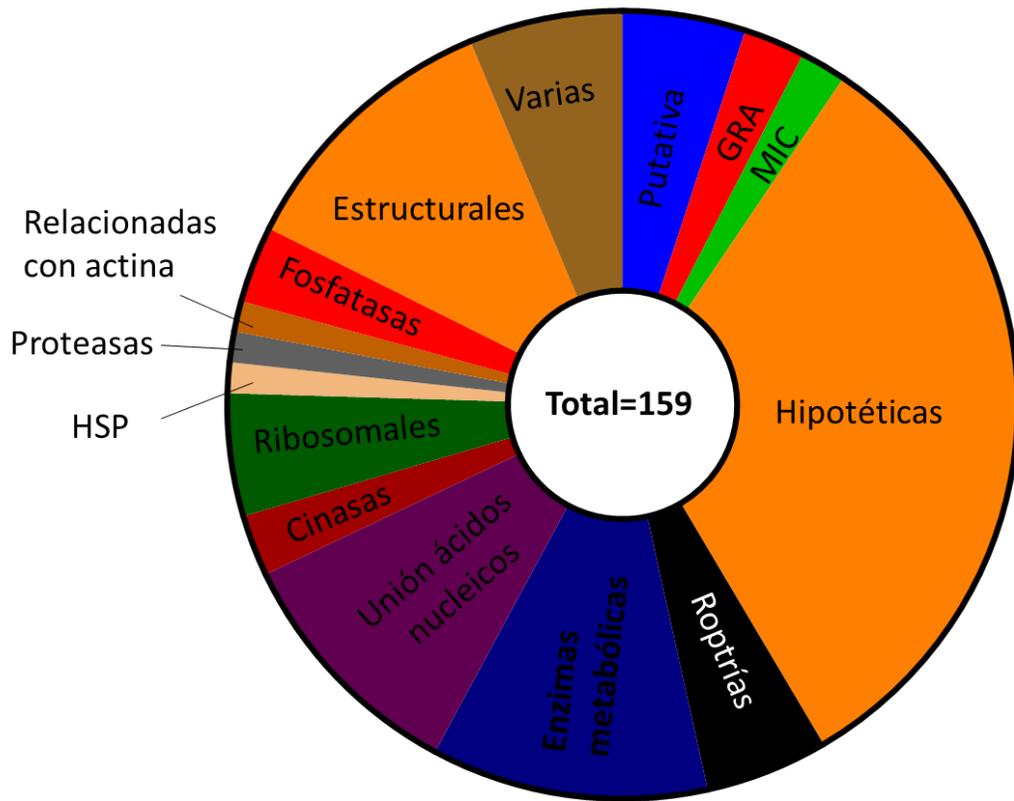


Figura 25: Clasificación de las 159 proteínas encontradas en la banda correspondiente al peso molecular de 36 kDa.

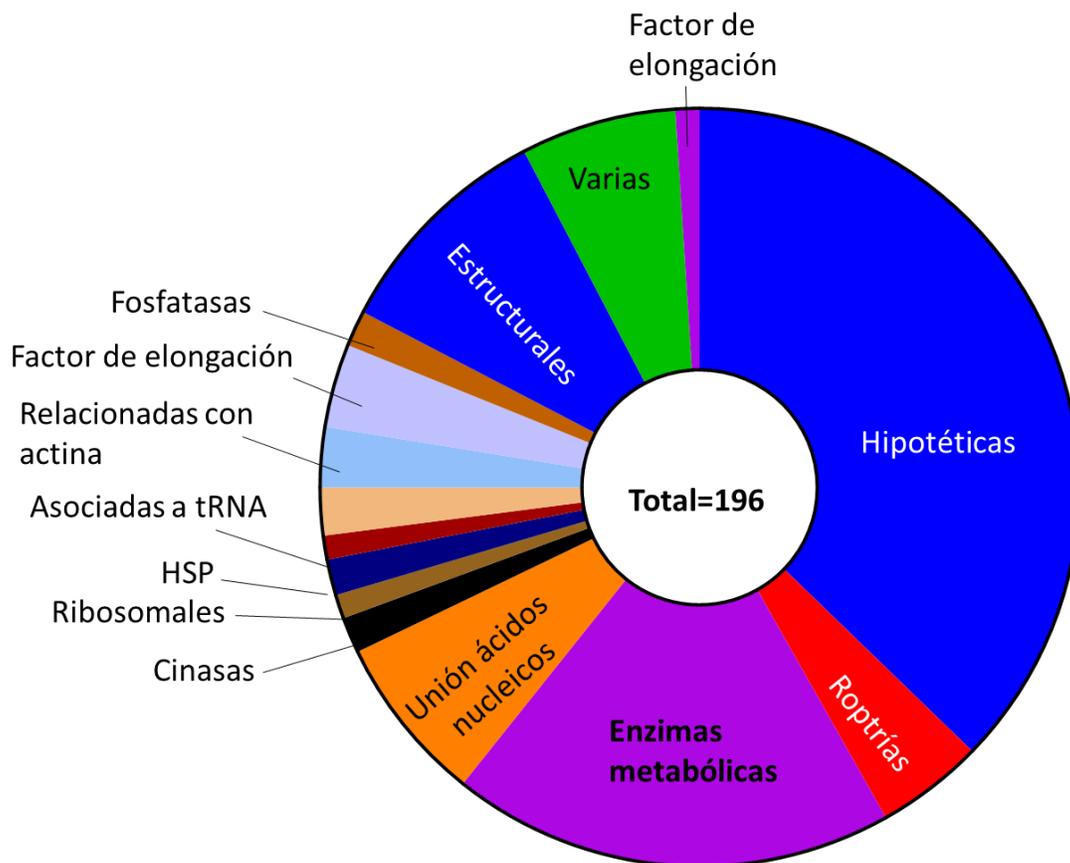


Figura 26: Clasificación de las 196 proteínas encontradas en la banda correspondiente al peso molecular de 55 kDa.

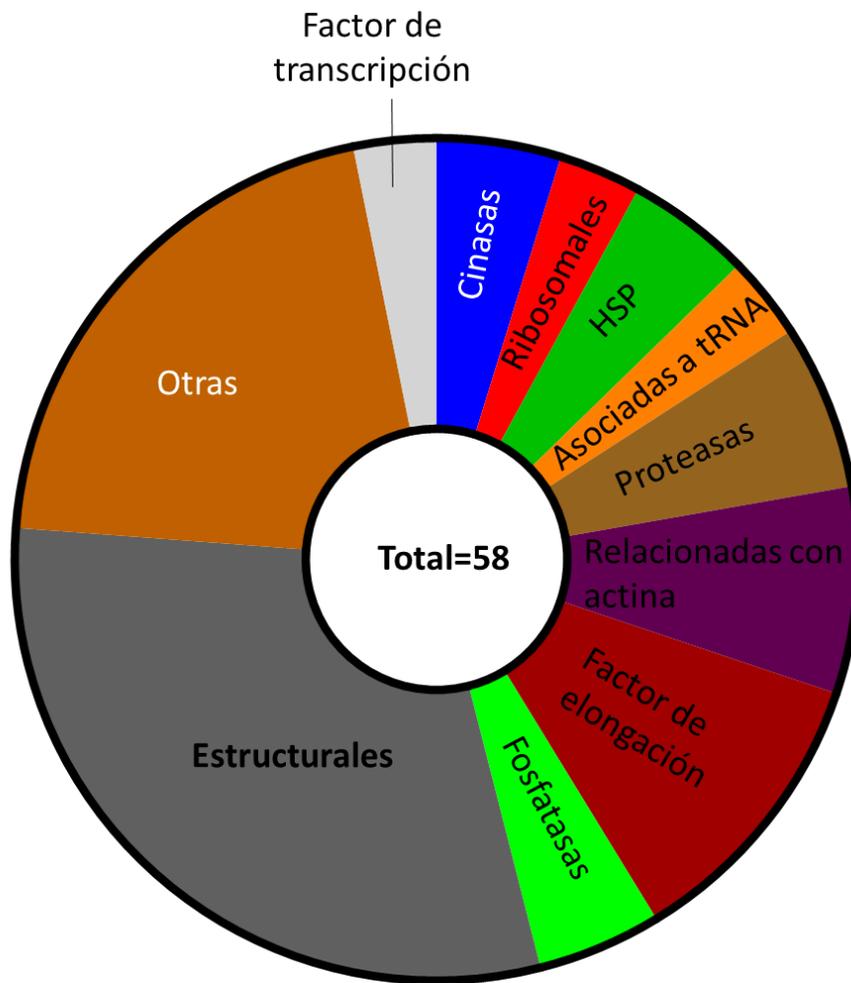


Figura 27: Clasificación de las 598 proteínas encontradas en la banda correspondiente al peso molecular de 80 kDa.

Inmunoprecipitación en condiciones reductoras y nativas

Con la finalidad de identificar posibles complejos moleculares asociados a la cinasa, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IPP) en citoesqueletos aislados utilizando el AcMn anti-TgAGC purificado. En un primer intento, se colocaron el pellet y el sobrenadante de la inmunoprecipitación en un buffer reductor (figura 28, panel izquierdo). Cuando se intentó identificar mediante ensayos de Western blot, se observó que la cadena pesada del AcMn (PM 50 kDa) enmascaraba la presencia de la banda de la TgAGC cinasa de 55 kDa.

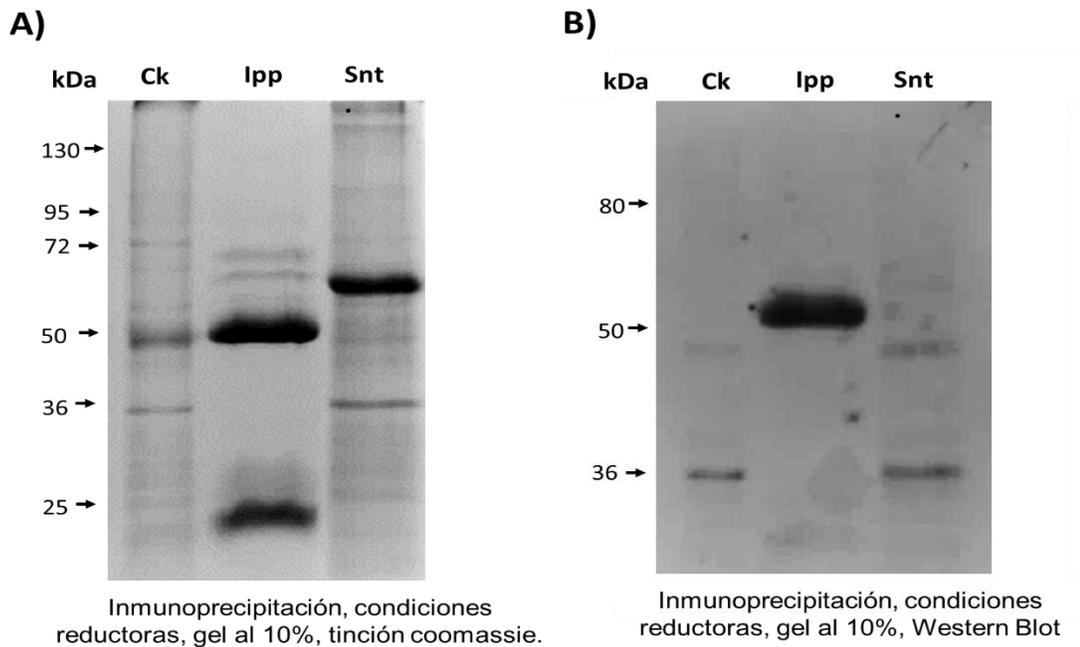


Figura 28. Inmunoprecipitación de la TgAGC cinasa en citoesqueletos aislados. A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie; las muestras se colocaron en buffer reductor. B) El gel de poliacrilamida se transfirió y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el anticuerpo purificado: las muestras se colocaron en buffer reductor. IPP, inmunoprecipitado; Ck, citoesqueleto; Snt, sobrenadante; kDa, peso molecular. n=2

Para evitar la interferencia causada por la cadena pesada del anticuerpo, se colocaron las proteínas en un buffer no reductor y así el anticuerpo quedó íntegro en un peso molecular aproximado a 150 kDa, permitiendo la detección de la

TgAGC cinasa mediante electroforesis en gel y Western blot, también permitió procesar las bandas que fueron cortadas para procesarlas para espectrometría de masas, las bandas cortadas corresponden a los pesos moleculares de 80, 55, 46 y 36 kDa (Figura 29).

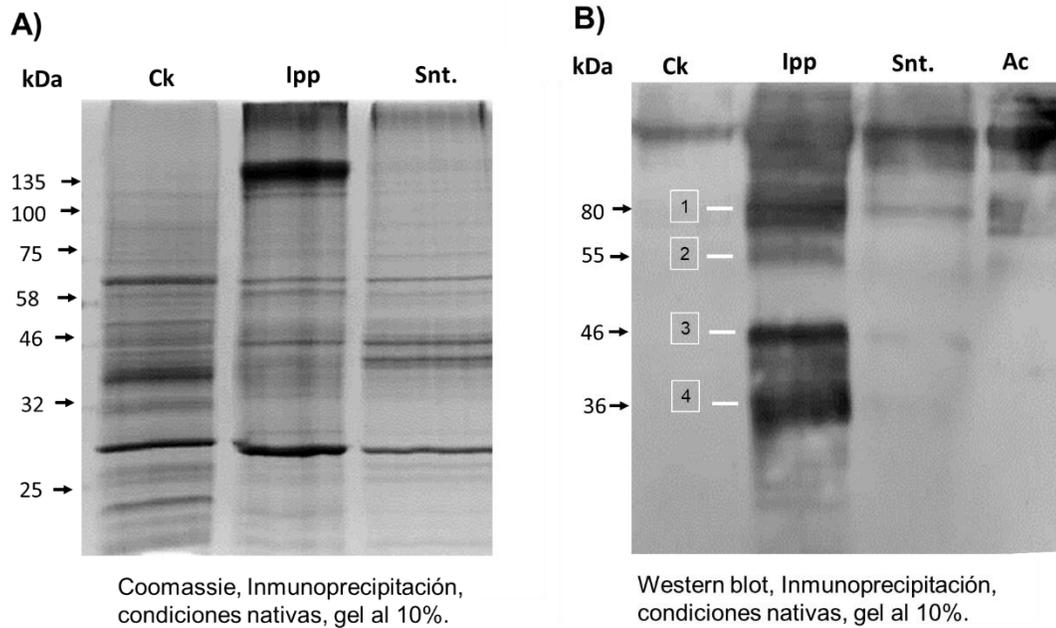


Figura 29. Inmunoprecipitación nativa de TgAGC cinasa en citoesqueletos aislados. A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie; las muestras se colocaron en buffer no reductor. B) El gel de poliacrilamida se transfirió y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el anticuerpo purificado: las muestras se colocaron en buffer no reductor. Los números indican las bandas que fueron cortadas del gel correspondiente con la finalidad de procesarlas para hacer la identificación por espectrometría de masas. IPP, inmunoprecipitado; Ck, citoesqueleto; Snt, sobrenadante; kDa, peso molecular. n=3

Análisis del inmunoprecipitado de citoesqueleto mediante espectrometría de masas

Con la finalidad de identificar los posibles complejos moleculares que está formando la AGC cinasa se hizo inmunoprecipitaciones en condiciones no reductoras. En la figura 29 se indican en recuadros blancos las bandas procesadas. Los resultados de espectrometría de masas no mostraron alguna cinasa, sin embargo, las proteínas observadas pertenecen mayoritariamente a las roptrías y citoesqueleto (Figura 30).

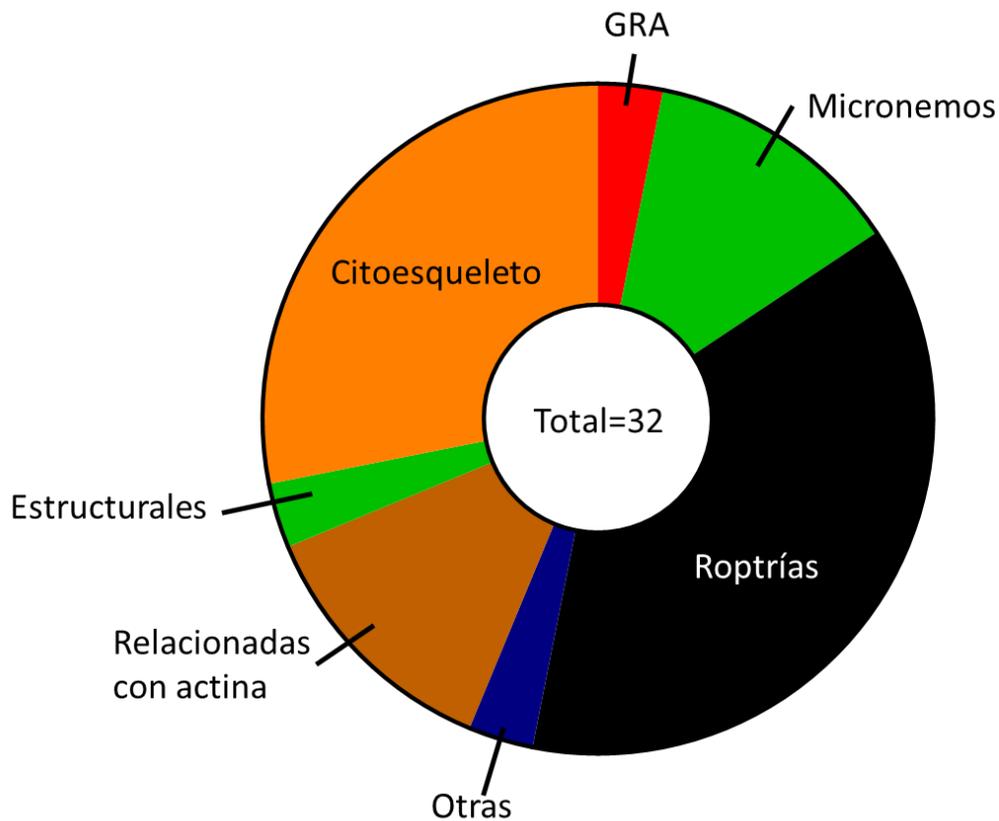


Figura 30: Gráfica de pastel de las proteínas encontradas en el inmunoprecipitado de citoesqueleto. Se encontraron un total de 32 proteínas en esta banda, las cuales se clasificaron dentro de los rubros indicados.

Geles bidimensionales

Con la finalidad de identificar si las proteínas alojadas en las bandas de 80, 55 y 35 kDa pertenecen a proteínas únicas o son varias, se hizo un gel bidimensional así como un WB. En el gel teñido con azul de Coomassie se detectaron aproximadamente 25 spots, después de hacer la transferencia y la inmunodetección revelada por quimioluminiscencia, se identificó un spot en 80 kDa, uno más en el peso de 55 kDa y al menos cuatro spots en el peso molecular de 36 kDa, todas con diferente punto isoeléctrico (Figura 31).

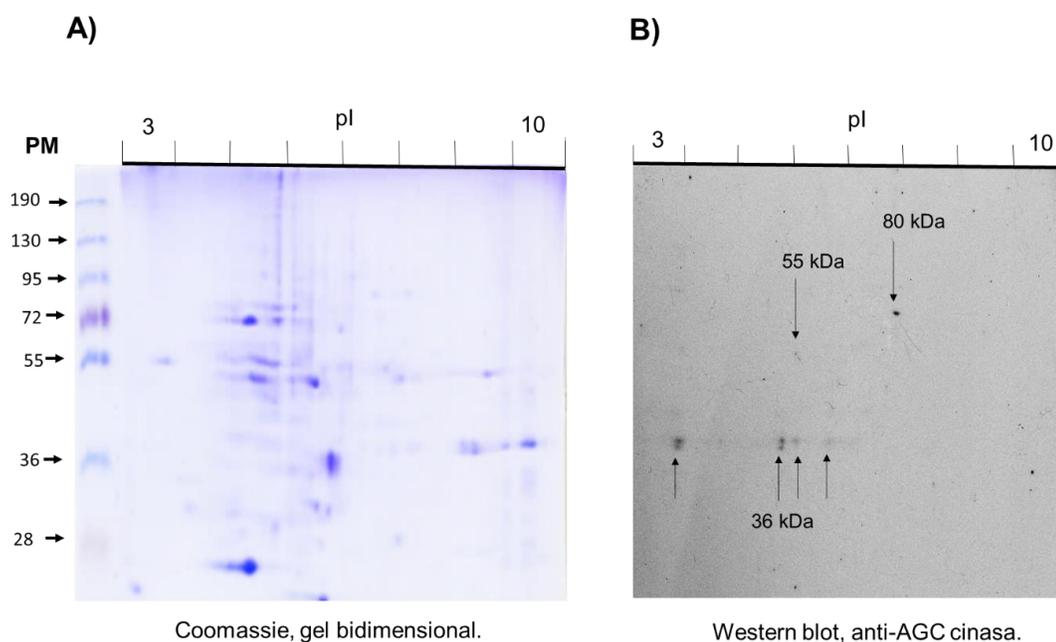


Figura 31. Perfil electroforético 2D de citoesqueleto de *Toxoplasma gondii*. A) El gel 2D se tiñó con azul de Coomassie. B) El gel 2D se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se reveló por quimioluminiscencia. En ambos casos la primera dimensión se corrió en un gradiente de pH 3-10, la segunda dimensión SDS-PAGE al 10%. Pi; punto isoeléctrico, PM; peso molecular, kDa; kilodaltones. n=2

Purificación de la AGC cinasa

Para cumplir con el último objetivo planteado, es decir, la purificación de la AGC cinasa para después ser identificada mediante espectrometría de masas, se acopló

0.8 mg de AcMn α -AGC a esferas de sefarosa 4B activadas. Se obtuvo una eficiencia de acoplamiento de 99%, basado en la cantidad de la proteína inicial y en la final. Posteriormente se pasaron 10 mg del antígeno (citoesqueleto) disuelto en una solución que contenía buffer de fosfatos 0.1 M, Tritón 0.5%, Np 40 al 0.5%, NaCl 15 mM e inhibidores de proteasas. Al siguiente día se hizo la elución del antígeno mediante cambio de pH a alcalino con glicina pH 9.5 y dietilamina 50mM pH 11.5. En la figura 32 se puede observar el espectro de elución de la TgAGC cinasa. Las fracciones colectadas corresponden de la 8 a la 10.

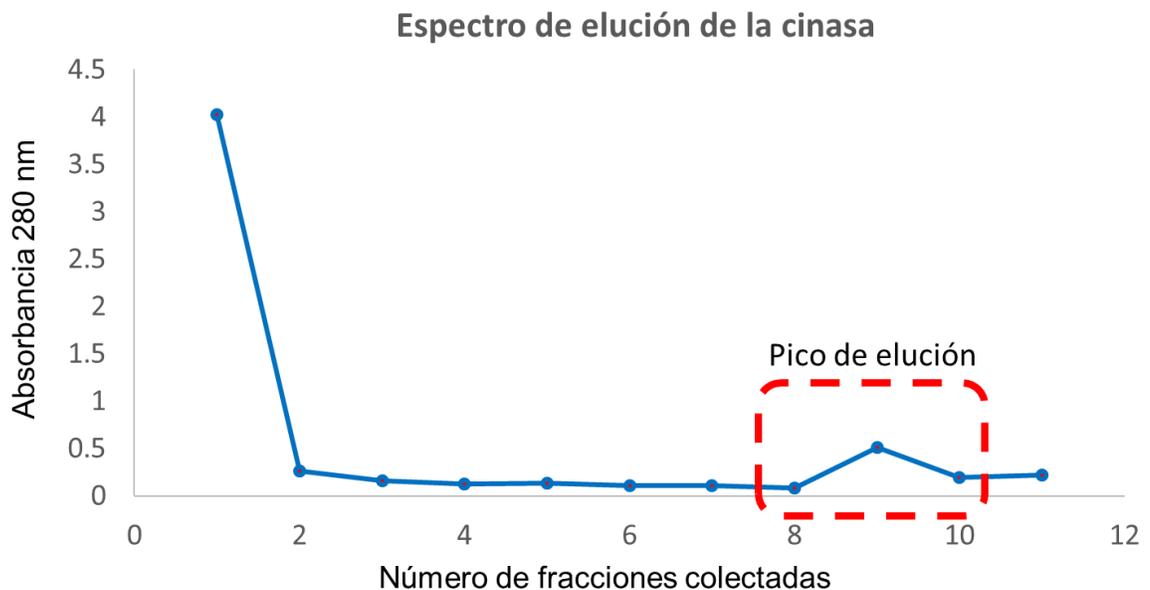


Figura 32. Purificación de la AGC cinasa por columna de afinidad. Espectro de elución de la AGC cinasa de citoesqueleto de *Toxoplasma gondii*. En el recuadro rojo se señalan las fracciones colectadas correspondiente a la proteína purificada. n=2

La proteína purificada fue inmediatamente dializada contra PBS, después se precipitó mediante la técnica cloroformo-metanol para posteriormente separarla por electroforesis en gel y Western blot. En el gel teñido con nitrato de plata, en los carriles correspondientes a la elución de antígeno con dietilamina pH 11.5 (Pico de elución), se observan al menos tres bandas; una de 80 kDa, una minoritaria en 55 kDa y otra más en 36 kDa, las cuales están encerradas en los cuadros blancos, mismas que fueron procesadas para espectrometría de masas

para su identificación. De esas tres bandas la que fue detectada mediante Western blot con el anticuerpo contra la cinasa fue únicamente la de 80 kDa (Figura 33).

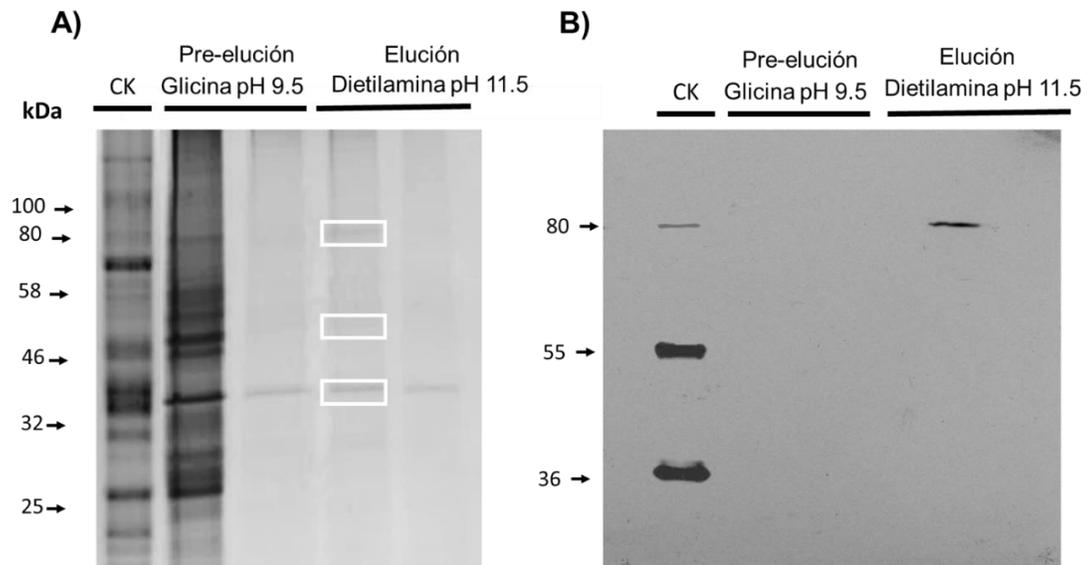


Figura 33. Separación electroforética de la AGC cinasa purificada y su detección por Western blot. A) Corresponde a los geles de PAGE-SDS de las fracciones obtenidas después de la cromatografía de afinidad con el Ac anti-TgAGC cinasa. La molécula purificada mediante columna de afinidad (fracción 8-10) se precipitó con metanol-cloroformo, se separó electroforéticamente y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se reveló por quimioluminiscencia. Los recuadros blancos indican las bandas que se cortaron y se procesaron para espectrometría de masas. El inserto B) corresponde al Western blot con el anti TgAGC cinasa en la fracción de citoesqueleto (CK). en el lavado o pre-elución a pH 9.5 y en las fracciones eluidas a pH 11.5. n=2

Análisis del purificado mediante cromatografía de afinidad de citoesqueleto mediante espectrometría de masas

Con el fin de identificar y caracterizar la cinasa apical de *Toxoplasma gondii*, se purificó 1 mg de anticuerpo monoclonal mediante cromatografía de afinidad con perlas de sepharose acopladas a proteína A. Los anticuerpos monoclonales purificados se conjugaron a sepharose 4B activada y se realizó una cromatografía de afinidad. Se hizo pasar el antígeno por la columna, después de una serie de lavados con PBS se hizo la elución de antígeno a pH 11.5 para su posterior detección mediante electroforesis en gel y Western blot, la única banda obtenida (80 kDa) mediante Western Blot se procesó para espectrometría de masas, la proteína encontrada mediante esta herramienta se representa en la Figura 34.

En el eluido de la columna de afinidad se encontraron 92 proteínas las cuales fueron alineadas en contra de la AGC cinasa y del péptido B7, para así encontrar aquella que cumpliera con los parámetros establecidos para su identificación, es decir que tuviera un porcentaje alto de identidad con la AGC cinasa y que además presentará el epítipo completo de 14 aminoácidos. En la tabla 5 se presentan todas las proteínas de esta banda que presentaron al menos 5 aminoácidos de identidad mediante BLAST con el epítipo.

A todas las proteínas putativas, hipotéticas y las reportadas que se encontraron en los complejos moleculares de inmunoprecipitación, así como de la cromatografía de afinidad, se realizó el análisis en detalle mediante BLAST de todas las cinasas encontradas en la banda de 36, 55 y 80 kDa. En la tabla 6 se muestran algunas proteínas que aunque no tengan relación con mi cinasa apical presentan al menos 5 aminoácidos en alineaciones de aminoácidos continuos o discontinuos de los 14 que representa el epítipo completo.

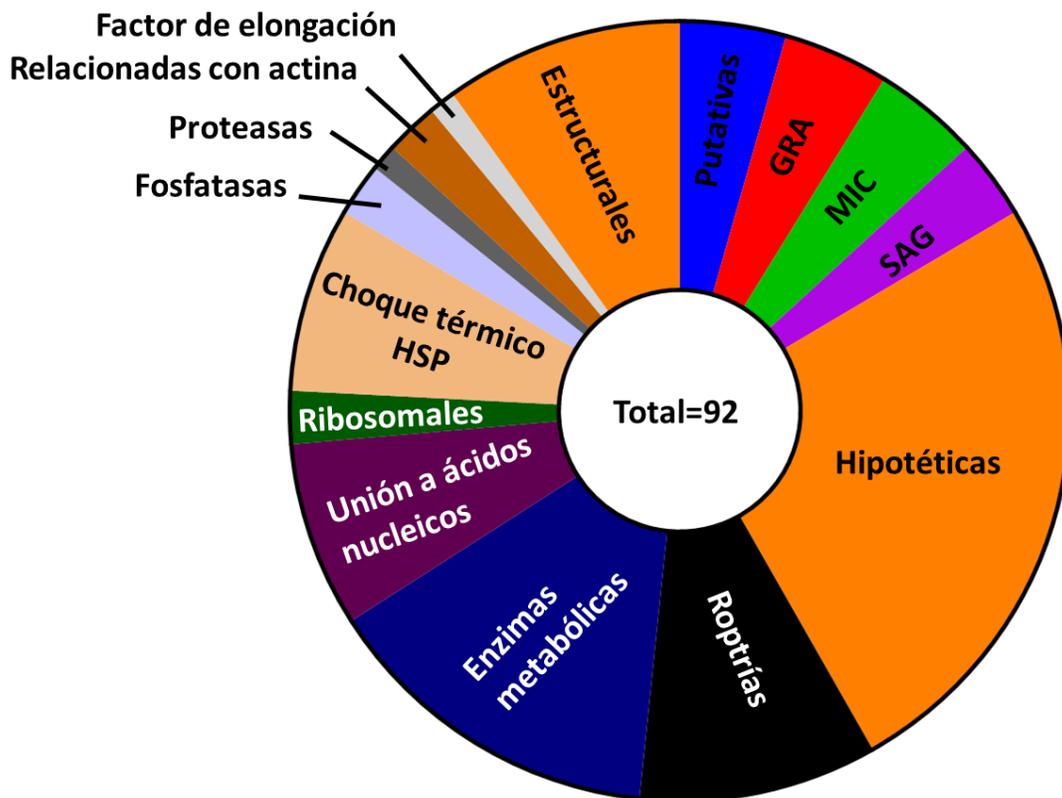


Figura 34: Clasificación de las 92 proteínas encontradas en el purificado mediante cromatografía de afinidad.

Proteína	ID de ToxoDB	Función	Identidad AGC cinasa (C, cobertura; I, identidad)	Identidad Péptido B7 (C, cobertura; I, identidad)	Peso molecular (kDa)
GAP45	TGME49_223940	Estructural	4 % C	5/14 continuo	27
			50 % I		
Actina ACT1	TGME49_209030	Citoesqueleto	7 % C	4/14 discontinuo	41
			28 % I		
Proteína hipotética	TGME49_244530	No determinado	10 % C	4/14 discontinuo	63
			38 % I		
emp24/gp25L/p24 family protein	TGME49_310750		7 % C	5/14 discontinuo	64
			30 % I		
Proteína hipotética	TGME49_220510	No determinado	9 % C	6/14 discontinuo	65
			48 % I		
Proteína hipotética	TGME49_212300	No determinado	4 % C	5/14 discontinuo	75
			30 % I		
Proteína hipotética	TGME49_249990	No determinado	5 % C	4/14 discontinuo	92
			30 % I		
Proteína hipotética	TGME49_269690	No determinado	9 % C	4/14 discontinuo	94
			32 % I		
Proteína hipotética	TGME49_309600	No determinado	18 % C	5/14 discontinuo	106
			44 % I		

Tabla 5: Proteínas en el purificado mediante cromatografía de afinidad que presentan similitud con el epítipo. Se hizo el análisis mediante BLAST a las proteínas encontradas mediante espectrometría de masas, los resultados se muestran en porcentaje de cobertura e identidad con la AGC cinasa y el péptido (epítipo) así como su peso molecular.

Nombre de la proteína	Código Toxodb	Peso molecular (kDa)	Función
CDC48CY	TGME49_273090	89	Ciclo celular
Hipotética	TGME49_216060	84	No determinada
FHA domain-containing protein	TGME49_267600	84	Proteína reguladora
alpha tubulin TUBA1	TGME49_316400	50	Formadora de microtúbulos
formate/nitrite transporter protein	TGME49_209800	47	Forma canales selectivos de membrana selectivos para nitritos y hidrosulfuro.
GAP45	TGME49_223940	31	Contribuye a la motilidad del parásito al ser parte del glideosoma
translation initiation factor 3 subunit protein coding	TGME49_294670	32	Factor de iniciación de la traducción

Tabla 6: Proteínas en el citoesqueleto de *Toxoplasma gondii* que comparte similitud con el epítipo de 14 aminoácidos. Se hizo el análisis mediante BLAST a las proteínas encontradas mediante espectrometría de masas, se muestra su función, así como su peso molecular.

Discusión

Toxoplasma gondii es un parásito oportunista importante que infecta a casi todos los animales de sangre caliente, causando enfermedades neurológicas y oculares congénitas, especialmente en seres humanos inmunocomprometidos. Los fármacos terapéuticos disponibles son hipersensibles y tóxicos, y no hay vacuna disponible para bloquear la transmisión de este parásito. Por lo tanto, se necesitan con urgencia medicamentos más seguros y eficaces para tratar la toxoplasmosis.

Las proteínas cinasas en *T. gondii* son esenciales para la perpetuación de su especie ya que están implicadas en procesos como invasión, proliferación, diferenciación y patogénesis.

En estudios realizados en nuestro laboratorio por González del Carmen y colaboradores demostró que el tratamiento con inhibidores específicos a PKC BIM I y Gö6983 se disminuye tanto la capacidad para extruir el conoide y su invasividad (Del Carmen et al. 2009), además utilizando anticuerpo dirigidos contra PKC humana, se determinó por Western blot la presencia de una proteína tipo PKC en *T. gondii*. La búsqueda de dicha PKC en *Toxoplasma* utilizando herramientas bioinformáticas, no arrojó una PKC convencional con similitud de secuencia y estructural a la descrita para las PKC de mamífero. En contraste se encontró una AGC cinasa en el genoma del parásito. No se descarta la posibilidad de que el genoma de *T. gondii* no esté completamente anotado y por lo tanto exista una PKC en *Toxoplasma* con base en su sensibilidad a los inhibidores específicos como son el BIM i y Gö6983 en procesos como la extrusión del conoide.

No todos los protozoarios parásitos presentan proteínas cinasas del tipo PKC; en algunos protozoarios como *Leishmania* y *Entamoeba histolytica* se han identificado proteínas similares a PKC que intervienen en la regulación de Na-ATP asas, bombas de sodio localizadas en la membrana plasmática que se encargan de mantener una baja concentración de sodio intracelular, estas PKC se caracterizan por tener propiedades características de las PKC clásicas como sensibilidad a

esteres de phorbol, actividad *in vitro* sobre péptidos sintéticos e inhibición con fármacos como la calfostina C.

Los resultados de inhibición, invasión y proliferación con los inhibidores específicos para PKC y la aparente ausencia de una PKC en *Toxoplasma* sugiere que los sitios blancos de dichos inhibidores podrían ser otras cinasas como PKG, que pertenece a la familia de las AGC cinasas.

Con la finalidad de caracterizar la AGC cinasa de *Toxoplasma* fue importante generar anticuerpos monoclonales con afinidad y selectividad específica para la cinasa a fin de poder caracterizarla descartando posibles reacciones inespecíficas o cruzadas con otras moléculas. Para ello se eligió una secuencia peptídica que sólo estuviera presente en la molécula AGC cinasa de *Toxoplasma* pero no en otras moléculas descartando posibles reacciones inespecíficas o cruzadas con otras proteínas. Para ello se eligió una secuencia peptídica que sólo estuviera presente en la molécula de AGC cinasa de *Toxoplasma* pero no en otras proteínas. En el diseño de péptidos mediante métodos bioinformáticos se buscó que tuviera un epítipo altamente inmunogénico y además que estuviera accesible para el anticuerpo, además se le incluyeron MAPs (Multiple Antigen PEptides) que contribuyeron en su antigenicidad. Los anticuerpos generados sólo reconocieron por Western blot a la proteína de *Toxoplasma* pero no reconoció a proteínas presentes en la fracción de cerebro. De todas las clonas obtenidas se escogió la B7 ya que estaba creciendo con mayor facilidad y además mostraba un buen patrón de bandeo por Western blot. Dentro de las bandas reconocidas por Western blot encontramos la de 130, 80, 55 y 36 kDa, lo que sugiere: a) la existencia de varias proteínas que comparte el mismo epítipo, b) la molécula nativa de la Tgcinasa se procesa para dar lugar a bandas de menor peso molecular que además tuvieran el mismo epítipo, y c) que el anticuerpo fuera inespecífico. Para descartar esta última posibilidad se hizo el alineamiento (BLAST) del péptido (epítipo) que reconoce el anticuerpo. Este alineamiento se hizo en toda la base de NCBI, los resultados (Figura 21) mostraron que esa secuencia de 14 aminoácidos únicamente está en una sola proteína que corresponde a mi molécula de estudio,

quedando descartada que el epítipo completo (de 14 aminoácidos) se encuentre intacto en más proteínas; asimismo, para descartar la especificidad del anticuerpo se hizo el ensayo de bloquear el anticuerpo B7 con el péptido con el que se inmunizaron los ratones, se utilizaron 3 concentraciones de péptido (10, 30 y 50 ng/mL), como se muestra en la (figura 22) claramente se ve como disminuye la intensidad de las bandas de acuerdo al aumento de la concentración de péptido, esto quiere decir que las proteínas que reconoce el anticuerpo B7 son específicas ya que si fuera alguna interacción inespecífica (es decir que reconociera otra secuencia y no la deseada) las bandas no se verían afectadas, quedando así demostrado que el anticuerpo es específico.

Otra posibilidad es que las proteínas de alto peso molecular como la de 130 y 80 kDa se escindieran por alguna razón desconocida, dando lugar a las bandas de bajo peso molecular. Para descartar esta posibilidad, se separaron electroforéticamente fracciones de citoesqueleto aislado de *T. gondii*, en la figura 23 se puede observar que se siguen conservando las mismas bandas que cuando lo hacemos en condiciones reductoras lo que quiere decir que el anticuerpo B7 reconoce al menos 3 variantes de una proteína cinasa perteneciente a la familia AGC. En un primer intento de identificar y caracterizar la cinasa, se separó electroforéticamente el citoesqueleto aislado de *T. gondii*, se realizó Western Blot y se localizaron las bandas reconocidas por el anticuerpo α -AGC cinasa y se procesaron para espectrometría de masas. Aunque no fue posible encontrar una cinasa que se pareciera en secuencia a la AGC cinasa, si se encontraron varias cinasas de otra naturaleza, interesantemente también se encontraron proteínas que comparten al menos 4 aminoácidos del epítipo de 14 (TRRGDFSPREKREA, Tabla 6), sin embargo esto no indica que se trata de la molécula de nuestro interés, pero si representan moléculas a las cuales el anticuerpo podría reconocer en forma inespecífica, resultando en bandas adicionales detectadas por Western Blot, lo que explicaría porque tenemos bandas adicionales a las banda de 80 kDa.

Otro de los objetivos del presente proyecto fué analizar las proteínas con las cuales la cinasa apical está interactuando tal vez a través de la formación de

complejos moleculares. Para ello se realizó una inmunoprecipitación en condiciones no reductoras, en la figura 29 se muestra este resultado y como se puede observar, aparecieron bandas extras a las ya anterior observadas, esto podría deberse a los complejos que forma la AGC cinasa. Para su identificación, las bandas fueron cortadas y procesadas para su análisis e identificación mediante espectrometría de masas. En cuanto a las proteínas identificadas a partir del inmunoprecipitado de citoesqueleto utilizando el anticuerpo α -AGC cinasa, encontramos principalmente proteínas de las roptrías, citoesqueleto, además de los micronemos y relacionadas con actina (Figura 30), este resultado es muy interesante ya que como reportó Sánchez Barajas en su tesis de maestría la cinasa tiene una localización apical donde se encuentra el conoide, por lo cual la cinasa podría estar anclada al conoide que forma parte del citoesqueleto, esto explicaría porque en los resultados de Western Blot la AGC cinasa está enriquecida en la fracción de citoesqueleto. Al encontrar proteínas de roptrías sugeriría que posiblemente se encuentra asociada de alguna manera a este organelo apical. Además, y no menos importante, se encontraron proteínas relacionadas al sistema actina-miosina, aunque no se encontró miosina en el inmunoprecipitado si se encontró en el purificado por cromatografía de afinidad, esto indica que la extrusión del conoide es un evento que podría depender directamente del sistema actina-miosina en la cual podría estar implicada la AGC cinasa. En este sentido el generar la cepa Knock Out para esta cinasa nos permitiría determinar su verdadero papel en el proceso de motilidad y extrusión del conoide. A pesar de estos resultados no se encontró una cinasa con las características deseadas.

Otra forma de identificar la molécula es separándola mediante un gel bidimensional, para ello se separó 120 ug de proteína total de citoesqueleto de *T. gondii* de acuerdo a su punto isoelectrónico mediante isoelectroenfoque y posteriormente se separó por peso molecular. En la figura 31 se observa en el gel teñido por Coomassie (panel A). Los spots corresponden a proteínas individuales, en el panel B se muestra el Western blot correspondiente. En el Western blot se observa un spot en el peso molecular de 80 kDa, otro más en el peso de 55 kDa y

al menos 4 spots en el peso de 36 kDa, este resultado indica que las bandas observadas anteriormente no corresponden a proteínas únicas, o bien que están siendo modificadas de alguna manera. Las modificaciones postraduccionales más comunes son fosforilaciones, glicosilaciones, ubiquitinizaciones, nitrosilaciones, metilaciones, acetilaciones, lipidaciones y proteólisis, de todas ellas considero que las modificaciones de las proteínas alojadas en la banda de 36 kDa son fosforilaciones, en primer lugar porque solo se ve afectado el punto isoeléctrico y no el peso molecular, la segunda razón es porque las cinasas son activadas mediante fosforilaciones, por lo que podríamos estar hablando de diferentes niveles de activación.

Para la purificación de la cinasa se desarrolló una cromatografía de afinidad, utilizando perlas de sepharose 4B activadas acopladas al anticuerpo monoclonal B7. Los resultados mostraron tres bandas en los pesos de 80, 55 y 36 kDa, las cuales aparentemente corresponden a las proteínas purificadas. El análisis por Western blot con el AcMn B7 reconoció solo la banda de 80 kDa. Una posible explicación de los resultados referentes a la presencia de 3 moléculas en los ensayos de Western blot pero solo una molécula en el purificado por columna de afinidad es la siguiente: en los Western blot en los cuales se le pasa extracto total o citoesqueleto, el epítipo de 14 aminoácidos seleccionado para generar el anticuerpo, está presente íntegro y expuesto en la proteína TgAGC cinasa. Existe la posibilidad de que pequeñas secuencias de 4-6 aminoácidos de este péptido de 14 aminoácidos estén presentes en otras proteínas no relacionadas con la TgAGC cinasa y que incluso se encuentre localizada en una parte donde no está accesible en su forma nativa, es decir, podría estar presente en su interior donde no es accesible por el anticuerpo, pero cuando se separa electroforéticamente dicha proteína se lineariza y el epítipo se expone, quedando accesible a ser reconocido por el anticuerpo monoclonal B7. Es pertinente mencionar que el sitio de reconocimiento de un anticuerpo (parátipo) puede reconocer epítipos o secuencias desde 4-6 aminoácidos por lo que no es necesario tener los 14 aminoácidos del epítipo. Por otro lado cuando se pasan las proteínas de

citoesqueleto a través de la columna de afinidad, estas se encuentran en su forma nativa, uniéndose el anticuerpo a aquellos epítomos que únicamente estén expuesto en la proteína nativa, es decir, solo la TgAGC cinasa. Cuando se eluyó la columna únicamente se detectó la banda de 80 kDa, eliminadas por el lavado aquella proteína con baja afinidad y que corresponde al peso molecular de 36 y 55 kDa. En consecuencia es muy posible que las bandas de 36 y 55 kDa correspondan a proteínas no relacionadas a la TgAGC cinasa similar a la PKC alfa humana.

De acuerdo al análisis de las proteínas presentes en el purificado mediante cromatografía de afinidad se encontraron varias proteínas que comparten de 4-6 aminoácidos, de entre ellas está una proteína (código de ToxoDB; TGME49_212300) que tiene un peso de 75 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6.47, semejante al spot de 80 kDa observado en el gel bidimensional; sin embargo, el alineamiento no mostró una cobertura ni identidad significativo para afirmar que se trata de la molécula de estudio.

Considero que la razón por la cual no se pudo detectar o aislar a la cinasa de nuestro interés pudo deberse a que algunos residuos del epítomo se encuentra parcialmente presente en muchas más proteínas en *Toxoplasma gondii*, además de la proteína de estudio. Estas proteínas al momento de hacer una inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad por su abundancia podrían competir con la AGC cinasa por el anticuerpo α -AGC ocupando los sitios de reconocimiento de los anticuerpos impidiendo o empobreciendo su purificación e impidiendo su posterior detección mediante espectrometría de masas. Además, como se ha visto por inmunofluorescencia únicamente se encuentra en la zona del conoide por lo que el número de proteínas es minoritario complicando aún más su detección. Además de que las proteínas con el epítomo parcial podrían ocupar el sitio activo del anticuerpo, ellas también podrían interactuar al mismo tiempo con otras proteínas formando complejos, limitando aún más el inmunoprecipitado o el purificado por cromatografía de afinidad.

Es importante continuar con el estudio de esta cinasa, ya que como se ha visto anteriormente, todo indica que está implicada en la regulación de la extrusión del conoide que como se sabe, es un evento crucial para la invasión, por lo que en un futuro el diseño de un Knock Out, purificación y la generación de la proteína recombinante ayudaría a entender con mucha más claridad su función específica en *Toxoplasma*. La cristalización de dicha molécula permitiría conocer su estructura real y determinar las moléculas con las que interacciona, además de que por su existencia única solo en *Toxoplasma* pero no en la célula hospedera, sería una blanco para el diseño de un fármaco para combatir la Toxoplasmosis en humanos y a nivel veterinario.

Como parte final de este proyecto fueron analizadas mediante espectrometría de masas tanto las bandas del inmunoprecipitado y el purificado mediante cromatografía de afinidad, aunque los resultados son prometedores se necesitan corroborarse mediante otras técnicas de purificación.

Conclusiones

- *Toxoplasma gondii* presenta en su genoma un cinasa tipo PKC perteneciente a la familia AGC. Presenta el dominio cinasa conservado. Según el estudio bioinformático tiene cuatro sitios de fosforilación, que coinciden con los 4 spots encontrados en el bidimensional.
- La AGC cinasa está presente en extractos totales de *Toxoplasma gondii* y se encuentra enriquecida en la fracción de citoesqueleto de taquizoítos.
- Mediante inmunoprecipitación e identificación por espectrometría de masas se determinó que la AGC cinasa está asociada principalmente con proteínas de citoesqueleto, relacionadas con actina, de las roptrías y de los micronemos. Dicho resultado apoya la teoría que la AGC cinasa está anclada al citoesqueleto y explica porque la cinasa se encuentra enriquecida en la fracción del citoesqueleto.
- En el inmunoprecipitado se identificó proteínas relacionadas a actina como la miosina. Dado que la extrusión del conoide depende del sistema actina-miosina es posible que la cinasa tenga una participación directa sobre este proceso dinámico.
- Se logró purificar la AGC mediante cromatografía de afinidad; sin embargo, no se logró obtener la identidad de dicha molécula mediante espectrometría de masas.

Perspectivas

- Emplear otros métodos de purificación como el sistema Rotofor para obtener la molécula con mayor pureza, facilitándose así su detección por espectrometría de masas.
- Una vez que se tenga la molécula purificada evaluar su actividad *in vitro*, para hacer su caracterización bioquímica (fosforilaciones, sustratos, cofactores, pH óptimo, inhibidores).
- Por otro lado, una vez que se tenga la molécula purificada hacer el cristal para conocer su estructura tridimensional y facilitar el estudio de sus interacciones con otras moléculas, así como con fármacos.
- Una vez que esté completamente caracterizada hacer el *knock-out* para determinar su función específica en *Toxoplasma gondii*.

REFERENCIAS

- Arrizabalaga, G. & Boothroyd, J.C., 2004. Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *International Journal for Parasitology*, 34(3), pp.361–368.
- Berta, S.B., 2012. *Caracterización de una cinasa S6 de Toxoplasma gondii y proteínas asociadas así como su papel en la motilidad, extrusión del conoide, invasión y proliferación intracelular*. Cinvestav, IPN.
- Billker, O., Lourido, S. & Sibley, L.D., 2009. Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites. *Cell Host and Microbe*, 5(6), pp.612–622. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.017>.
- Black, M.W. & Boothroyd, J.C., 2000. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), pp.607–623. Available at: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>.
- Butcher, B.A. et al., 2011. *Toxoplasma gondii* rho-trypanin kinase rop16 activates stat3 and stat6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathogens*, 7(9).
- Caldas, L.A. et al., 2013. The effect of kinase, actin, myosin and dynamin inhibitors on host cell egress by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology International*, 62(5), pp.475–482.
- Calil, K.F., 1981. Toxoplasmosis. *Infectologia*, 2, pp.119–133.
- Del Carmen, M.G. et al., 2009. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 11(6), pp.967–982.
- Carruthers, V.B. & Sibley, L.D., 1999. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, 31(2), pp.421–428.

- Castrejon, O. Velasco., Izaba, B. Salvatierra., Gomez, J.L. Valdespino., Lara, A.M. Sedano., Virgen, S.& G., 1992. Seroepidemiologia de la toxoplasmosis en México. *Rev Salud Pub Mex.*, 34, pp.222–229.
- Cérède, O. et al., 2002. The toxoplasma gondii protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO Journal*, 21(11), pp.2526–2536.
- Donald, R.G.K. et al., 2006. Anticoccidial kinase inhibitors: Identification of protein kinase targets secondary to cGMP-dependent protein kinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(1), pp.86–98.
- Dubey, J.P., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. In *International Journal for Parasitology*. pp. 1019–1024.
- Dubey, J.P., 1994. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205, pp.1593–8.
- Dubremetz, J.F. et al., 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. In *International Journal for Parasitology*. pp. 1007–1013.
- Dubremetz, J.F., 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology*, 9(4), pp.841–848.
- Egarter, S. et al., 2014. The toxoplasma acto-myosin motor complex is important but not essential for gliding motility and host cell invasion. *PLoS ONE*, 9(3).
- Ferguson, D.J.P., 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*, 34(3), pp.347–360.
- Ferguson DJ, H.W., 1987. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 39(1), pp.39–43.
- Fourmaux, M.N. et al., 1996. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii*

contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface.
Molecular and Biochemical Parasitology, 83(2), pp.201–210.

Foussard, F. et al., 1990. Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. *Parasitol Res*, 76(7), pp.563–565.

Frenkel, J.K., Dubey, J.P. & Miller, N.L., 1970. *Toxoplasma gondii* in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts. *Science*, 168(3929), pp.353–353.
Available at:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.168.3929.353-a>.

El Hajj, H. et al., 2007. Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptyry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cellular Microbiology*, 9(1), pp.54–64.

Hanks, S.K. & Hunter, T., 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(8), pp.576–96.

Harper, J.F. & Harmon, A., 2005. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(7), pp.555–66.

Haverkos, H.W., 1987. Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. The TE study group. *The American Journal of Medicine*, 82(5), pp.907–914.

Hill, D. & Dubey, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(10), pp.634–640.

Hitomi Kurokawa, Kentaro Kato , Tatsuya Iwanaga, Tatsuki Sugi, Atsushi Sudo, Kyousuke Kobayashi, Haiyan Gong, Hitoshi Takemae, Frances C. Recuenco, Taisuke Horimoto, H.A., 2011. Identification of *Toxoplasma gondii* cAMP

- Dependent Protein Kinase and Its Role in the Tachyzoite Growth. *PLOS one*, 6.
- Hu, K. et al., 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine - The apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 2(2), pp.0121–0138.
- Innes, E.A., 2010. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), pp.1–7.
- Joynson, D. H. M. & Wreghitt, T.G., 2001. Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide. *Cambridge University Press*.
- Khan, F. et al., 2002. Cyclin-dependent kinase TPK2 is a critical cell cycle regulator in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, 45(2), pp.321–332.
- Kieschnick, H. et al., 2001. *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 276(15), pp.12369–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154702>.
- Knockaert, M. et al., 2000. Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: Identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chemistry and Biology*, 7(6), pp.411–422.
- Leriche, M.A. & 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), pp.249–259.
- Lin, G.G. & Scott, J.G., 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*, 100(2), pp.130–134.
- Mann, T. & Beckers, C., 2001. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(2), pp.257–268.

- Markus Meissner, Matthias Reiss, Nicola Viebig, Vern B. Carruthers, Catherine Tounsel, Stanislas Tomavo, James W. Ajioka, D.S., 2002. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. *Journal of Cell Science*, 115, pp.563–574.
- Markus Meissner, Matthias Reiss, Nicola Viebig, V.B. Carruthers et al., 2002. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. *Journal of Cell Science*, 115, pp.563–574.
- McFadden, D.C., Camps, M. & Boothroyd, J.C., 2001. Resistance as a tool in the study of old and new drug targets in *Toxoplasma*. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 4(2), pp.79–84.
- Miranda-Saavedra, D. et al., 2012. The kinomes of apicomplexan parasites. *Microbes and Infection*, 14(10), pp.796–810.
- Mondragon, R. & Frixione, E., 1996. Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 43(2), pp.120–127. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04491.x/abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720941>.
- Monteiro, V.G. et al., 2001. Morphological changes during conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites treated with calcium ionophore. *Journal of structural biology*, 136(3), pp.181–9.
- Moran, J.M., Smith, S.S. & Hager, K.M., 2007. *Toxoplasma gondii* possesses a receptor for activated C kinase ortholog. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), pp.680–686.
- Mordue, D.G. et al., 1999. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids

- fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental parasitology*, 92, pp.87–99.
- Moreno, S.N.J. & Docampo, R., 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), pp.359–364.
- Morrisette, N.S. & Sibley, L.D., 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66(1), p.21–38; table of contents. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=120781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nichols, B.A. & Chiappino, M.L., 1987. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of protozoology*, 34(2), pp.217–26. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3585817>.
- Nichols, B.A. & Chiappino, M.L., 1987. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Protozoology*, 34(2), pp.217–226.
- Nichols BA, O.G., 1981. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *laboratory investigation a journal of technical methods and pathology*, 44(4), pp.324–335.
- Ong, Y.C., Reese, M.L. & Boothroyd, J.C., 2010. *Toxoplasma* Rhopty Protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *Journal of Biological Chemistry*, 285(37), pp.28731–28740.
- Patrón S, A. et al., 2005. Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, 35(8), pp.883–894.
- Saffer, L.D. et al., 1992. Localization of a *Toxoplasma gondii* Rhopty Protein by Immunoelectron Microscopy During and After Host Cell Penetration. *The Journal of Protozoology*, 39(4), pp.526–530.

- Shaw, M.K., Roos, D.S. & Tilney, L.G., 1998. Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 117 (Pt 5, pp.435–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9836308>.
- Sibley, L.D. et al., 1995. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science*, 108 (Pt 4, pp.1669–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615684>.
- Sibley, L.D., Weidner, E. & Krahenbuhl, J.L., 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 315(6018), pp.416–9.
- Sinai, A.P. & Joiner, K.A., 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *Journal of Cell Biology*, 154(1), pp.95–108.
- Song, H.-O. et al., 2004. Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*. *The Korean journal of parasitology*, 42(4), pp.185–93.
- Sugi, T. et al., 2009. Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3. *Parasitology International*, 58(4), pp.416–423.
- Taylor, S.S. et al., 1988. cAMP-dependent protein kinase: A framework for a diverse family of enzymes. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. pp. 121–130.
- Wei, F., Wang, W. & Liu, Q., 2013. Protein kinases of *Toxoplasma gondii*: Functions and drug targets. *Parasitology Research*, 112(6), pp.2121–2129.
- Weiss, L.M., & Kim, K., 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*, 5, pp.391–405.
- Yamamoto, M. et al., 2009. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma*

gondii kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *The Journal of experimental medicine*, 206(12), pp.2747–60.

Zhu, W.N. et al., 2017. Evaluation of protective immunity induced by DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* GRA17 and GRA23 against acute toxoplasmosis in mice. *Experimental Parasitology*, 179, pp.20–27.