



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Expresión diferencial y caracterización de proteasas de  
taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* aislados de  
un modelo murino y de cultivo celular”**

**TESIS**

**Que presenta**

**Biol. CARLOS JORGE RAMÍREZ FLORES**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA**

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

**México, D.F.**

**Agosto 2015**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio No. 16: Bioquímica Celular de Patógenos Intracelulares, en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) unidad Zacatenco, bajo el apoyo del proyecto de CONACyT No. 155459 a cargo del Dr. Ricardo Mondragón Flores.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca crédito otorgada de Agosto del 2013 a Agosto del 2015, con número de registro 556775.

## **Agradecimientos**

Agradezco 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.

Agradezco a mis asesores la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** y el **Dr. Guillermo Ávila Flores**; por su tiempo, comentarios e ideas que permitieron enriquecer este trabajo.

Agradezco a la **Q.F.B. Mónica Edith Mondragón Castelán**, auxiliar de investigación, por su apoyo y asistencia técnica proporcionada durante la realización de este trabajo.

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

Agradezco a la **M. en C. Tais Nopal Guerrero** por brindarme las bases de este trabajo.

Agradezco a la **M. en C. Kitzia Nohemí Castro Elizalde**, a la **M. en C. Carmen T. Gómez de León** y al **M. en C. Rubén Darío Díaz Martín**, por su asistencia y conocimiento proporcionado durante el desarrollo de diferentes técnicas.

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.

Agradezco y dedico este logro a mis padres: **Tecilli del Rosario Flores** y **Jorge Ramírez Soriano**, quienes día a día me han enseñado a ser una mejor persona, incluso lejos de casa. Gracias a ellos alcanzo una meta más en mi desarrollo profesional. Por su amor y apoyo incondicionales.

A mi hermano **Jesús Tadeo Ramírez Flores**, que como hermano mayor me ha sabido guiar y dar consejos.

A mi abuelita **Juana Flores**, por ser una fortaleza más en mi vida. A mis tíos **Benedicta Flores** y **Benito Flores** por apoyarme siempre en todos los aspectos, por ser dos pilares más.

A **Mariana Caso**, por permitirme ser parte de su vida y compartir este logro juntos. Por su amor, comprensión y apoyarme en todo momento.

A mis **viejos amigos**, por estar siempre presentes. A mis **nuevos amigos**, por su apoyo desde el inicio de la maestría; solamente nosotros sabemos lo que cuesta llegar hasta este punto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: **Alexandra, Carmen, Claudio, Francisco, Kitzia, Mónica, Rosalba y Rubén**, una familia más. Con quienes compartí cada experimento, cada éxito y fracaso.

Agradezco nuevamente a **CONACyT**, por brindarme el apoyo para continuar cumpliendo mis metas profesionales.

No tengo palabras para hacer mención a todos los ratones que se hacen presentes en cada hoja de esta tesis. Espero que las conclusiones de este trabajo contribuyan para que, algún día, se elimine la necesidad de sacrificar animales en búsqueda de la comprensión de la condición humana.

# Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>XII</b>
<b>Resumen</b>	<b>XV</b>
<b>Abstract</b>	<b>XVI</b>
<b>1.0 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2.0 Generalidades</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Taxonomía</i>	<b>3</b>
2.2 <i>Ciclo de vida</i>	<b>3</b>
2.3 <i>Formas parasitarias de Toxoplasma gondii</i>	<b>7</b>
2.3.1 Taquizoíto	<b>7</b>
2.3.2 Bradizoíto	<b>8</b>
2.3.3 Esporozoítos	<b>8</b>
2.4 <i>Invasión</i>	<b>9</b>
2.5 <i>Morfología</i>	<b>11</b>
2.5.1 Citoesqueleto	<b>11</b>
2.5.2 Películo	<b>11</b>
2.5.3 Complejo apical	<b>12</b>
2.5.4 Conoide	<b>12</b>
2.5.6 Anillo polar	<b>13</b>
2.5.7 Organelos secretores	<b>13</b>
2.5.7.1 Micronemos	<b>13</b>
2.5.7.2 Roptrías	<b>14</b>
2.5.7.3 Gránulos densos	<b>15</b>
2.6 <i>Diseminación y virulencia de Toxoplasma gondii</i>	<b>17</b>
2.6.1 El genotipo de <i>Toxoplasma gondii</i> y su patogenicidad	<b>20</b>
2.7 <i>Proteasas</i>	<b>21</b>
2.7.1 Serina proteasas	<b>22</b>
2.7.2 Cisteína proteasas	<b>22</b>
2.7.3 Aspártico proteasas	<b>23</b>

2.7.4 Metaloproteasas	23
2.8. <i>La matriz extracelular</i>	25
2.9. <i>Proteasas en procesos de diseminación: degradación de la matriz extracelular</i>	26
2.9.1. Papel de proteasas en protozoarios extracelulares	27
2.9.2 Papel de proteasas en protozoarios intracelulares	30
2.10 <i>Proteasas presentes en los productos de excreción/secreción de parásitos</i>	34
2.11 <i>Zimografía como técnica de detección de proteasas</i>	34
<b>3.0 Antecedentes directos</b>	<b>36</b>
<b>4.0 Justificación</b>	<b>40</b>
<b>5.0 Hipótesis</b>	<b>41</b>
<b>6.0 Objetivos</b>	<b>41</b>
6.1 <i>Objetivo general</i>	41
6.2 <i>Objetivos particulares</i>	41
<b>7.0 Metodología</b>	<b>42</b>
7.1 <i>Cultivo celular</i>	42
7.2 <i>Animales</i>	42
7.3 <i>Parásitos</i>	42
7.4 <i>Cuantificación de proteínas por el método de Bradford</i>	44
7.5 <i>Precipitación de proteína por el método de Metanol-Cloroformo</i>	44
7.6 <i>Determinación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano</i>	44
7.7 <i>Preparación de extractos totales de taquizoitos</i>	44
7.8 <i>Obtención de proteínas de excreción/secreción</i>	45
7.9 <i>Tinción con azul de Coomassie</i>	45
7.10 <i>Tinción con nitrato de plata</i>	46
7.11 <i>Protocolo de fijación de parásitos con glutaraldehído al 1%</i>	46
7.12 <i>Tripsina grado espectrometría de masas como control positivo</i>	46
7.13 <i>Electroforesis 1-D</i>	46

7.14 Densitometría	47
7.15 Análisis estadístico	47
7.16 Zimografía 1-D en gelatina	47
7.17 Inhibición de proteasas en zimografía	48
7.18 Análisis de Western Blot	48
7.19 Electroforesis 2-D	49
7.20 Zimografía 2-D en gelatina	50
7.21 Inhibición de proteasas en zimografía 2-D	50
<b>8.0 Resultados</b>	<b>51</b>
8.1 Detección del perfil proteolítico de extractos totales de taquizoitos en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina	51
8.2 Detección del perfil proteolítico de extractos totales de taquizoitos en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina bajo condiciones óptimas	58
8.3 Las proteasas detectadas provienen exclusivamente de <i>Toxoplasma gondii</i>	60
8.4. Identificación de las proteasas presentes en extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante el uso de inhibidores específicos	62
8.5 Proteasas presentes en los productos de excreción/secreción de taquizoitos de la cepa RH aislados de ratón	66
8.6 Proteasas presentes en los extractos totales de taquizoitos de la cepa RH mantenidos en cultivo celular	72
8.7 Productos de excreción/secreción de taquizoitos de la cepa RH aislados de cultivo celular	73
8.8 Disminución consecutiva de la expresión de proteasas de taquizoitos aislados de ratón e ingresados a cultivo celular a diferentes pases	77
8.9 Retorno de la actividad proteolítica en los taquizoitos mantenidos en cultivo celular y reingresados a ratón	80
8.10 Análisis bioinformático de metaloproteasas en <i>Toxoplasma gondii</i>	82
8.11 Comparación de extractos totales de taquizoitos aislados de los	



<i>sistemas in vivo e in vitro mediante geles bidimensionales</i>	<b>85</b>
8.12 <i>Detección de la actividad proteolítica de extractos totales de taquizoitos de aislados de ratón y cultivo celular mediante zimografía 2-D</i>	<b>88</b>
<b>9.0 Discusión</b>	<b>92</b>
<b>10.0 Conclusiones</b>	<b>100</b>
<b>11.0 Perspectivas</b>	<b>101</b>
<b>12.0 Anexo I. Resultados complementarios</b>	<b>102</b>
12.1 <i>Elección del número de taquizoitos para el extracto total</i>	<b>102</b>
12.2 <i>Elección de la cantidad de Tripsina a utilizar como control positivo</i>	<b>103</b>
12.3 <i>Elección del número de taquizoitos para evaluar las proteínas de excreción/secreción</i>	<b>104</b>
12.4 <i>Control de actividad proteolítica en presencia de los disolventes de los inhibidores empleados</i>	<b>105</b>
<b>13.0 Anexo II. Materiales, reactivos y anticuerpos</b>	<b>106</b>
13.1 <i>Materiales y reactivos</i>	<b>106</b>
13.2 <i>Anticuerpos</i>	<b>107</b>
<b>14.0 Bibliografía</b>	<b>108</b>

## Índice de figuras y gráficas

<b>Figura 01.</b> Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .	6
<b>Figura 02.</b> Esquema de la estructura de un taquizoíto y un bradizoíto, reconstruida de micrografías electrónicas.	9
<b>Figura 03.</b> Mecanismo de invasión activa de <i>Toxoplasma gondii</i> .	10
<b>Figura 04.</b> Morfología del taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> .	16
<b>Figura 05.</b> Migración de <i>Toxoplasma gondii</i> a través de barreras biológicas.	19
<b>Figura 06.</b> Esquema del mecanismo proteolítico de las cuatro familias de proteasas.	25
<b>Figura 07.</b> Proteasas de parásitos extracelulares y su participación en la degradación de la matriz extracelular.	30
<b>Figura 08.</b> Proteasas de parásitos intracelulares y su participación en la degradación de la matriz extracelular.	32
<b>Figura 09.</b> Zimograma en gelatina.	37
<b>Figura 10.</b> Invasión celular por taquizoítos pre-tratados con inhibidores de proteasas.	38
<b>Figura 11.</b> Zimograma en colágena I/III.	39
<b>Figura 12.</b> Perfil proteolítico de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) por activación a diferentes pH.	52
<b>Figura 13.</b> Perfil proteolítico de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) a pH 5.5 en presencia de diferentes cofactores o agente reductor.	55
<b>Figura 14.</b> Perfil proteolítico de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) a pH 7.5 en presencia de diferentes cofactores.	56
<b>Figura 15.</b> Perfil proteolítico de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) a pH 7.5 en presencia de diferentes cofactores.	57
<b>Figura 16.</b> Perfil proteolítico de extractos totales <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) en condiciones óptimas.	58
<b>Figura 17.</b> Curso temporal de actividad proteolítica exhibida en extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH).	60

<b>Figura 18.</b> Las proteasas detectadas son exclusivas de <i>Toxoplasma gondii</i> .	62
<b>Figura 19.</b> Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH).	64
<b>Figura 20.</b> Perfil proteolítico de proteasas presentes en los productos de excreción/secreción de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH).	68
<b>Figura 21.</b> Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de los productos de excreción/secreción de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH).	71
<b>Figura 22.</b> Comparación del perfil proteolítico de extractos totales <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) aislados de ratón y cultivo celular.	73
<b>Figura 23.</b> Ausencia de proteólisis en los productos de excreción/secreción de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH).	75
<b>Figura 24.</b> Inmunodetección de proteínas presentes en los productos de excreción/secreción de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) aislados de ratón y cultivo celular a través del tiempo	77
<b>Figura 25.</b> Perfil proteolítico en curso temporal de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) en diferentes pases de cultivo celular.	79
<b>Figura 26.</b> Retorno de la expresión de proteasas en taquizoítos aislados de cultivo celular y reingresados a ratón.	81
<b>Figura 27.</b> Análisis bioinformático de metaloproteasas presentes en el genoma de <i>Toxoplasma gondii</i> .	83
<b>Figura 28 parte 1.</b> Análisis bioinformático de metaloproteasas presentes en el genoma de <i>Toxoplasma gondii</i> .	84
<b>Figura 28 parte 2.</b> Análisis bioinformático de metaloproteasas presentes en el genoma de <i>Toxoplasma gondii</i> .	85
<b>Figura 29.</b> Comparación del perfil de proteínas de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> aislados de ratón y cultivo celular.	87
<b>Figura 30.</b> Perfil proteolítico por zimografía 2-D de extracto total de <i>Toxoplasma gondii</i> aislados de ratón.	90
<b>Figura 31.</b> Perfil proteolítico por zimografía 2-D de extracto total de	

<i>Toxoplasma gondii</i> aislados de cultivo celular.	91
<b>Figura 32.</b> Perfil proteolítico del extracto total de diferentes número de parásitos.	102
<b>Figura 33.</b> Perfil proteolítico de diferentes cantidades de Tripsina grado espectrometría de masas.	103
<b>Figura 34.</b> Perfil proteolítico de productos de excreción/secreción de diferentes número de parásitos.	104
<b>Figura 35.</b> Efecto de disolventes de los inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH).	105
<b>Gráfica 1.</b> Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de extractos totales de <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) medido mediante densitometría	65
<b>Gráfica 2.</b> Secreción de proteasas de forma constitutiva a diferentes tiempos medido mediante densitometría.	69
<b>Gráfica 3.</b> Recuperación de la expresión de proteasas de taquizoítos aislados de cultivo celular por reingreso al ratón medido mediante densitometría.	82

## Abreviaturas

°C	Grados centigrados
2-D	Segunda dimensión
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata
AP	Aspártico proteasas
APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina sérica bovina
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	Acetato de sodio
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácido cítrico
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CP	Cisteína proteasas
DTT	Ditiotreitol
E64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino) butano
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ET	Extracto total
Fij	Fijados
h	Hora
HEp-2	Carcinoma epidermoide humano cepa-2
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IAA	Iodoacetamida
IEF	Isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferón gamma
KCl	Cloruro de potasio
kDa	kiloDaltones
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
M	Molar
mA	miliAmperios
MEC	Matriz extracelular

MEM	Medio mínimo esencial
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ml	Militros
mm	Milímetros
mM	miliMolar
MMP	Metaloproteasas de la matriz extracelular
MP	Metaloproteasas
mV	miliVolts
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio dibásico
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Tiosulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
PES	Penicilina-Estreptomicina
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
Rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SFB	Suero fetal bovino
SP	Serina proteasas
TA	Temperatura ambiente
TBST	Solución amortiguador de Tris base con Tween al 0.1%
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamina
TLCK	N- $\alpha$ -p-Tosil-L-lisina clorometil cetona
TPCK	N-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
V	Volts
Vh	Volts/hora
VP	Vacuola parasitófora

ZnCl <sub>2</sub>	Cloruro de zinc
μl	Microlitros
μM	microMolar
μg	microgramos

## Resumen

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un protozooario cosmopolita que tiene la capacidad de infectar básicamente a todas las células nucleadas de los organismos de sangre caliente. *T. gondii* logra difundirse por todo el organismo y puede atravesar las barreras biológicas tales como: el intestino, la barrera hematoencefálica y la placentaria. Hasta la fecha, se desconocen los mecanismos que presenta el parásito para llevar a cabo este proceso. Sin embargo, en nuestro laboratorio pensamos que las proteasas pudieran jugar un papel importante como factor efector de virulencia, y pudieran estar involucradas en el proceso de diseminación del parásito.

Utilizando como fuente de toxoplasmosis un modelo murino, encontramos las condiciones ideales para la detección de proteasas presentes en extractos totales (ET) de taquizoitos de *T. gondii* de la cepa RH (altamente virulenta), mediante el uso de zimografía en gelatina. Encontramos al menos nueve proteasas con capacidad de degradar gelatina, que van en un rango de 50 kDa y hasta 290 kDa, todas sensibles a quelantes de metales como EGTA y 1, 10 fenantrolina, lo cual nos indicó que se trata de metaloproteasas, mismas que no se encuentran reportadas para la cepa RH de *T. gondii*, ni se encuentran reportadas para el genoma del parásito. Adicionalmente, detectamos el contenido de proteasas en los productos de excreción/secreción (E/S) constitutivos del parásito, encontrando al menos cinco proteasas sensibles a EGTA y 1, 10 fenantrolina.

Bajo las condiciones ideales empleadas, analizamos el contenido de proteasas de ET y E/S de taquizoitos aislados de un modelo *in vitro* de toxoplasmosis; encontramos una expresión disminuida de todas las proteasas presentes en los parásitos aislados del modelo *in vivo*. Esta actividad se recuperó totalmente al reingresar a los parásitos al modelo *in vivo*. Posiblemente, la expresión diferencial de estas proteasas se deba a una adaptación del parásito al cultivo celular, al carecer de moléculas inductoras como componentes de matriz extracelular, factores del complemento y respuesta inmune, el parásito pierde la capacidad de expresar las proteasas que en ratón expresa abundantemente.



## Abstract

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is a cosmopolitan protozoan that has the ability to infect essentially all nucleated cell of warm-blood organisms. *T. gondii* is able to spread throughout the body and migrate across the biological barriers such as: intestinal, blood-brain and placental barrier. To date, the mechanisms that *T. gondii* uses to perform this process are unknown. However, in our laboratory we thought that the proteases could play a crucial role like virulence effector, and may be involved in parasite dissemination process.

We used a murine model of toxoplasmosis, and we found the ideal conditions to detect proteases in tachyzoites whole-cell extract from *T. gondii* RH strain (high virulent strain), using gelatin zymography. We found, at least, nine proteases with capacity to degrade gelatin. They have a molecular weight range from 50 kDa to 290 kDa, all of them were sensitive to metal chelators such as EGTA and 1, 10 phenanthroline, that indicate these proteases are metalloproteases, not previously reported for *T. gondii* RH strain. Additionally, we detected the proteases content in constitutive excretory/secretory (E/S) products from the parasite, and we found at least five proteases with high sensitivity to EGTA and 1, 10 phenanthroline.

Under the ideal conditions employed, we analyzed the content of proteases in whole-cell extract and E/S tachyzoite isolated from an *in vitro* model of toxoplasmosis; we found a differential expression of proteases present in the parasites isolated from the *in vivo* model. The same activity was fully recovered when parasites were inoculated back into the *in vivo* model. The differential expression of these proteins is possible due to a parasite adaptation to cell culture, and in the absence of inducer molecules and extracellular matrix components, complement factors and immune response, the parasite loses the ability to express proteases abundantly expressed in the mouse model.

## 1.0 Introducción

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un parásito intracelular obligado, descrito por primera vez en 1908 por Nicolle and Manceaux en África del Norte (Nicolle & Manceaux, 1908, 1909) y por Splendore en Brasil (Splendore, 1908). La designación de la especie proviene del roedor *Ctenodactylus gundi*, de donde el parásito fue aislado (Black & Boothroyd, 2000; Ferguson, 2009). El nombre del género proviene del griego *toxon*, que significa arco, refiriéndose a la forma de media luna que presenta el parásito (Black & Boothroyd, 2000; Ferguson, 2009) y *plasma* que significa vida (Ferguson, 2009).

*T. gondii* pertenece al *phylum* Apicomplexa, el cual incluye a parásitos que comparten estructuras celulares similares: un citoesqueleto complejo y disposición de organelos característicos en su extremo apical (Dubey, Lindsay, & Speer, 1998). Entre los parásitos pertenecientes a este *phylum*, encontramos algunos organismos de importancia médica como *Plasmodium* (el causante de la malaria) y *Cryptosporidium*, así como patógenos de importancia veterinaria como *Eimeria* (el causante de la coccidiosis) y *Sarcocystis* (Black & Boothroyd, 2000).

*T. gondii* es un parásito cosmopolita, tiene la capacidad de infectar y replicarse dentro de prácticamente cualquier célula nucleada de organismos de sangre caliente (Dubey & Beattie, 1988), desde aves hasta humanos (Black, Arrizabalaga, & Boothroyd, 2000); actualmente se sabe que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por este parásito (Jensen et al., 2015; Teo, Zhou, Bogyo, & Carruthers, 2007). *T. gondii* es un importante patógeno oportunista (Barragan & Sibley, 2002), que causa infecciones congénitas en el feto, incluyendo retraso mental, ceguera, convulsiones y muerte; en mujeres embarazadas puede causar aborto (Barragan & Sibley, 2003; Desmonts & Couvreur, 1974). Puede causar complicaciones neurológicas severas en

individuos inmunocomprometidos (encefalitis) (Luft et al., 1993) y patologías oculares en individuos sanos (coriorretinitis) (Roberts & McLeod, 1999). En organismos sanos, una infección primaria con *T. gondii* causará síntomas parecidos a los de una gripa normal, mientras que en organismos inmunocomprometidos puede causar infecciones que pudieran ser potencialmente mortales (Barragan & Sibley, 2003). La infección por este parásito emerge como una de las infecciones más comunes en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Black et al., 2000; Dubey et al., 1998).

En el organismo, *T. gondii* debe atravesar las barreras biológicas para llevar a cabo su infección, diseminándose por todo el organismo y causando patologías severas (Barragan & Sibley, 2002, 2003; Desmonts & Couvreur, 1974; Luft et al., 1993; Roberts & McLeod, 1999). El parásito tiene la capacidad de atravesar barreras inmunológicamente privilegiadas como la placenta y la barrera hematoencefálica (Barragan & Sibley, 2003); es aquí donde el parásito causa los problemas más serios. Los parásitos se diseminan rápidamente por todo el organismo; en ratas y ratones se han encontrado en sitios distantes como en corazón y pulmón a pocas horas de su ingestión (Dubey, 1998b); sin embargo, hoy en día los mecanismos que utiliza el parásito para llevar a cabo este proceso permanecen desconocidos.

Probablemente *T. gondii* pueda utilizar mecanismos de virulencia como los que utilizan otros parásitos de importancia médica, donde las proteasas están íntimamente relacionadas en la diseminación a través del hospedero. La identificación de estas proteasas permitiría conocer más de cerca la patogenia de este parásito.

## 2.0 Generalidades

### 2.1 Taxonomía

La clasificación de *T. gondii* ha recibido modificaciones en varias ocasiones desde su descubrimiento en 1908 (Nicolle & Manceaux, 1908, 1909; Splendore, 1908). En 1980 Levine y colaboradores propusieron que el *phylum* Apicomplexa contuviera a muchos parásitos de importancia tanto médica como veterinaria (Levine et al., 1980). Hoy en día *T. gondii* se clasifica de la siguiente manera: Reino: Protista, Phylum: Apicomplexa, Clase: Conoidasida, Orden: Eucoccidiorida, Familia: Sarcocystidae, Género: *Toxoplasma*, Especie: *T. gondii*; *Toxoplasma gondii* ID: 5811 (NCBI, 2015; UniProt, 2015).

### 2.2 Ciclo de vida

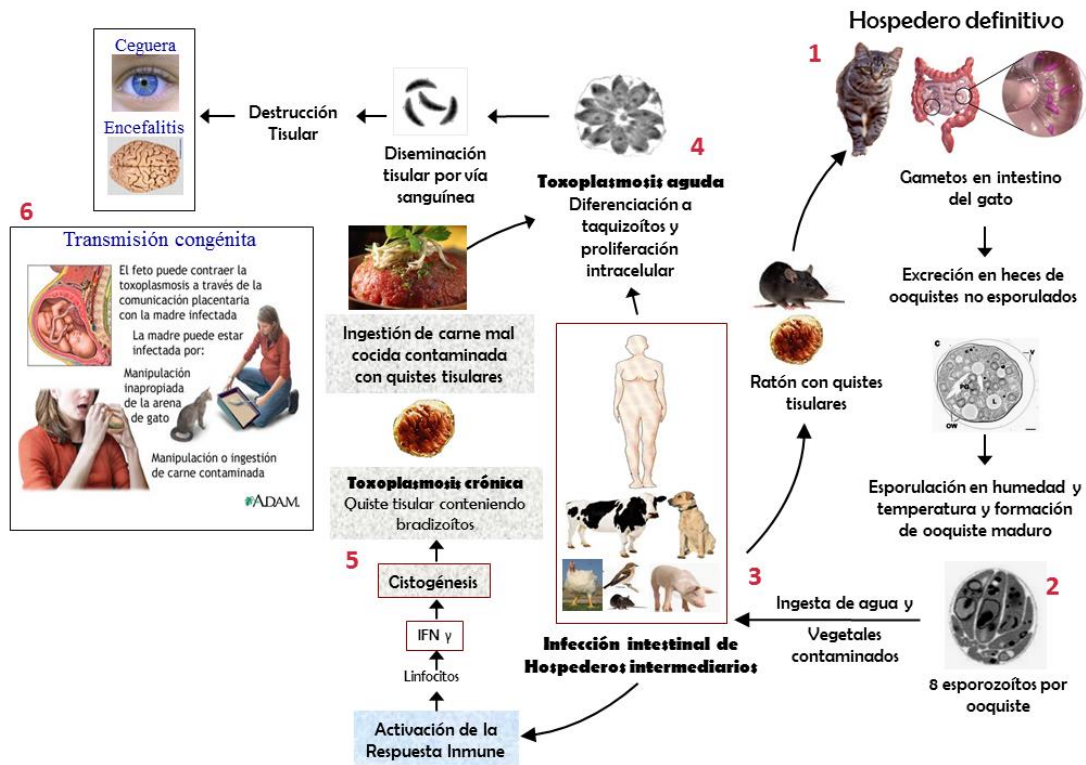
*T. gondii* es uno de los parásitos más exitosos sobre la Tierra (Sullivan-Jr & Jeffers, 2012). Debido a su estilo de vida, intracelular obligado, su transmisión es muy alta y se mantiene en muchas especies (Sullivan-Jr & Jeffers, 2012). *T. gondii* tiene un ciclo de vida complejo, se divide entre las infecciones felinas y no felinas (demás mamíferos), mismas que correlacionan con la replicación sexual y asexual, respectivamente (Black & Boothroyd, 2000).

El ciclo de vida del parásito se desarrolla en dos tipos de hospederos: el hospedero definitivo, que comprende a todos los felinos; y el hospedero intermediario, que incluye a todos los animales de sangre caliente, incluido el humano (Dubey, 1998a). El ciclo de vida (Figura 1) inicia cuando algún felino, como el gato doméstico, se infecta mediante la ingesta de una presa infectada con quistes tisulares (estructuras rígidas que alojan a los bradizoítos, una forma de lenta reproducción). Una vez en el intestino del gato, el quiste tisular se rompe mediante la acción de las enzimas digestivas, liberando a los bradizoítos, los cuales invaden a los enterocitos. Los bradizoítos se diferencian en cinco formas sexuales morfológicamente distintas entre sí para diferenciarse en

microgametos y macrogametos (Dubey, 1998a; Ferguson, 2002). Los microgametos son la forma parasitaria masculina de *T. gondii*, que se caracteriza por ser flagelado y altamente dinámico (Ferguson, 2002). Los microgametos salen al lumen intestinal e invaden a las células epiteliales fertilizando a la forma sexual femenina, los macrogametos, que con ubicación intra-enterocito da como resultado a un cigoto que posteriormente se transforma en un ooquiste inmaduro no infeccioso que es excretado por las heces al medio, donde esporulan para hacerse infecciosos (Sullivan-Jr & Jeffers, 2012). Después de dos o tres días se genera una forma quística altamente infecciosa que contiene en su interior ocho esporozoítos (Muñiz & Mondragón, 2009). El ooquiste al ser excretado puede contaminar fuentes de agua, hortalizas y alimentos, generando una vía de contaminación hacia los hospederos intermediarios (Dubey & Frenkel, 1976; Hutchison, 1965; Muñiz & Mondragón, 2009). Cuando los hospederos intermediarios ingieren a los ooquistes maduros o bien a los quistes tisulares presentes en la carne mal cocida proveniente de animales infectados, se inicia la fase de replicación asexual del parásito (Dubey & Beattie, 1988; Muñiz & Mondragón, 2009). 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). Posterior a la infección con cualquier estadio infeccioso, los taquizoítos se multiplican en una gran variedad de células y eventualmente se enquistan en múltiples tejidos, particularmente en el cerebro (Dubey & Beattie, 1988; Dubey & Frenkel, 1976).

En el organismo, luego de la ingesta, la capa quitinosa externa del ooquiste o del quiste tisular es destruida a nivel intestinal, liberando a los esporozoítos o bradizoítos respectivamente, e invadiendo de forma inmediata a las células del epitelio intestinal y alojándose dentro de una vacuola parasitófora (VP) (Dubey, 1998a). Es en el interior de la VP donde los parásitos (esporozoítos o bradizoítos) se diferencian en taquizoítos, la forma altamente móvil e infecciosa. Los taquizoítos tienen la capacidad de atravesar la barrera intestinal y de diseminarse de manera rápida a través de la circulación sanguínea y,

posiblemente, dentro de macrófagos a lo largo de todo el cuerpo, invadiendo a todas las células nucleadas del hospedero intermediario (Barragan & Sibley, 2003). 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  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), desencadenando una respuesta de diferenciación del parásito conocida 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 lenta proliferación y latencia que les permite sobrevivir dentro del quiste tisular incluso por toda la vida del individuo (Dubey, 1998a; Ferguson, 2004).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.** (1) Todos los felinos, incluido el gato doméstico, son hospederos definitivos, en ellos se lleva a cabo el ciclo de reproducción sexual de *T. gondii*, dando como resultado un ooquiste que es liberado al ambiente en las heces. (2) En el medio, en condiciones de humedad y temperatura adecuadas, el ooquiste no maduro se esporula, formando un ooquiste maduro, mismo que tiene en su interior ocho esporozoítos infectivos que pueden contaminar hortalizas, agua y alimentos. (3) Los hospederos intermediarios se infectan al ingerir a los ooquistes maduros. (4) Los esporozoítos invaden el epitelio intestinal y se diferencian en taquizoítos. La invasión y proliferación de los taquizoítos genera la toxoplasmosis en su fase aguda. Los taquizoítos cuentan con una alta capacidad para diseminarse por todo el organismo, atravesando barreras biológicas e infectando órganos como ojo, cerebro, músculo, entre otros órganos. (5) La toxoplasmosis crónica se genera cuando hay una activación del sistema inmune del hospedero con la activación de linfocitos y la secreción de IFN $\gamma$ , el cual induce el enquistamiento del parásito. El quiste tisular aloja a los bradizoítos y les proporciona protección a fármacos y al sistema inmune. (6) Otra ruta de infección es la infección congénita, en mujeres embarazadas los taquizoítos pueden atravesar la placenta e infectar al feto produciendo severos problemas como: ceguera, malformaciones e incluso aborto. Tomada de (Castro-Elizalde, 2013); Cortesía de R. Mondragón 2011.

### **2.3 Formas parasitarias de *Toxoplasma gondii***

*T. gondii* presenta tres 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 (Dubey et al., 1998). Siendo el estadio de taquizoíto el que ha sido ampliamente estudiado.

#### **2.3.1 Taquizoíto**

El *taquizoíto* es el estadio de alta replicación (Frenkel, 1973) y se presenta en todas las células de los hospederos intermediarios y en las células epiteliales no intestinales de los hospederos definitivos (Dubey et al., 1998). Tiene forma de arco o media luna y mide aproximadamente 6 x 2  $\mu\text{m}$ ; su extremo apical es puntiagudo y aloja a algunos organelos de gran importancia como el conoide, las roptrías y los micronemos (Figura 2); su extremo posterior es ovalado. El taquizoíto contiene los organelos comunes de todas las células eucariotas así como estructuras más especializadas y características como: películo (cobertura externa trimembranal), anillos apicales, anillos polares, conoide, roptrías, micronemos, microporo, microtúbulos subpeliculares, gránulos densos, gránulos de amilopectina (los cuales pueden estar ausentes) y apicoplasto (plastidio no fotosintético, adquirido por endosimbiosis); posee una única mitocondria alargada localizada generalmente cerca del núcleo, el cual a su vez se sitúa usualmente en el área central (Dubey et al., 1998).

Para su motilidad, el taquizoíto primero se adhiere al sustrato o a la membrana de la célula blanco y posteriormente exhibe movimientos por deslizamiento con movimientos en serpentín, puede flexionarse y rotar sobre su eje durante la invasión. Este parásito carece de cilios o flagelos (Dubey et al., 1998), invade a la mayoría de las células del organismo a través de una penetración activa, alojándose dentro de una vacuola parasitófora (VP), en donde prolifera rápidamente por un proceso asexual llamado endodiogenia, en el cual dos células hijas se generan al interior de una célula madre (Dubey et al., 1998). El taquizoíto tiene tres organelos secretorios involucrados en la invasión celular



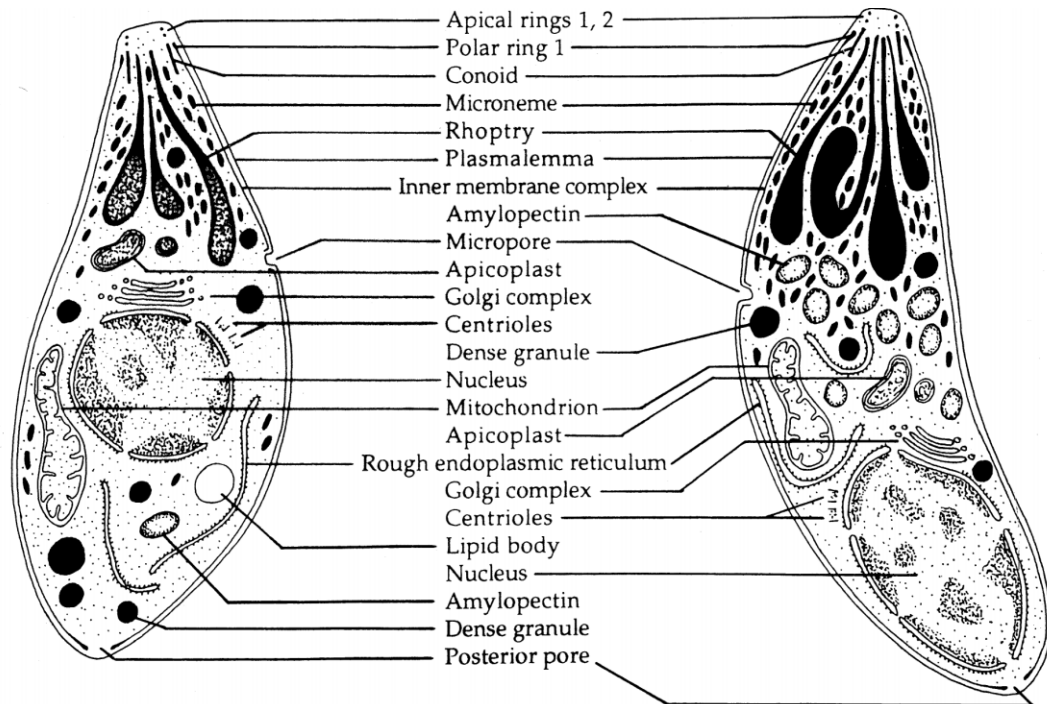
llamados roptrías, micronemos y gránulos densos (Black & Boothroyd, 2000; Carruthers, 1999; Kim, 2004; Leriche & Dubremetz, 1991).

### **2.3.2 Bradizoíto**

Los *bradizoítos* se encuentran dentro de los quistes tisulares en donde proliferan lentamente (Dubey et al., 1998). Los bradizoítos difieren ligeramente de los taquizoítos (Figura 2), su núcleo se sitúa hacia el extremo posterior, mientras que en los taquizoítos se encuentra hacia la parte central; además, los bradizoítos son más esbeltos en comparación con los taquizoítos (Dubey et al., 1998) y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas digestivas (Jacobs, Remington, & Melton, 1960). Adicionalmente, los bradizoítos tienen tres roptrías electro-densas cuya densidad varía de acuerdo a la maduración del quiste, en contraste los taquizoítos tienen ocho roptrías; cuentan además con una gran cantidad de gránulos de amilopectina, organelos en donde se acumulan los constituyentes de la pared quística (Dubey et al., 1998).

### **2.3.3 Esporozoítos**

Los *esporozoítos* se generan en el medio ambiente dentro de ooquistes maduros, miden de 6 a 8  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  y tienen un núcleo sub-terminal. Un ooquiste que se libera en las heces de los gatos infectados, se esporula en el medio dentro de los primeros cinco días después de la excreción, generándose por división celular ocho esporozoítos infectivos (Dubey et al., 1998). Ultraestructuralmente, el esporozoíto es similar al taquizoíto excepto por una mayor presencia de micronemos, roptrías y gránulos de amilopectina (Dubey et al., 1998).

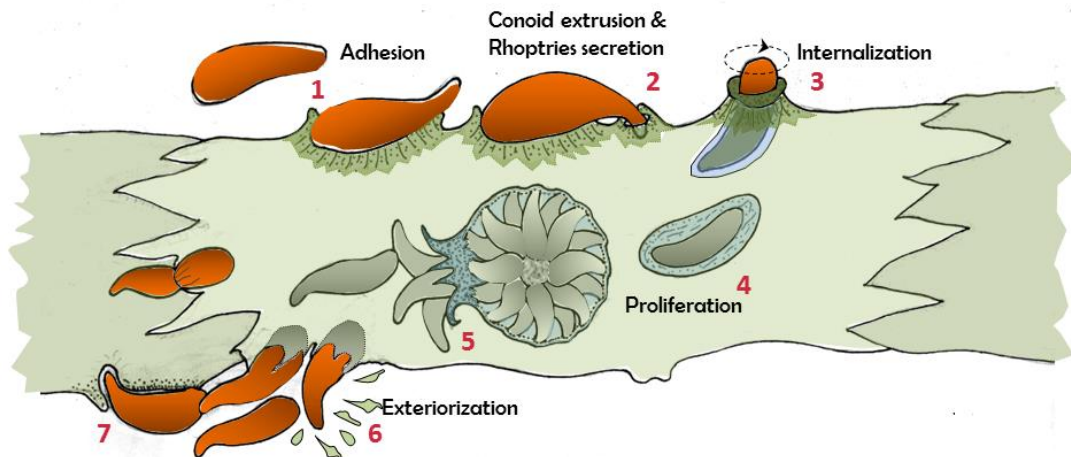


**Figura 2. Esquema de la estructura de un taquizoíta (izquierda) y un bradizoíta (derecha), reconstruida de micrografías electrónicas. Tomado de (Dubey et al., 1998).**

## 2.4 Invasión

La invasión de *T. gondii* es un proceso coordinado que se lleva a cabo en menos de 30 seg e involucra la liberación del contenido de los organelos secretores (Carruthers, Giddings, & Sibley, 1999; Dowse & Soldati, 2004; Huynh et al., 2003; Kim, 2004; Teo et al., 2007). La invasión por taquizoitos (Figura 3) involucra varias etapas: inicialmente el parásito se adhiere por la parte anterior o apical a la célula hospedera, gracias a la secreción la proteína MIC2 proveniente de los micronemos (Carruthers & Sibley, 1997; Huynh et al., 2003). El taquizoíta utiliza un sistema de actina-miosina intrapelicular para deslizarse sobre la membrana de la célula hospedera (Huynh et al., 2003; Teo et al., 2007). Posterior a la adhesión del parásito y previo a la penetración a la célula hospedera, el parásito elige un sitio blanco, protruye el conoide, secreta el contenido de las roptrías, horada la membrana y se internaliza mediante un movimiento tipo tornillo (Dubremetz, Garcia-Reguet, Conseil, & Fourmaux, 1998; Werk, 1985). Al

ingresar a la célula hospedera, se forma una estructura especializada denominada vacuola parasitófora (VP) la cual es un compartimento que le confiere protección al parásito, evita el proceso endocítico normal y evita la degradación del parásito (Sibley, Niesman, Parmley, & Cesbron-Delauw, 1995); es en la VP en donde el parásito se replica por endodiogenia (Mordue, Hakansson, Niesman, & Sibley, 1999). La VP evita la acidificación (Sibley, Weidner, & Krahenbuhl, 1985) y la fusión con otras vesículas endocíticas, incluyendo los endosomas tempranos y tardíos y los lisosomas (Joiner, Fuhrman, Miettinen, Kasper, & Mellman, 1990; Jones & Hirsch, 1972; Sibley, 1993). Una vez dentro de la VP, los parásitos secretan el contenido de los gránulos densos para formar una red de estructuras intravacuolares (Sibley et al., 1995). 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). Cuando los parásitos saturan el espacio intravacuolar, se exteriorizan, lisando a la célula e infectando a células vecinas (Radke & White, 1998).



**Figura 3. Mecanismo de invasión activa de *Toxoplasma gondii*.** (1) Adhesión del parásito a la membrana de la célula hospedera (secreción de proteínas MIC) y deslizamiento mediante un motor de actina-miosina; (2) elección de un sitio blanco, protrusión del conoide sobre la membrana de la célula hospedera y secreción del contenido de las roptrías, (3) internalización mediante movimiento tipo tornillo, (4) generación de la VP, secreción de proteínas GRA, (5) división por endodiogenia y (6) exteriorización e (7) invasión de células vecinas. Tomado de (Castro-Elizalde, 2013); Cortesía de R. Mondragón, 2011.

## **2.5 Morfología**

### **2.5.1 Citoesqueleto**

El citoesqueleto de *T. gondii* es un complejo de microtúbulos y otras estructuras macromoleculares que aparentemente le confieren la integridad estructural, dirige la secreción y permite al parásito poder deslizarse sobre superficies e invadir células hospederas (Black & Boothroyd, 2000; Frixione, Mondragón, & Meza, 1996; Nichols & Chiappino, 1987). Está formado por 22 microtúbulos sub-peliculares organizados desde el anillo polar, se extienden helicoidalmente hasta una tercera parte de la longitud del parásito y hacia el extremo posterior (Nichols & Chiappino, 1987; Russell & Burns, 1984).

Recientemente nuestro grupo describió el proteoma del citoesqueleto de *T. gondii*, demostrando la existencia de proteínas ancladas al citoesqueleto; 95 proteínas fueron identificadas utilizando espectrometría de masas (Gómez de León et al., 2014).

### **2.5.2 Películo**

La estabilidad mecánica de *T. gondii* y los Apicomplexa parece depender en un películo y sus componentes subyacentes del citoesqueleto (Mann & Beckers, 2001). El taquizoíto está rodeado por un películo trimembranal, formado por la membrana plasmática y 11 vesículas aplanadas longitudinalmente localizadas por debajo de la membrana y que están distribuidas a lo largo del eje del parásito y están fusionadas formando una estructura bimembranal denominada complejo membranal interno o IMC (por sus siglas en inglés), mismo que es interrumpido en el extremo anterior y posterior (Foussard, Gallois, Tronchin, Robert, & Mauras, 1990; Mann & Beckers, 2001; Morrissette & Sibley, 2002). Asociado con el películo existe un citoesqueleto sub-pelicular que incluye diferentes estructuras, como el conoide, los anillos pre-conoidales, el anillo polar apical, los 22 microtúbulos sub-peliculares, una red sub-pelicular de filamentos y el anillo posterior apical (Gómez de León et al., 2014), además de componentes del citoesqueleto como actina y miosina (Morrissette & Sibley, 2002). Los 22 microtúbulos se encuentran asociados con el películo de *T. gondii* (Mann &

Beckers, 2001), originan en el anillo polar y corren por todo lo largo del parásito hasta cubrir dos terceras partes del largo de éste (Nichols & Chiappino, 1987).

### **2.5.3 Complejo apical**

Los parásitos del *phylum* Apicomplexa muestran ciertos rasgos morfológicos característicos como son una colección única de organelos localizados en el complejo apical (Morrissette & Sibley, 2002). Estos organelos incluye a las roptrías, los micronemos, el anillo polar apical y el conoide (Morrissette & Sibley, 2002). Las roptrías y los micronemos son los únicos organelos secretores que contienen productos requeridos para la motilidad, adhesión e invasión a la célula hospedera y establecimiento de la VP (Carruthers, 1999; Carruthers & Sibley, 1997)

El conoide es una pequeña estructura en forma de cono que se compone de filamentos en espiral (Nichols & Chiappino, 1987), juega un papel importante en la invasión a la célula hospedera y es único en organismos pertenecientes al *phylum* Apicomplexa. El anillo polar apical es único en el *phylum* (Morrissette & Sibley, 2002), y funciona como un centro organizador de los microtúbulos (Nichols & Chiappino, 1987).

### **2.5.4 Conoide**

Sólo algunos parásitos Apicomplexa (*Toxoplasma*, *Eimeria* y *Sarcocystis*) contienen una estructura adicional en su citoesqueleto, conocido como conoide, mismo que no se encuentra en otros apicomplexas (*Plasmodium* y *Theileria*) (Morrissette & Sibley, 2002). El conoide (Figura 4) es una estructura retráctil con la forma de un cono truncado formado por 14 estructuras helicoidales ricas en  $\alpha$ -tubulina (Gómez de León et al., 2014; Morrissette & Sibley, 2002), tiene una longitud de 280 nm y 380 nm de diámetro (Hu, Roos, & Murray, 2002); se ha sugerido su participación en el proceso de invasión (Nichols & O'Connor, 1981). Mientras el parásito se encuentra dentro de la célula hospedera, el conoide permanece introducido y en un estado de reposo (Hu et al., 2002); cuando el parásito se encuentra extracelular, el conoide se protruye intermitentemente durante la motilidad (Hu et al., 2002); y cuando el parásito va a invadir, realiza la

protrusión del conoide (Hu et al., 2002; Nichols & Chiappino, 1987). Ha sido sugerida la participación del calcio en la activación de filamentos de actina en la extrusión del conoide (Mondragón & Frixione, 1996).

### **2.5.6 Anillo polar**

Justo posterior al conoide existe un anillo polar que funciona como un centro organizador de los microtúbulos (Figura 4), de donde 22 microtúbulos son organizados con un arreglo en espiral que se extiende hasta dos terceras partes del cuerpo del parásito (entre 4 y 5  $\mu\text{m}$ ) (Russell & Burns, 1984).

### **2.5.7 Organelos secretores**

*T. gondii* cuenta con tres organelos secretores, dos de ellos (micronemos y roptrías) se localizan preferentemente en la parte apical del parásito (Carruthers, 1999; Carruthers & Sibley, 1997; Leriche & Dubremetz, 1991). Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que estos organelos se deben secretar de manera secuencial para llevar a cabo una exitosa invasión y proliferación del parásito en la célula hospedera (Carruthers & Sibley, 1997). A manera de resumen, el primer evento de secreción es visualizado como una liberación apical de la proteína de MIC2, esto es rápidamente seguido por la descarga del contenido de las roptrías hacia la célula hospedera para la formación de la VP; y finalmente, los gránulos densos se secretan únicamente dentro de la VP completamente formada para modificar la membrana vacuolar y para constituir una red vesículo-tubular intravacuolar de funciones desconocidas (Carruthers & Sibley, 1997)

#### **2.5.7.1 Micronemos**

Los micronemos (Figura 4) son organelos secretores que pertenecen al elaborado complejo apical del *phylum* Apicomplexa (Soldati, Dubremetz, & Lebrun, 2001). La secreción del contenido de los micronemos precede a la liberación del contenido de las roptrías (Carruthers & Sibley, 1997). El uso de ionóforos para calcio demostró que la descarga ocurre en respuesta a un incremento en el calcio intracelular del parásito (Carruthers & Sibley, 1999).

Las proteínas liberadas de los micronemos se denominan proteínas MIC, una caracterización de las proteínas MIC ha revelado una notable conservación en dominios estructurales que presentan homología con los dominios de proteínas adhesivas conocidas (Tomley & Soldati, 2001).

Dentro de las proteínas MIC podemos encontrar proteínas solubles y transmembranales que expresan diferentes dominios de adhesión, generalmente funcionando en complejos, los cuales consisten de una proteína transmembranal y una o más proteínas no ancladas (Meissner et al., 2002).

Durante la invasión MIC2 es movilizada exitosamente desde los micronemos, ocupando la superficie apical del parásito al momento de la invasión celular y, posteriormente, se transloca en el extremo posterior del parásito al momento de la interiorización de la célula hospedera (Carruthers et al., 1999). También se ha encontrado una expresión diferencial de las proteínas MIC, dependiendo del estadio en que se encuentre el parásito, por ejemplo MIC6 y MIC8 se expresan en taquizoítos, mientras que los genes de MIC7 y MIC9 son expresados predominantemente en bradizoítos (Meissner et al., 2002).

#### **2.5.7.2 Roptrías**

Las roptrías (Figura 4) son el único organelo secretor mostrado por todos los Apicomplexa en todos los estadios invasivos (Dubremetz, 2007). Las roptrías son una parte importante en el elaborado y complejo proceso de invasión presente en los Apicomplexa y son los únicos organelos secretores con ningún equivalente conocido en otros *phyla* (Dubremetz, 2007). Su rol en el proceso de invasión a la célula hospedera se ha demostrado (Nichols, Chiappino, & O'Connor, 1983); sin embargo, su proceso exocítico se ha estudiado poco (Dubremetz, 2007).

El estadio de taquizoíto de *T. gondii*, posee un haz de entre ocho y doce roptrías que se encuentran unidas a la membrana por la parte interior del parásito, se extienden en el extremo apical con un conducto delgado cerca del conoide (Dubremetz, 2007). Su contenido es electro-denso, homogéneo en la parte anterior y heterogéneo vesicular en la parte posterior (Dubremetz, 2007). Se

han identificado al menos 30 proteínas en las fracciones sub-celulares de roptrías (Bradley et al., 2005; Leriche & Dubremetz, 1991); sin embargo, se sabe que también lípidos están contenidos dentro de estos organelos (Bradley et al., 2005; Foussard, Leriche, & Dubremetz, 1991). Existe una clara separación de las proteínas de las roptrías en dos dominios; las proteínas ROP, para los ubicados en la parte abultada posterior; y las proteínas RON, que se encuentran en el cuello de las roptrías (Bradley et al., 2005; Dubremetz, 2007). 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, Mercereau-Puijalon, Dubremetz, & Schwartzman, 1992). En cuanto a los lípidos que forman parte del contenido de las roptrías, se han identificado colesterol y fosfatidilserina, los cuales pueden intervenir en la formación de la VP (Foussard et al., 1991). Actualmente se ha demostrado la participación de las proteínas de las roptrías en la virulencia del parásito (Etheridge et al., 2014; Lei, Wang, Liu, Nan, & Liu, 2014; Zheng, Lu, Tong, Kong, & Lou, 2013).

### **2.5.7.3 Gránulos densos**

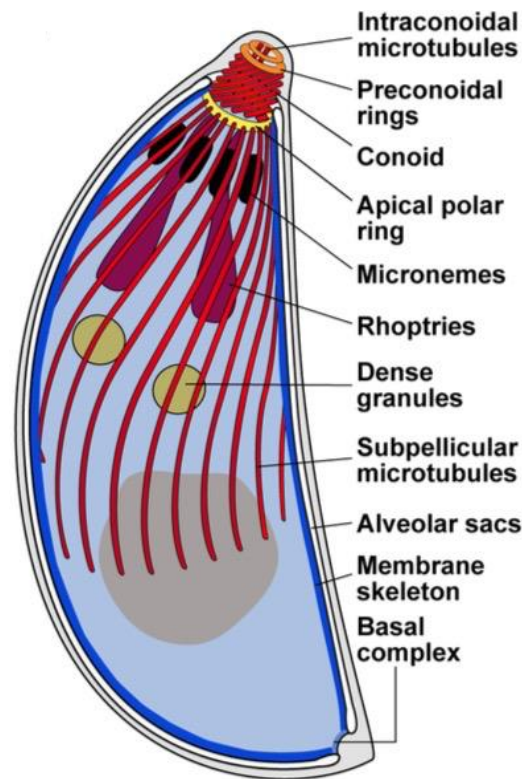
En *T. gondii* existe un tercer tipo de organelo secretor, los gránulos densos (Figura 4), son cuerpos electro-densos (Cesbron-Delauw, 1994; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015), homogéneos que contienen una mezcla de proteínas que están destinadas a ser liberadas dentro de la VP, una vez que ya está formada (Carruthers & Sibley, 1997; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015; Sibley et al., 1995); se observan en el microscopio electrónico de transmisión como esferas de aproximadamente 200 nm de diámetro distribuidas por todo el citoplasma (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). Los gránulos densos varían en número de acuerdo al estadio del parásito, son más prevalentes en el taquizoíto de *T. gondii* en comparación con el bradizoíto y el esporozoíto (Mercier, Cesbron-Delauw, & Ferguson, 2007).

Las proteínas contenidas en los gránulos densos se denominan proteínas GRA (Cesbron-Delauw, 1994; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015; Sibley et al., 1995);



su secreción ocurre consecutivamente a la exocitosis de los micronemos y las roptrías, al final del proceso de invasión (Carruthers & Sibley, 1997). En la actualidad se han encontrado más de 20 proteínas GRA gracias al uso de métodos bioinformáticos (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015).

La localización post-secretora de las proteínas GRA, junto con los resultados obtenidos de un análisis fenotípicos de parásitos knocked-out para la expresión de genes de varias de las proteínas GRA, ha permitido entender que las proteínas GRA son importantes para la maduración de la VP y su subsecuente transformación a quiste (Cesbron-Delauw, Gendrin, Travier, Ruffiot, & Mercier, 2008; Mercier & Delauw, 2012).



**Figura 4. Morfología del taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.** Representación esquemática de un taquizoíta de *T. gondii* donde se observan los elementos estructurales del complejo apical, el películo y los organelos secretores. Tomada de (Katris et al., 2014).

Se ha reportado que las proteínas de los gránulos densos tiene diferentes sitios blancos, por mencionar algunos ejemplos: en la membrana de la VP (GRA3, GRA5, GRA7, GRA8, GRA14, GRA19, GRA20, GRA21 y GRA23), en la red intravacuolar (GRA2, GRA4 y GRA6) o bien permaneciendo libremente en el lumen de la vacuola (GRA1) (Achbarou et al., 1991; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015).

## **2.6 Diseminación y virulencia de *Toxoplasma gondii***

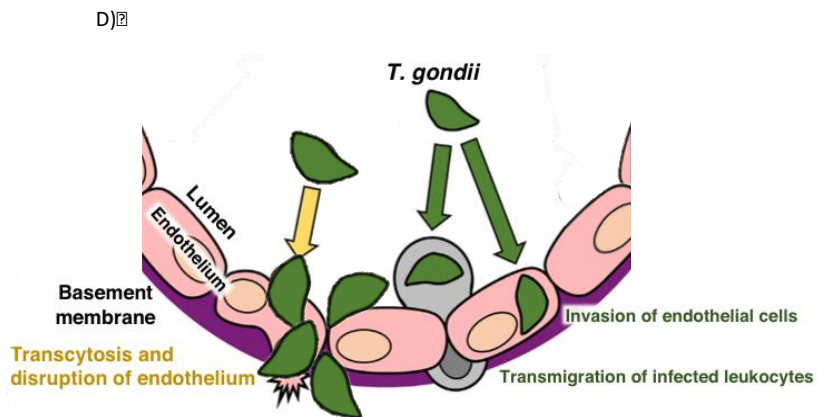
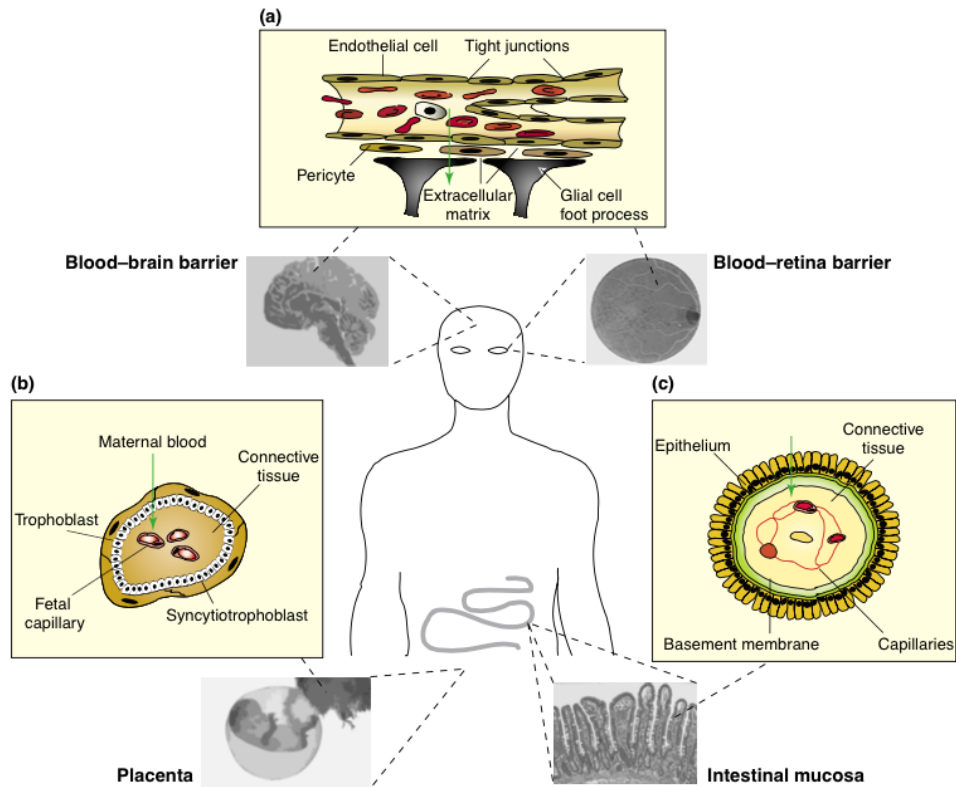
Los mecanismos por los cuales se llevan a cabo los procesos de diseminación tisular de patógenos aún se desconocen (Barragan & Sibley, 2003); sin embargo, se piensa que la diseminación y virulencia de patógenos, así como ocurre en las células cancerígenas, se deba a la expresión de una variedad de proteasas que potencian la invasión tisular (Kim, 2004). Un limitado número de patógenos, incluidos parásitos, bacterias, virus y hongos, son capaces de atravesar las barreras biológicas, tales como la placenta, la barrera hematoencefálica y la pared intestinal (Barragan & Sibley, 2003). Así, los patógenos que evitan la primera línea de defensa del cuerpo son los causantes de las enfermedades humanas más severas (Barragan & Sibley, 2003).

Siguiendo una infección oral, *T. gondii* inicialmente atraviesa el epitelio intestinal, diseminándose por los tejidos y atravesando barreras biológicas inmunológicamente privilegiadas, como la placenta y la barrera hematoencefálica (Barragan & Sibley, 2003) (Figura 1, incisos A, B y C). Es aquí donde el parásito causa las patologías más severas: problemas congénitos en el feto (Desmonts & Couvreur, 1974), complicaciones neurológicas severas en individuos inmunocomprometidos (Luft et al., 1993) y patologías oculares en organismos sanos (Roberts & McLeod, 1999).

Una de las estrategias que se piensa utilizan estos patógenos, entre ellos *T. gondii* para atravesar las barreras biológicas, incluye su tránsito dentro de leucocitos y migración transcelular y paracelular (Figura 1, inciso D) (Huang &

Jong, 2001; Kerr, 1999). Mientras que los mecanismos que utilizan las bacterias y los virus para atravesar las barreras biológicas está parcialmente caracterizado, poco se sabe acerca de los mecanismos utilizados por los parásitos (Barragan & Sibley, 2003).

En el caso de *T. gondii*, se desconoce el mecanismo preciso por el cual atraviesa las barreras biológicas (Ueno & Lodoen, 2015).



**Figura 5. Migración de *Toxoplasma gondii* a través de barreras biológicas.** *T. gondii* inicialmente atraviesa el epitelio intestinal, lográndose diseminar por todo el organismo. A) Atraviesa barreras del sistema nervioso central: la barrera hematoencefálica y la hematorretiniana; B) atraviesa la placenta causando daño al feto; C) Atraviesa el epitelio intestinal, lugar donde se establece la infección posterior a la ingestión oral; D) Posibles rutas para la migración a través de las barreras biológicas. Tomadas o modificadas respectivamente de: (Barragan & Sibley, 2003) Incisos A, B y C; (Ueno & Lodoen, 2015) inciso D.

### 2.6.1 El genotipo de *Toxoplasma gondii* y su patogenicidad

En *T. gondii* se han reportado tres linajes genotípicos (I, II y III) que están relacionados con su virulencia, el hospedero que infectan y su distribución geográfica (Howe & Sibley, 1995; Sibley & Boothroyd, 1992). Las cepas tipo I se asocian con una infección activa en el modelo murino (Howe & Sibley, 1995). Las cepas tipo I son altamente patogénicas en ratón, las tipo II son medianamente virulentas ( $LD_{50}=10^3-10^4$ ) y las cepas tipo III son de baja virulencia ( $LD_{50}\geq 10^5$ ) (Howe & Sibley, 1995).

Uno de los puntos clave en las infecciones de la cepa tipo I (por ejemplo la cepa RH) es su alta capacidad de diseminación hacia múltiples tejidos (Barragan & Sibley, 2002; Mordue, Monroy, La Regina, Dinarello, & Sibley, 2001) y su capacidad migratoria es mayor que en las cepas no virulentas (cepas tipo II y III) (Barragan & Sibley, 2002). Los parásitos de la cepa I expresan un fenotipo de mayor migración a larga distancia *in vitro*, algo que no se observa en las cepas no virulentas de *T. gondii*; también, los parásitos que expresan este fenotipo muestran un incremento en la capacidad migratoria *in vivo* (Barragan & Sibley, 2003). Esto sugiere que: 1º, *T. gondii* es capaz de migrar activamente a través de monocapas y matriz extracelular; 2º, la cepa de alta virulencia (tipo I) muestra una mayor capacidad migratoria en comparación con las cepas no virulentas (tipo II y III) y 3º, la inherente propiedad que tiene *T. gondii* para sobre-regular su capacidad migratoria, probablemente juegue un papel importante en el establecimiento de nuevas infecciones (Barragan & Sibley, 2003).

También se ha propuesto que la migración de *T. gondii* pudiera estar dada por un mecanismo tipo caballo de Troya, en donde el parásito viaja camuflado dentro de leucocitos (Courret et al., 2006; Da Gama, Ribeiro-Gomes, Guimaraes-Jr, & Arnholdt, 2004; Huang & Jong, 2001); sin embargo, estudios recientes han encontrado que *T. gondii* penetra directamente al epitelio y a la matriz extracelular, indicando que la migración a través de barreras biológicas debe ser un proceso activo (Barragan & Sibley, 2002). Los determinantes genéticos que le confieren al parásito su alta capacidad de migración, permanecen por ser

elucidados (Barragan & Sibley, 2003). En la actualidad, se ha propuesto que la alta capacidad de diseminación con la que cuenta *T. gondii* está mediada por la alta motilidad del parásito (Barragan & Sibley, 2003); sin embargo, en nuestro laboratorio creemos que uno de los mecanismos moleculares de virulencia que pudiera estar asociado es la presencia de proteasas, tal como sucede en diversos organismos como *Plasmodium* y *Trichomonas vaginalis*, donde las cisteína proteasas están implicadas en el proceso de ruptura e invasión (Greenbaum et al., 2002). Aunque no se ha explorado en *T. gondii*, las proteasas pudieran jugar un rol fundamental en la hidrólisis de proteínas del hospedero durante la invasión, diseminación a través de los órganos y evasión de la respuesta inmune (Kim, 2004).

## **2.7 Proteasas**

Los polipéptidos pueden ser escindidos tanto química como enzimáticamente (proteólisis); en el proceso enzimático intervienen unas proteínas que catalizan la escisión hidrolítica de enlaces peptídicos que son llamadas proteasas (Erez, Fass, & Bibi, 2009). Las proteasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde realizan diversas funciones; un genoma típico contiene entre el 2-4% de genes que codifican para enzimas proteolíticas (Puente, Sanchez, Gutierrez-Fernandez, Velasco, & Lopez-Otin, 2005).

Las proteasas se pueden clasificar en cuatro grandes grupos de acuerdo a los residuos de su sitio catalítico: cisteína, serina, aspártico y metaloproteasas (Barrett, 1994; Hartley, 1960). En el sitio activo de serina y cisteína proteasas el residuo del mismo nombre es el que está coordinado para realizar el ataque nucleofílico hacía el enlace peptídico (Erez et al., 2009). Las aspártico y metaloproteasas activan una molécula de agua que sirve como nucleófilo (Erez et al., 2009). Sin embargo, en todos los procesos de escisión del enlace peptídico se presenta esencialmente el mismo proceso para todas las clases de proteasas (Erez et al., 2009). Los pH óptimos de actividad pueden variar, en gran parte, por

los diferentes valores de  $pK_a$  dado por los residuos de su sitio catalítico (Ekici, Paetzel, & Dalbey, 2008).

### **2.7.1 Serina proteasas**

Las serina proteasas (SP) (Figura 6) comprenden cerca de un tercio de todas las proteasas conocidas a la fecha, juegan un rol crucial en un amplio rango de procesos tanto celulares como extracelulares incluyendo: coagulación sanguínea (Walsh & Ahmad, 2002), ovulación (Liu, Liu, Nin, Shi, & Chen, 2013), inflamación (Jerke et al., 2015) y procesamiento de proteínas (Barale et al., 1999), entre otras (Ekici et al., 2008). Los miembros más estudiados de esta clase son: quimotripsina, tripsina, elastasa y subtilisina (Ekici et al., 2008).

Las SP solubles utilizan una triada catalítica localizada en el sitio activo de la enzima, esta triada es una estructura coordinada que consiste en tres aminoácidos: histidina, serina y ácido aspártico (Erez et al., 2009). Cada uno de los residuos del sitio catalítico tienen un rol importante en el mecanismo de la proteasa. La histidina, con la ayuda del ácido aspártico, desprotona al grupo hidroxilo de la serina, lo que permite el ataque nucleofílico hacia al carbonilo del enlace peptídico (Erez et al., 2009; Hedstrom, 2002). Sin embargo, las serin proteasas intermembranales que carecen del ácido aspártico en su sitio activo, parecen funcionar con una diada catalítica (Erez et al., 2009).

### **2.7.2 Cisteína proteasas**

Las cisteína proteasas (CP) (Figura 6) son proteínas con un peso molecular entre los 30 a 60 kDa y muestran la mayor capacidad hidrolítica en un rango de pH de 4 a 6.5 (Grzonka et al., 2001). Debido a su tendencia a la oxidación del grupo tiol, el medio debe contener un agente reductor (Grzonka et al., 2001). Las CP están presentes en todos los organismos vivos y son responsables de un gran número de procesos biológicos (Grzonka et al., 2001); las CP de mamíferos han sido implicadas en el desarrollo y progresión de muchas enfermedades (Afonso, Romagnano, & Babiarz, 1997; Henskens, Veerman, & Nieuw Amerongen, 1996). Uno los inhibidores más utilizados para bloquear la actividad de estas proteasas es el E64 (Barrett, 1994).

El mecanismo de las CP es similar al de las SP en el uso de un nucleófilo fuerte y la formación de un complejo covalente enzima-sustrato: el nucleófilo es un átomo de azufre de un residuo de cisteína, en comparación con el átomo de oxígeno de una serina (SP) (Erez et al., 2009).

### **2.7.3 Aspártico proteasas**

Las aspártico proteasas (AP) (Figura 6) son un grupo de enzimas de la familia de la pepsina, normalmente son activas a pH bajo (Barrett, 1994; Tang & Wong, 1987). Este último aspecto limita la función de estas proteasas a localizaciones muy específicas en los organismos. (Tang & Wong, 1987). La mayor fuente de AP son: el estómago (pepsina, gástrica y quimocina) (Martin & Corre, 1984), los lisosomas (catepsinas D y E) y el riñón (renina) (Tang & Wong, 1987). Las AP son inhibidas por pepstatina (Barrett, 1994). Las AP contienen dos residuos de ácido aspártico en su sitio catalítico, estos residuos actúan como un mecanismo ácido-base (Erez et al., 2009). Una molécula de agua coordinada entre los dos residuos es activada por la abstracción de un protón, permitiendo a la molécula de agua atacar al carbonilo del enlace peptídico (Erez et al., 2009).

### **2.7.4 Metaloproteasas**

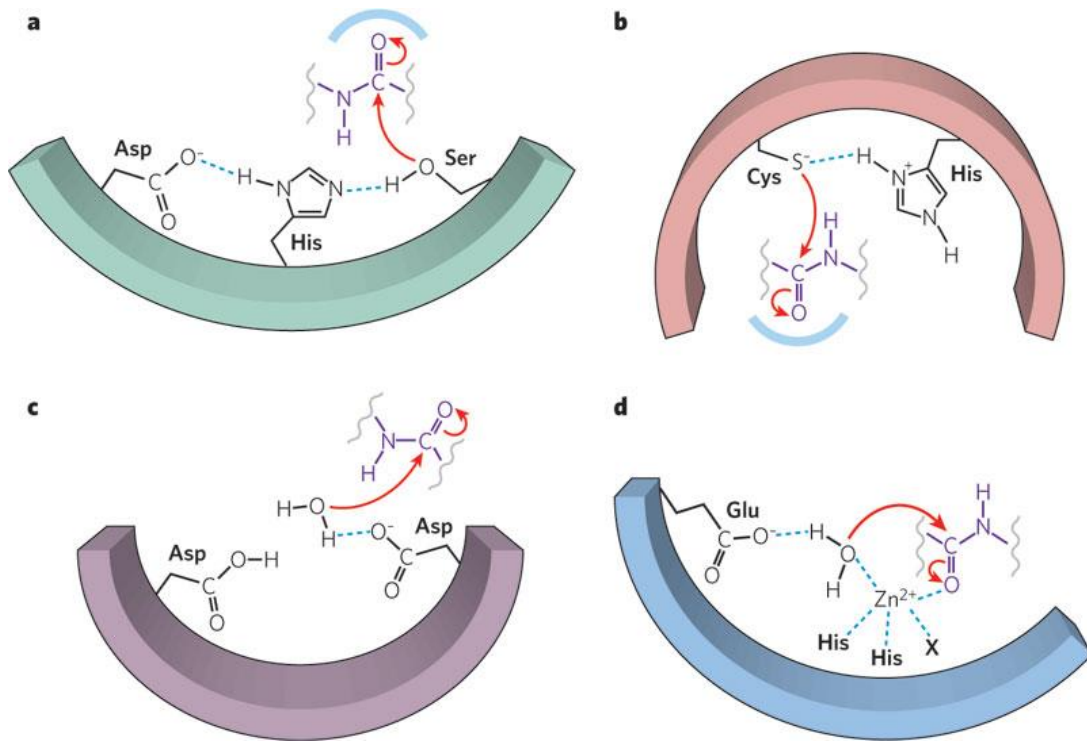
Las metaloproteasas (MP) (Figura 6) son reguladoras de un amplio número de procesos (Vu & Werb, 2000). Existen dos familias de metaloproteasas: las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) y las metaloproteasas-desintegrinas (ADAMs). Las MMPs contienen  $Zn^{2+}$  y dependen de  $Ca^{2+}$  para su actividad proteolítica (Visse & Nagase, 2003); las ADAMs son proteínas transmembranales que contienen dominios de desintegrinas y metaloproteasas (Vu & Werb, 2000). Para el caso de las MMPs, el  $Ca^{2+}$  es requerido para la estabilidad y actividad de estas proteasas.

Para investigar de manera confiable la actividad enzimática de estas proteasas, se recomienda el uso de  $Zn^{2+}$  en concentraciones  $\mu M$ , ya que en concentraciones mM se produce un proceso normalmente inhibitorio e incluso se pueden reportar resultados erróneos negativos por el uso de altas concentraciones de  $Zn^{2+}$  (Barrett, 1994); sin embargo, en ensayos zimográficos el  $Ca^{2+}$  suele



ocuparse en concentraciones mM, ya que en concentraciones  $\mu\text{M}$  no suele detectarse actividad proteolítica (Song & Nam, 2003).

Las MMPs, colectivamente llamadas matrixinas, son proteasas que participan en la degradación de la matriz extracelular (Nagase & Woessner, 1999; Sternlicht & Werb, 2001). Utilizan un metal coordinado,  $\text{Zn}^{2+}$ , en su mecanismo catalítico. En muchas MP solubles, como en las MMPs, la coordinación está acompañada de tres histidinas o bien de dos histidinas y una cadena ácida (Erez et al., 2009). Una molécula de agua sirve como un ligando adicional a  $\text{Zn}^{2+}$  que está enlazado mediante un hidrógeno a un ácido glutámico (Erez et al., 2009). Las MP en general son inhibidas por quelantes de metales ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) como 1, 10 fenantrolina y EDTA (Barrett, 1994). Con base en la especificidad de sustrato, las MMPs se pueden clasificar de la siguiente forma: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas, MMPs membranales y otras (Visse & Nagase, 2003). Las MMPs se encuentran implicadas en un amplio rango de procesos, tanto fisiológicos (Vu & Werb, 2000) como patológicos (Mercer et al., 2005; Nilsson, Jonasson, Nijm, Hamsten, & Eriksson, 2006), entre los procesos patológicos se encuentra el cáncer (Jiang, Goldberg, & Shi, 2002). En el cáncer la degradación de la matriz extracelular es esencial para llevar a cabo el proceso de diseminación celular (metástasis) (Egeblad & Werb, 2002; Fingleton, 2006; Sternlicht & Werb, 2001). Desde un principio se ha demostrado una conexión entre las MMPs y la degradación de la matriz extracelular durante la invasión celular en cáncer (Liotta et al., 1980).



**Figura 6. Esquema del mecanismo proteolítico de las cuatro familias de proteasas.** A: serina proteasas; B: cisteína proteasas; C: aspártico proteasas y D: metaloproteasas. Las líneas gruesas curvadas en color representan el cuerpo de la proteasa, las flechas indican el movimiento de los pares de electrones, líneas punteadas representan puentes de hidrógeno u otras interacciones electrostáticas, las líneas grises en zigzag representan la continuación del polipéptido. Tomada de (Erez et al., 2009).

## 2.8. La matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es un componente no celular presente en todos los tejidos y órganos, es producida principalmente por fibroblastos (Fries et al., 1994); provee un andamiaje físico para todos los constituyente celulares así como señales bioquímicas requeridas en la morfogénesis de tejidos, diferenciación y homeostasis (Piña-Vázquez, Reyes-López, Ortiz-Estrada, de la Garza, & Serrano-Luna, 2012). La MEC se compone fundamentalmente de agua, proteínas y polisacáridos (Frantz, Stewart, & Weaver, 2010); cada tejido tiene una MEC con una composición única y diferente y una topología distinta (Piña-Vázquez et al., 2012). La MEC incluye la matriz intersticial y la membrana basal;

la matriz intersticial está presente entre las células, mientras que la membrana basal es una lámina delgada que rodea o subyace a las células (Piña-Vázquez et al., 2012).

La MEC está compuesta por dos clases diferentes de macromoléculas: proteoglicanos y proteínas fibrosas (Piña-Vázquez et al., 2012). Las principales proteínas fibrosas de la MEC son colágeno, elastina, fibronectina y laminina. El colágeno es una de las proteínas fibrosas más abundantes dentro de la MEC, constituye más del 30% de la proteína total en masa de un animal multicelular (Frantz et al., 2010; Rozario & DeSimone, 2010). Esta proteína constituye el principal elemento estructural del tejido conectivo y también provee resistencia a la tensión, regula la adhesión celular y soporta la quimiotaxis y migración, y se asocia a la elastina (Rozario & DeSimone, 2010).

## **2.9. Proteasas en procesos de diseminación: degradación de la matriz extracelular**

Muchos de los protozoarios humanos invaden, migran y residen dentro de una variedad de tejidos y órganos (Piña-Vázquez et al., 2012). Para muchos parásitos recientemente se ha reportado la inducción de proteasas de MEC en células hospederas. El tejido conectivo y la membrana basal representan la mayor barrera para la invasión celular, diseminación y el acceso a nutrientes esenciales; así, los mecanismos de degradación de los tejidos conectivos debe jugar un papel muy importante para la supervivencia del parásito (Figura 7) (Piña-Vázquez et al., 2012). Algunas MMP se han involucrado en procesos de migración celular, degradación de componentes de MEC, activación de otras proteasas, entre otros procesos (Stefanidakis & Koivunen, 2006). También se han reportado niveles elevados de MMP-9 (una MP de la MEC) con diversos tipos de cánceres metastásicos (Shi et al., 2010; Strongin, 2010) y se ha estudiado la relación entre MMP-9 y su inhibidor en diferentes enfermedades como malaria cerebral (Van den Steen et al., 2006) y la meningitis bacteriana (Sulik & Chyczewski, 2008), ambas enfermedades relacionadas con traspaso de

barrera hematoencefálica. Por lo que, se ha propuesto que estas moléculas pudieran estar involucradas en el mecanismo de diseminación hacia sitios inmunoprivilegiados como los antes mencionados (Schuindt et al., 2012). En estudios recientes se ha demostrado la participación de MMP provenientes macrófagos infectados con *T. gondii* en procesos de migración (Figura 8) (Schuindt et al., 2012). Los mecanismos de degradación de tejido conectivo pueden ser críticos para la supervivencia del parásito (Piña-Vázquez et al., 2012).

En resumen, a la fecha la participación de proteasas provenientes tanto del parásito (intracelulares y extracelulares) como de la célula hospedera se ha evaluado. Hoy en día existen revisiones bibliográficas que se han encargado de compilar las características y el papel de las proteasas de protozoarios extra e intracelulares, y su capacidad para degradar componentes de la MEC (Piña-Vázquez et al., 2012). A continuación, se describirá primero el papel de proteasas en protozoarios extracelulares y posteriormente el papel de proteasas en protozoarios intracelulares, donde *T. gondii* está incluido. Cabe destacar que en este trabajo nos centraremos en aquellas proteasas que estén presentes tanto en los extractos totales como en los productos de excreción/secreción de taquizoítos de *T. gondii*.

### **2.9.1. Papel de proteasas en protozoarios extracelulares**

En *Entamoeba histolytica*, agente causante de la amibiasis en humanos, se han reportado al menos 50 genes que codifican para CPs (Tillack et al., 2007). En este protozoario existe una destrucción del tejido conectivo por los trofozoítos, el cual aparentemente se debe a la liberación de proteasas activadas a través del contacto de los trofozoítos con MEC, lo cual también es un proceso que facilita la locomoción y diseminación de los trofozoítos invasores (Meza, 2000) (Figura 7). Hay evidencia que soporta el rol de las CPs como factores de virulencia en *E. histolytica* (Piña-Vázquez et al., 2012). La actividad colagenolítica de *E. histolytica* ha sido correlacionada con su virulencia cuando se compara con las diferentes cepas de este parásito (Gadasi & Kessler, 1983; Magos, de la Torre, &

Munoz, 1992; Munoz et al., 1984) o con otros factores de virulencia (Piña-Vázquez et al., 2012).

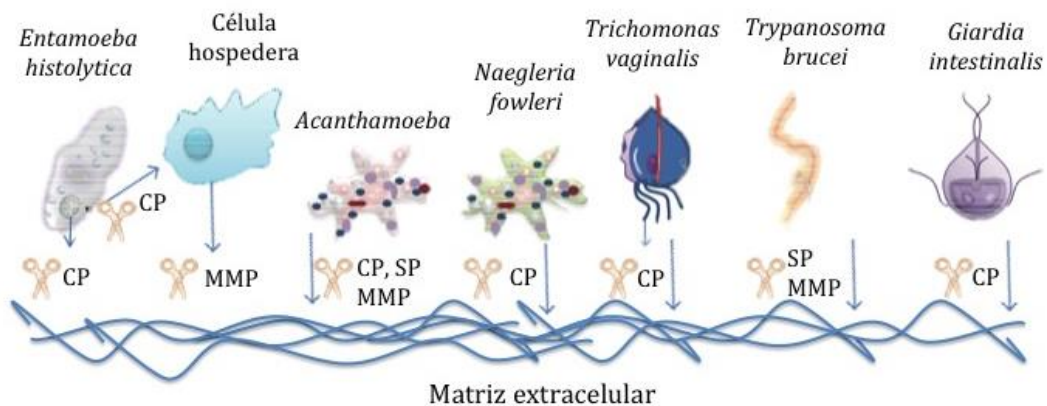
***Giardia intestinalis*** (también conocido como *G. lamblia* y *G. duodenalis*) es el mayor contribuyente de las enfermedades diarreicas en humanos (Muller & von Allmen, 2005). *Giardia* libera productos que pudieran contribuir con la patogénesis (Jimenez, Fontaine, Grzych, Dei-Cas, & Capron, 2004; Muller & von Allmen, 2005) (Figura 7); sin embargo, este proceso aún no están bien caracterizado. Existen pocos estudios acerca de proteasas en este patógeno, algunos de ellos se han dedicado a estudiar la actividad colagenolítica utilizando zimogramas (Coradi & Guimaraes, 2006; Williams & Coombs, 1995). Sugiriendo la participación de CPs en el proceso de adhesión hacia las células epiteliales por este patógeno (Coradi & Guimaraes, 2006).

En ***Acanthamoeba spp.***, un parásito oportunista de vida libre, existen muchas proteasas que pueden degradar componentes de la MEC. Este organismo tiene las hidrolasas elastasas (Ferrante & Bates, 1988), SP (Hadas & Mazur, 1993; Serrano-Luna et al., 2006), CP (Serrano-Luna et al., 2006) y MMP (Khan, Jarroll, Panjwani, Cao, & Paget, 2000; Sissons et al., 2006). Existen muchas proteasas de este parásito que son capaces de degradar ciertos componentes de la MEC (Piña-Vázquez et al., 2012) (Figura 7). En algunos estudios se ha demostrado la degradación de componentes de la MEC por colagenasas (He et al., 1990), también se han evaluado el posible rol de proteasas secretadas en la patogénesis de este organismo (Kim, Ha, Yu, Kong, & Chung, 2003; Sissons et al., 2006). Diversos reportes sugieren fuertemente que una SP secretada juega un rol muy importante en la patogénesis, invasión de tejido córneo, evasión de la respuesta inmune y de obtención de nutrientes (Kim et al., 2003). Los estudios de proteasas han sido amplios en este organismo; sin embargo, es necesario comprender más a fondo el papel de las proteasas (Piña-Vázquez et al., 2012).

En *Naegleria spp.*, otro organismo de vida libre causante de meningoencefalitis primaria amebiana (PAM por sus siglas en inglés), se ha sugerido *in vitro* la presencia de muchos factores de virulencia que pudieran estar involucrados en la patogénesis de PAM. Estos factores de virulencia incluye la presencia de adhesinas (Han et al., 2004), proteínas formadoras de poro (Herbst et al., 2002; Young & Lowrey, 1989), fosfolipasas (Barbour & Marciano-Cabral, 2001), elastasa (Ferrante & Bates, 1988) y proteasas secretadas (Aldape, Huizinga, Bouvier, & McKerrow, 1994; Serrano-Luna, Cervantes-Sandoval, Tsutsumi, & Shibayama, 2007). La capacidad para degradar componentes de la MEC (Figura 7), principalmente colágena y elastina se ha reportado; esta actividad fue principalmente inhibida por inhibidores para CPs (Serrano-Luna et al., 2007). El estudio de los factores de virulencia en *Naegleria* continúa siendo escaso, en la actualidad se ha planteado considerar a las proteasas de este organismo como posibles blancos farmacológicos (Piña-Vázquez et al., 2012).

En *Trichomonas vaginalis*, un protista flagelado responsable de la enfermedad sexual no viral más prevalente, existe un gran repertorio de proteasas; con al menos 450 genes, *T. vaginalis* se convierte en uno de los protozoarios más ricos en contenido de proteasas en la naturaleza (Carlton et al., 2007). Existe tres reportes de este protozoario donde se ha estudiado el papel de CP en la degradación de componentes de la MEC (Figura 7), definiendo a estas proteasas como factor de virulencia (Álvarez-Sánchez et al., 2000; Hernández-Gutiérrez et al., 2004; Mendoza-López et al., 2000). En el caso de CP30, mediante el uso de la técnica de zimografía en doble dimensión y anticuerpos policlonales se reportó que CP30 es una CP necesaria para el proceso de adherencia en las células epiteliales humanas (Mendoza-López et al., 2000). Estrategias similares siguieron para el estudio y caracterización de CP39 y CP65, hallando la participación de estas proteasas en la citotoxicidad e involucrándolas como factores de virulencia (Álvarez-Sánchez et al., 2000; Hernández-Gutiérrez et al., 2004). Estudios más recientes han tenido como meta el identificar CP como biomarcadores potenciales en *T. vaginalis* (Ramon-Luing et al., 2010).

En *Trypanosoma brucei*, un protozooario parásito responsable de la tripanosomiasis africana, se conoce que para llegar hacia tejidos en el hospedero el parásito debe secretar proteasas que degraden la MEC (Figura 7). Por ejemplo, utiliza una MMP neutra de 40 kDa, la cual le permite al patógeno diseminarse gracias a la degradación del colágeno, fibronectina y laminina (Huet et al., 1992). En los estadios más avanzados de la enfermedad, justo cuando el parásito es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, la liberación extracelular de MMP aunado a la liberación de moléculas de adhesión contribuye a la ruptura de la barrera hematoencefálica debido a la modificación de los componentes de la MEC (Hainard et al., 2011; Rosenberg, 2009).



**Figura 7. Proteasas de parásitos extracelulares y su participación en la degradación de la matriz extracelular.** CP: cisteína proteasas; SP: serina proteasas y MMP: metaloproteasas de matriz extracelular. Modificada de (Piña-Vázquez et al., 2012).

### 2.9.2 Papel de proteasas en protozoarios intracelulares

En *Trypanosoma cruzi*, un protozooario parásito causante del mal de Chagas, el proceso infeccioso se lleva a cabo de manera selectiva. Componentes de MEC como colágeno, heparán sulfato y laminina son destruidos por el parásito, mientras que fibronectina no es afectada (Duaso et al., 2012). Existe mucha información a cerca de la interacción de *T. cruzi* con los componentes de la MEC

(Figura 8), no solamente produciendo ruptura y participando en la movilización e infectividad de parásito, sino también afectando la presencia de citocinas y quimiocinas que le permite al parásito escapar de la respuesta inflamatoria e inmune (Duaso et al., 2012).

El atravesar las barreras de la MEC es un prerrequisito para llevar a cabo la invasión de *T. cruzi* a la célula hospedera, si bien hasta el momento no se sabe con certeza como se realiza el proceso, la explicación más obvia ha sido que el parásito destruye los componentes de la MEC mediante la secreción de proteasas (Piña-Vázquez et al., 2012). Se han estudiado algunos productos con características de proteasas en el parásito, entre las que se incluyen CP, SP y MMP (Nogueira de Melo et al., 2010; Visse & Nagase, 2003).

Las interacciones específicas entre *T. cruzi* y los componentes de la MEC, juegan un papel muy importante en la distribución del parásito, mediado por la degradación de la membrana basal y la MEC y los componentes de adhesión del parásito (Piña-Vázquez et al., 2012).

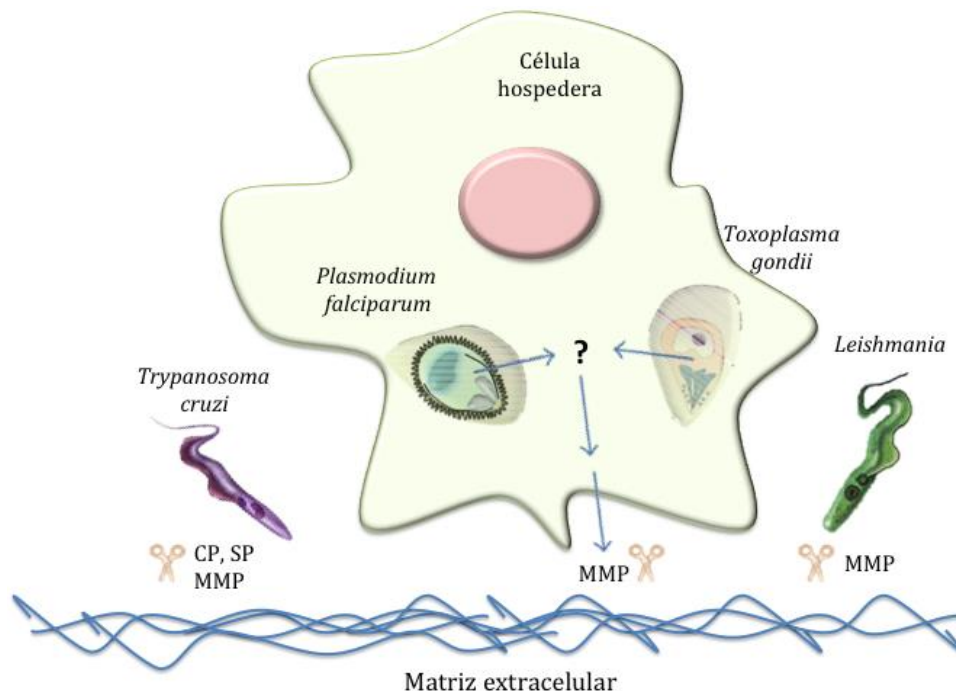
En ***Leishmania***, parásito que afecta a animales como a humanos causando una enfermedad cutánea y en mucosas, se ha reportado la degradación de colágeno y fibronectina por promastigotes de *L. amazonensis*, donde se reporta que la migración del promastigote a través de la MEC es potenciado por una MMP dependiente de  $Zn^{2+}$  llamada GP63 o leishmanolisina (McGwire, Chang, & Engman, 2003). La migración a través de la membrana basal y la MEC puede facilitar la diseminación de los parásitos en distancias largas (Figura 8) (Ghosh, Bandyopadhyay, Kole, & Das, 1999).

En ***Plasmodium falciparum***, parásito causante de la malaria, se ha reportado previamente un proceso mediante el cual la fagocitosis de trofozoítos por los monocitos del hospedero estimula la producción de IFN- $\alpha$  y otras moléculas como MMPs, degradando la MEC y dañando la lamina basal; con lo cual, se ha relacionado a las MMPs en la patogénesis del organismo (Prato, Giribaldi, Polimeni, Gallo, & Arese, 2005). Se reporta un incremento de enzimas derivadas del hospedero, como MMP-9 (Figura 8), mismo incremento que es elevado en



pacientes con malaria severa (Prato et al., 2005).

En *Toxoplasma gondii*, el patógeno intracelular causante de la toxoplasmosis, un sello distintivo es la capacidad con la que cuenta el parásito para poder atravesar barreras restrictivas como la barrera hematoencefálica, la barrera hematorretiniana, la barrera intestinal y la placenta durante la infección activa o bien durante la reactivación de la enfermedad crónica (Piña-Vázquez et al., 2012). Como se ha mencionado en páginas anteriores, a la fecha se ha propuesto que el parásito utiliza un mecanismo tipo caballo de Troya para diseminarse por todo el organismo mientras evade la respuesta inmune (Barragan & Hitziger, 2008), el parásito utilizaría macrófagos murinos (Da Gama et al., 2004) o monocitos (Courret et al., 2006) para diseminarse. Bajo esta premisa, *T. gondii* tendría que controlar cómo estos caballos de Troya degradan componentes de la MEC; potencialmente, pudieran estar involucradas las MMPs (Buache, Garnotel, Aubert, Gillery, & Villena, 2007) (Figura 8).



**Figura 8. Proteasas de parásitos intracelulares y su participación en la degradación de la matriz extracelular.** CP: cisteína proteasas; SP: serina proteasas y MMP: metaloproteasas de matriz extracelular. Modificada de (Piña-Vázquez et al., 2012).

Estudios han demostrado un decremento en la secreción y expresión de proMMP-9 (zimógeno de MMP-9) en monocitos humanos infectados con la cepa RH de *T. gondii* (Buache et al., 2007), lo cual sugiere que esta MMP es fundamental en el proceso de migración de macrófagos infectados. En otros estudios se ha evaluado la maquinaria de invasión que presentan células de un linaje monocítico/macrófago infectadas con *T. gondii*, los macrófagos infectados mostraron un incremento en la expresión de algunas MMP de membrana (MT1-MMP y ADAM10) (Seipel et al., 2010). MT1-MMP es conocida como un activador de MMP-2, y MMP-2 es una proteasa que degrada la MEC (Sato, Takino, & Miyamori, 2005).

La utilización de la maquinaria de diversos tipos celulares del hospedero por parásitos ya se ha estudiado; sin embargo, en *T. gondii* la expresión de proteasas en extractos totales de taquizoitos se ha estudiado poco. Muy probablemente esto se debe a que en los laboratorios donde se estudia *T. gondii*, el parásito generalmente se mantiene en cultivos celulares y no en ratones debido a las restricciones para el uso de animales de laboratorio. Lo cual podría ocasionar que algunos factores de virulencia, que sólo se expresan *in vivo*, no se detecten o se tomen en cuenta. Debido a que *in vivo* el parásito debe protegerse de la respuesta inmune y atravesar componentes de MEC e invadir (Barragan & Hitziger, 2008), es lógico pensar que el parásito cuenta con mecanismos que promueven su diseminación; la expresión y secreción de proteasas podría ser una parte importante de dicho proceso. Al mantenerse en cultivo celular, los parásitos no estarían expuestos a las condiciones de estrés impuestas por las moléculas y células efectoras de la respuesta inmune y por lo tanto no requerirían expresar factores de virulencia, por ejemplo, aquellos relacionados con la diseminación tisular, dado que no los requiere, en consecuencia sólo expresarían aquellos factores que requerirían para llevar a cabo la invasión de las células en cultivo. Por todo lo anterior, pensamos que los taquizoitos mantenidos *in vivo* expresan factores de virulencia que le permiten al parásito lograr su diseminación con éxito y que son diferentes a los expresados por los

parásitos mantenidos en cultivo celular.

### **2.10 Proteasas presentes en los productos de excreción/secreción de parásitos**

El contenido proteolítico en productos de excreción/secreción (E/S) de parásitos como *Angiostrongylus cantonensis* ha sido evaluado mediante ensayos zimográficos, demostrando la presencia de diferentes proteasas (metaloproteasas) que se expresan diferencialmente dependiendo del estadio larvario del parásito. Sus resultados sugieren que estas proteasas pudieran estar asociadas con la diseminación o patogénesis del parásito (Lai, Jiang, Chen, & Lee, 2005).

### **2.11 Zimografía como técnica de detección de proteasas**

La zimografía es una técnica electroforética, basada en la electroforesis de un gel de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) y un sustrato (por ejemplo: gelatina, caseína, albumina, hemoglobina, etc.) copolimerizado con la matriz de poliacrilamida (d'Avila-Levy, Santos, Cuervo, Batista de Jesus, & Branquinho, 2012; Heussen & Dowdle, 1980). Las muestras son preparadas bajo condiciones no reductoras (sin agentes reductores y sin hervir la muestra), y separadas por peso molecular en un gel de poliacrilamida estándar conteniendo el sustrato copolimerizado (d'Avila-Levy et al., 2012). Después de la electroforesis las proteasas son renaturalizadas gracias a la remoción del desnaturalizante SDS por un detergente no-iónico Tritón X-100, seguido de la incubación del gel bajo condiciones específicas para la actividad de cada proteasa (pH, tiempo de incubación, iones, etc.). Una vez que la proteasa hidrolizó el sustrato, la actividad proteolítica puede ser visualizada como bandas blancas en un fondo teñido con azul de Coomassie (d'Avila-Levy et al., 2012).

Esta técnica ofrece muchas ventajas: 1) es relativamente económica y rápida; además múltiples proteasas pueden ser detectadas en el mismo gel; 2) permite la obtención de pesos moleculares aproximados; 3) la incubación en presencia de múltiples inhibidores provee información de qué tipo de proteasa se trata; 4) los cambios en pH y temperatura permiten conocer algunas características de las proteasas analizadas; 5) se pueden utilizar muchos sustratos en diferentes ensayos zimográficos; 6) se puede realizar ensayos densitométricos para la cuantificación de las bandas de degradación y 7) la técnica de zimografía en gelatina es altamente sensible, permitiendo la detección de proteasas en el orden de ng (d'Avila-Levy et al., 2012; Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994; Leber & Balkwill, 1997).

### 3.0 Antecedentes directos

En la actualidad existe evidencia de la participación de proteasas en las interacciones hospedero-parásito, alguna muestra el estudio de la degradación de la MEC por diferentes protozoarios; la compilación de estos estudios está disponible en la siguiente cita (Piña-Vázquez et al., 2012).

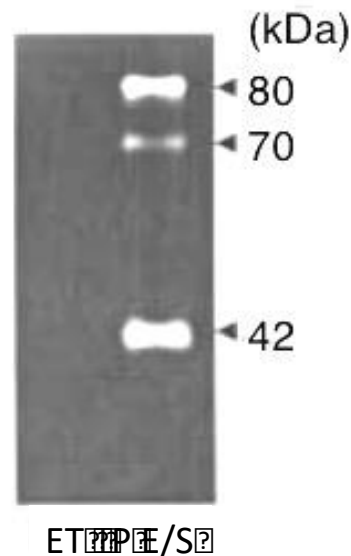
En varios estudios se han descrito la participación de tres familias de proteasas que están involucradas en procesos de degradación de la MEC en parásitos extracelulares e intracelulares (mencionadas anteriormente). Sin embargo, han sido muy pocos los estudios donde han utilizado la técnica de zimografía para la detección de proteasas (mencionado anteriormente).

A pesar que la zimografía es una técnica ampliamente usada para la detección de proteasas, ha sido utilizada de manera escasa en el estudio de proteasas en *T. gondii*, y los reportes no se han enfocado en el estudio de proteasas como factores de virulencia o bien su participación en procesos de diseminación.

En el 2003 Song y colaboradores (Song & Nam, 2003) hicieron uso de la técnica de zimografía en geles copolimerizados con gelatina para tratar de caracterizar las proteasas presentes en extractos totales y en los productos de E/S de taquizoitos de la cepa RH (Figura 9).

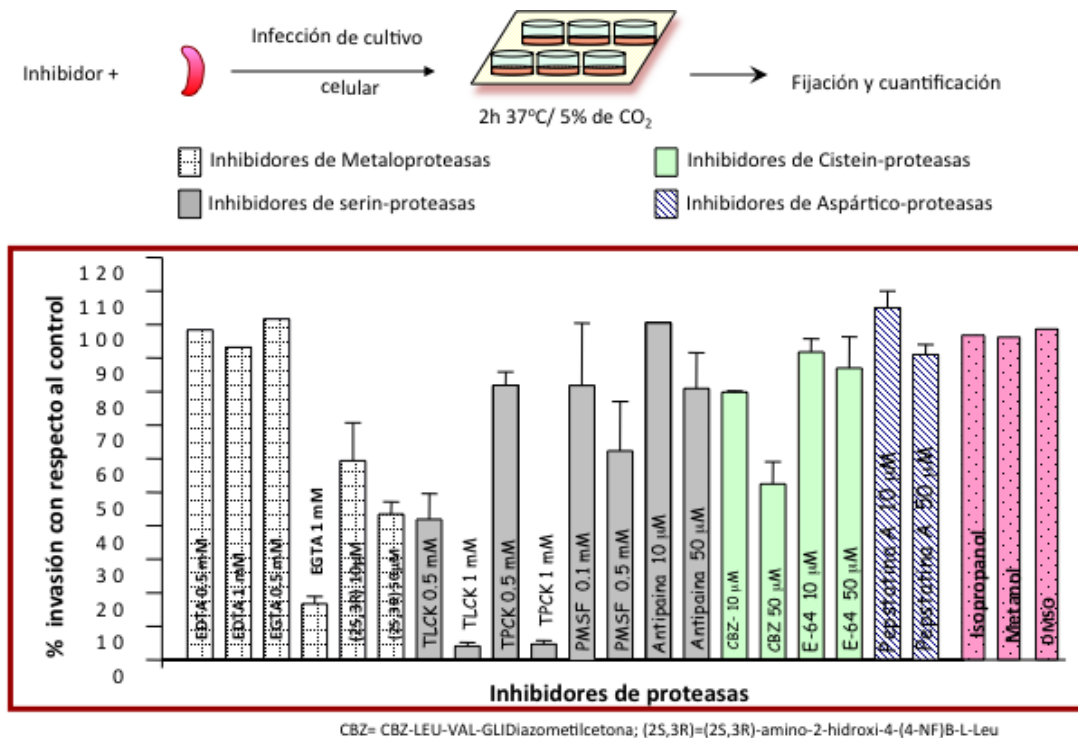
Como podemos observar en la Figura 9, se reportó no haber detectado actividad proteolítica en extractos totales de *T. gondii*; sin embargo, se discute como posible razón la presencia de zimógenos (enzimas catalíticamente inactivas) en este extracto. En lo que respecta a las productos de E/S, se lograron detectar tres proteasas, con pesos de 42 kDa, 70 kDa y 80 kDa. Continuaron con la caracterización de la proteasa de 80 kDa, misma que reportan ser una proteasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones mM y de pH neutro; con ayuda de múltiples inhibidores concluyeron que se trataba de una MP, pues se inhibió significativamente por EGTA, EDTA y 1, 10 fenantrolina. Estos investigadores sugieren que las proteasas podrían modular a proteínas de adhesión y al proceso

de invasión pero no como un factor de virulencia en *T. gondii* (Song & Nam, 2003).



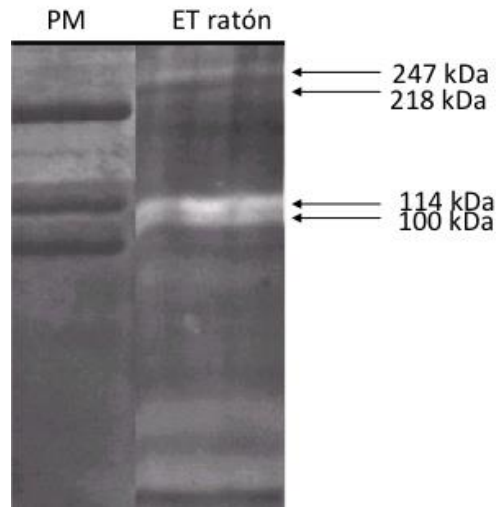
**Figura 9. Zimograma en gelatina.** Análisis de los extractos totales (ET) y de productos de excreción/secreción (E/S) de taquizoítos de *T. gondii* aislados de ratón (cepa RH). El gel se lavó 1 h con Tritón X-100 y se incubó por 5-8 h a 37 °C. Tomada de (Song & Nam, 2003).

En nuestro laboratorio, la M. en C. Tais Nopal Guerrero en su proyecto de maestría se dio a la tarea de investigar el papel de varios inhibidores para todas las familias de proteasas en el proceso de invasión a células HEp-2. Con base en los resultados obtenidos en ensayos de invasión celular, pudo sugerir que diversas clases de proteasas intervienen en este proceso, utilizando inhibidores específicos para MP como EGTA (1mM), para SP como TLCK (1mM), TPCK (1mM) y PMSF (0.5mM) y para CP como CBZ-LEU-VAL-GLI-Diazometicetona (50µM) produjeron bloqueos evidentes en la invasión de la célula hospedera por el parásito (Nopal-Guerrero, 2003) (Figura 10). Lo anterior le permitió sugerir que posiblemente estos tipos de proteasas pudieran estar involucrados en el proceso de invasión de *T. gondii* a la célula hospedera (Nopal-Guerrero, 2003).



**Figura 10. Invasión celular por tachizoítos pre-tratados con inhibidores de proteasas.** Los tachizoítos purificados se incubaron con los inhibidores de proteasas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 40 min antes de realizar el ensayo de invasión. Los controles negativos fueron los solventes: metanol al 0.30%, isopropanol al 0.13% y DMSO al 0.21% (utilizados en la preparación de los diferentes inhibidores). Se contaron un total de 200 células para cada condición y por triplicado ( $p < 0.01$ ). Tomado de (Nopal-Guerrero, 2003).

Posterior a esto, la M. en C. Tais Nopal procedió a realizar ensayos zimográficos de extractos totales de tachizoítos en geles copolimerizados con colágena I/III, hallando actividad proteolítica de al menos cuatro bandas de degradación, actividad que se exhibió en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, sugiriendo el efecto colagenolítico fuera dado por metaloproteasas (Nopal-Guerrero, 2003) (Figura 11). Con lo anterior, la M. en C. Tais Nopal proporcionó un primer indicio de la presencia de proteasas en extractos totales de *T. gondii* de la cepa RH detectables mediante zimografía.



**Figura 11. Zimograma en colágena I/III.** Actividad proteolítica de extractos totales de *T. gondii* de la cepa RH en presencia de  $\text{CaCl}_2$  1mM. PM: peso molecular, ET: Extracto total de taquizoítos de la cepa RH aislados de ratón. El gel se lavó 2 h con Tritón X-100 y se incubó por toda la noche a 37 °C. Tomada de (Nopal-Guerrero, 2003).

Es importante aclarar que el hallazgo de la M. en C. Tais muestra claras diferencias en comparación con lo anteriormente encontrado por Song y colaboradores; como se evidencia en la Figura 11, existen proteasas que son detectadas mediante zimografía utilizando colágena I/III. Posiblemente estas diferencias se deban al sustrato utilizado (colágena I/III vs. gelatina) y/o al procesamiento de los zimogramas (horas de lavado y tiempo de incubación).



## 4.0 Justificación

Uno de los aspectos más importantes en la patogénesis de *T. gondii* es su capacidad de diseminación tisular, afectando a órganos vitales como el cerebro, el ojo y la placenta. El mecanismo mediante el cual *T. gondii* migra para alcanzar estos órganos no se conoce; sin embargo, existe la posibilidad que intervengan factores de virulencia tales como las proteasas, en forma similar como se ha descrito para otros patógenos con capacidad de diseminación tisular y en la migración de las células cancerosas. En otros patógenos se ha reportado que la capacidad de degradación de componentes de la MEC les permite diseminarse por el organismo hospedero.

Debido a que los toxoplasmas que se estudian en los laboratorios alrededor del mundo son parásitos que se han mantenido en cultivo celular (*in vitro*), existe la posibilidad de que los factores de virulencia que éstos expresan no sean los mismos que los expresados por los parásitos provenientes de animales infectados (*in vivo*), y en consecuencia, las proteasas como un factor de virulencia no se han detectado o considerado en forma relevante en el sistema *in vitro*.

Con base en lo anterior resulta interesante estudiar la expresión de proteasas de taquizoítos aislados del modelo *in vivo* e *in vitro* de *T. gondii* para un futuro estudio de su papel funcional en la diseminación tisular. La identificación de estas proteasas permitiría el estudio como posibles blancos terapéuticos o para el desarrollo de posibles vacunas.

## **5.0 Hipótesis**

Hay una expresión diferencial de proteasas entre los taquizoítos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH aislados de ratón y los mantenidos en cultivo celular que influye en su virulencia y en su capacidad de diseminación tisular.

## **6.0 Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Identificar, caracterizar y comparar la expresión de las proteasas de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH aislados de ratón y de cultivo celular.

### **6.2 Objetivos particulares**

1. Estandarizar la detección de proteasas en extractos totales de taquizoítos aislados de ratón de la cepa RH mediante geles copolimerizados con gelatina para las diferentes familias de proteasas, utilizando tripsina como control positivo.
2. Comparar la expresión de proteasas de extractos totales y de productos de excreción/secreción de taquizoitos mantenidos en un modelo *in vivo* y en un modelo *in vitro* de toxoplasmosis.
3. Identificar la familia de las proteasas detectadas mediante el uso de Inhibidores específicos.

## **7.0 Metodología**

Las características particulares de todos los materiales, reactivos y anticuerpos utilizados en este trabajo pueden encontrarse en el Anexo II, al final de esta tesis.

### **7.1 Cultivo celular**

Para el cultivo celular de los taquizoítos se usaron células de carcinoma de laringe humana (HEp-2, ATCC-CCL 23) cultivadas en MEM suplementado con SFB al 8%, penicilina 20 U.I./ml y estreptomina 20 µg/ml y mantenidas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células se cultivaron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron mediante pases consecutivos; cuando las células alcanzaban el 100% de confluencia se lavaron con 1 ml de Verseno (EDTA al 0.5% en PBS) a pH 7.5, se tripsinizaron (Tripsina grado cultivo celular al 0.025%) en presencia de EDTA por 1 min a 37 °C, las células se resembraron en medio MEM suplementado con SFB al 8%, penicilina 20 U.I./ml y estreptomina 20 µg/ml para mantener el cultivo celular.

El cultivo celular se trabajó en una campana de flujo laminar de bioseguridad clase II tipo A/B3 (Nuaire Biological Safety Cabinets, Plymouth, MN, USA).

### **7.2 Animales**

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

### **7.3 Parásitos**

Los taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* se mantuvieron mediante inoculaciones intraperitoneales en ratones hembras BALB/c, de seis a ocho semanas de edad, como se reportó previamente (Mondragón & Frixione, 1996).

Para ello, tres o cuatro días post-inoculación, se sacrificaron ratones infectados por medio de dislocación cervical, los taquizoitos se cosecharon mediante exudados peritoneales con PBS estéril (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1 mM, pH 7.4). La suspensión rica en parásitos se purificó mediante varios ciclos de centrifugaciones a baja velocidad a 1700 rpm y mediante resuspensión de la pastilla de parásitos en PBS estéril. Una purificación adicional incluyó el pasaje de la muestra a través de filtros de policarbonato de 5 µm de diámetro con la finalidad de eliminar macrófagos y otros contaminantes celulares. Los taquizoitos purificados se contaron en cámara de Neubauer y se ajustó el número dependiendo del ensayo a realizar (extractos totales de taquizoitos: 10x10<sup>6</sup>; infección de células HEp-2: relación célula:taquizoíto 1:20; ensayos de proteínas de excreción/secreción: 20x10<sup>6</sup> taquizoitos). Todos los ensayos se realizaron dentro de los siguientes 120 min después del aislamiento. Para mantener la cepa se re-infectaron nuevos ratones vía intraperitoneal.

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

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

#### **7.4 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Para la cuantificación de proteínas se preparó una curva de calibración con BSA, en un rango de 50 a 500 µg/ml. Para la muestra se realizaron diferentes diluciones en PBS, normalmente 1:10, 1:50 y 1:100. Para la determinación de proteínas, se tomaron 10 µl del estándar de BSA o de la muestra (extracto total o proteínas de excreción/secreción), se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (1:4 Bradford-agua destilada) en placas de 96 pozos, se incubó durante 5 min en oscuridad y se leyó la absorbancia a 595 nm (MicroPlate Reader S80XR, BioRad). La curva de calibración se graficó, se observó la concentración proteica de la muestra, y se ajustó a la cantidad de proteína necesaria. Para Western Blot se utilizaron 20 µg de proteína total.

#### **7.5 Precipitación de proteína por el método de Metanol-Cloroformo**

La precipitación de la proteína se realizó en tubos Eppendorf mediante la adición de la mezcla de metanol-cloroformo-agua destilada en la proporción de 3:1:4, se mezcló por vortex y se centrifugó a 13,200 rpm durante 2 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se agregaron 4 partes de metanol para luego centrifugarse a 13,200 rpm a 4 °C durante 2 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla (proteína precipitada) se resuspendió en amortiguador para zimografía (Laemmli) (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, SDS al 4%, Glicerol al 20% y 0.002% de Azul de Bromofenol) o amortiguador de lisis para Western Blot (β mercaptoethanol al 2%, SDS al 1%, EGTA al 20 mM, Tris-HCl 2 mM a pH 7.5, PMSF 0.1 mM, TPCK 0.1 mM y TLCK 0.1 mM). Todo el procedimiento se realizó en hielo.

#### **7.6 Determinación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano**

El porcentaje de viabilidad de los parásitos se determinó mediante la tinción con azul de tripano al 0.4%. Los parásitos analizados se encontraban en PBS, se contó el número de parásitos no viables que incorporaron el colorante y se determinó el porcentaje de viabilidad contando al menos 300 parásitos en cámara de Neubauer.

### **7.7 Preparación de extractos totales de taquizoitos**

Los taquizoitos purificados y ajustados a  $10 \times 10^6$  se solubilizaron en amortiguador para zimografía (amortiguador Laemmli) (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, SDS al 4%, Glicerol al 20% y 0.002% de Azul de Bromofenol) sin agentes reductores ( $\beta$ -mercaptoetanol o DTT) y sin inhibidores de proteasas, además la muestra no se hirvió. Posteriormente, la muestra se sonicó a 40 Hz 2 veces durante 15 seg (Procesador Ultrasónico GE 130PB Cole-Parmer, Vernon Hills, USA). En caso de ser necesario, se realizó la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para Western Blot se utilizaron 20  $\mu$ g de proteína total.

### **7.8 Obtención de proteínas de excreción/secreción**

Los taquizoitos purificados y ajustados a  $20 \times 10^6$  se resuspendieron en MEM estéril sin suero. La suspensión de parásitos se incubó a 37 °C por hasta 4 h; al término de la incubación se realizaron tres centrifugaciones suaves a 1,700 rpm a TA para asegurar la separación de los parásitos, se recuperó el sobrenadante considerado como productos de excreción/secreción (E/S). Los productos E/S se precipitaron mediante la técnica de metanol-cloroformo a 4 °C, la proteína precipitada se resuspendió en amortiguador para zimografía o bien en amortiguador de lisis ( $\beta$  mercaptoethanol al 2%, SDS al 1%, EGTA al 20 mM, Tris-HCl 2 mM a pH 7.5, PMSF 0.1 mM, TPCK 0.1 mM y TLCK 0.1 mM). La muestra se analizó mediante zimografía o bien mediante Western Blot. En caso de ser necesario, se realizó la cuantificación de proteína mediante el uso del método de Bradford (Bradford, 1976).

### **7.9 Tinción con azul de Coomassie (Neuhoff, Arold, Taube, & Ehrhardt, 1988)**

Colocar el gel en un recipiente limpio y teñirlo con solución de Azul Coomassie (Coomassie R-250 al 13%, metanol al 50% y ácido acético al 10%). Agitar suavemente por 4 h a TA y decolorar solución de desteñido (metanol al 50% y ácido acético al 10% para geles sin sustrato; o bien, metanol al 10% y ácido acético al 10% para zimogramas) hasta observar las bandas.

### **7.10 Tinción con nitrato de plata (Coligan, Dunn, Ploegh, Speicher, & Wingfield, 1995)**

Para teñir los geles, se colocaron en un recipiente de vidrio y se lavaron con agua destilada por 10 min en agitación, el gel se colocó en solución fijadora (metanol al 40% y 50 µl de formaldehído al 37%) por 10 min en agitación. Después de lavar dos veces con agua destilada por 5 min, se agregó la solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/ml) durante 1 min en agitación, se lavó con agua destilada 2 veces durante 20 seg y se incubó con una solución de nitrato de plata al 0.1% por 10 min en agitación, se adicionó 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 aparecieron las bandas. La reacción se detuvo con ácido cítrico 2.3 M por agitación durante 10 min.

### **7.11 Protocolo de fijación de parásitos con glutaraldehído al 1%**

Los parásitos se fijaron con glutaraldehído al 1% en PBS durante 30 min a TA sin agitación, posteriormente se agitaron suavemente por inversión durante 30 min. Los parásitos se lavaron con PBS y se centrifugaron tres veces y se les adicionó BSA al 0.5% en PBS para bloquear los aldehídos libres durante 30 min a TA.

### **7.12 Tripsina grado espectrometría de masas como control positivo**

Para los ensayos zimográficos se empleó tripsina grado espectrometría de masas como control positivo. Para solubilizar la tripsina liofilizada, se empleó HCl 1 mM tal como lo describe la hoja técnica (disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>). Para ajustarla a la cantidad a evaluar se utilizó Tris-HCl pH 7.5 y para cargarla en el gel se colocó en presencia de amortiguador de Laemmli (v/v).

### **7.13 Electroforesis 1-D**

Las proteínas obtenidas de extractos totales de taquizoitos o bien de productos de E/S de los parásitos se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en mini-geles de 1.5 mm de grosor. El gel de poliacrilamida al 7.5% conteniendo las proteínas se tiñó con azul de Coomassie R-250 (Neuhoff et al., 1988), teñido con

nitrato de plata (Coligan et al., 1995) o bien transferido a membrana de nitrocelulosa para su análisis mediante Western Blot. Para zimografía el gel se copolimerizó con gelatina al 0.1%; la gelatina se solubilizó en agua destilada tibia y se agregó a la mezcla al momento de hacer el gel, se digitalizaron los geles en un foto-documentador (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 degradación.

#### **7.14 Densitometría**

Los geles se digitalizaron en un foto-documentador EZ Imager, mediante el programa Image™ Lab Software Versión 4.1 y se transformó a escala de grises en el mismo programa. La intensidad relativa de la degradación de la gelatina se cuantificó mediante densitometría utilizando el programa libre Image J (disponible en: <http://rsb.info.nih.gov/ij>); los valores se reportaron en Unidades Arbitrarias de Densitometría (UAD).

#### **7.15 Análisis estadístico**

Las gráficas se presentaron con valores promedio  $\pm$ Desviación Estándar (SD). Para la comparación de los datos se usó la prueba t de dos colas para muestras no pareadas, usando el software GraphPad Prism versión 6.

#### **7.16 Zimografía 1-D en gelatina**

La técnica de zimografía se realizó de acuerdo a lo reportado previamente (Heussen & Dowdle, 1980). Las proteasas se analizaron y caracterizaron mediante geles de poliacrilamida al 7.5% copolimerizados con gelatina de piel porcina Tipo: A al 0.1% como sustrato. Los geles se cargaron con  $10 \times 10^6$  taquizoítos en extracto total o con proteínas de excreción/secreción de diferentes tiempos. Las proteínas se separaron electroforéticamente a 80 V durante 15 min y posteriormente se incrementó a 100 V hasta que el frente de corrimiento saliera del gel. Posterior a la electroforesis, los geles se lavaron en presencia de amortiguador de lavado que contenía Tritón X-100 al 2.5% en



diferentes pH (Acetato de Sodio 10 mM, pH 3.5; Tris-HCl 10 mM, pH 5.5; Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 ó Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Posterior al lavado, los geles se incubaron, utilizando los mismos amortiguadores pero sin Tritón X-100, en presencia o no de DTT, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y MgCl<sub>2</sub> durante al menos 18 h a 37 °C. Al término de la incubación, los geles se tiñeron con azul de Coomassie, posterior a su desteñido (agua destilada:metanol:ácido acético en 5:4:1) se observan bandas de degradación en un fondo claro. A la par con cada análisis zimográfico se obtuvo un gel de poliacrilamida al 7.5% sin sustrato, el cual se utilizó como control de carga del ensayo.

### **7.17 Inhibición de proteasas en zimografía**

Para la caracterización de proteasas mediante el uso de inhibidores específicos para las diferentes familias de proteasas, se siguió el mismo protocolo de zimografía salvo que en los amortiguadores de lavado y de activación se le agregaron los inhibidores a probar a las siguientes concentraciones: Inhibidores de metaloproteasas: EGTA (1 y 5 mM) y 1, 10 fenantrolina (1 y 5 mM); inhibidores de serina proteasas: TLCK (1 y 5 mM), TPCK (1 y 5 mM), PMSF (1 y 5 mM); inhibidor de cisteína proteasas: E64 (1 y 5 µM) e inhibidor de aspártico proteasas: Pepstatina A (1 y 5 µM).

### **7.18 Análisis de Western Blot**

La técnica de Western Blot se realizó como se reporta en (Gómez de León et al., 2014). Las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida al 7.5% se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por 70 min a 200 mA, se bloquearon en presencia de leche descremada al 6% y disuelta en TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 75 mM pH 8.0 y Tween 20 al 0.1%) durante 2 h a TA. Posteriormente, la membrana se incubó con sus correspondientes anticuerpos primarios 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. La detección de la reacción se realizó por quimioluminiscencia. Como anticuerpos primarios se utilizó el anticuerpo monoclonal de β-tubulina de ratón en una dilución 1:5,000 en TBST 0.1% y el anticuerpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii* (producido en

nuestro laboratorio) en una dilución 1:1,000 en TBST 0.1%. Como anticuerpo secundario se utilizaron *anti-ratón* y *anti-conejo* en una dilución 1:7,000 en TBST 0.1%; los anticuerpos secundarios estaban conjugados a HRP.

### **7.19 Electroforesis 2-D**

El procedimiento fue el reportado por (O'Farrell, 1975). Los taquizoítos purificados obtenidos de dos ratones o de cultivo celular se lisaron con amortiguador de lisis para electroforesis 2-D (Urea 7 M, Tiourea 2 M, Chaps al 4%, DTT 60 mM, amortiguador de anfolinas pH 3-10 al 2% -para tiras lineales de 7cm-); la proteína se precipitó con acetona a -20 °C durante al menos una noche. La muestra se centrifugó a 13,200 rpm durante 15 min a 4 °C, la pastilla se resuspendió en acetona fría, se dejó reposando a -20 °C por 5 min y se repitió el proceso de lavado y centrifugación por al menos 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, Tiourea 2 M, Chaps al 4% y Azul de bromofenol). La muestra se colocó en la placa de corrida y sobre tiras con anfolinas embebidas con rango de pH de 3-10, posteriormente se cubrieron con aceite mineral y se inició la corrida de IEF. La corrida consistió en 12 h de rehidratación pasiva a 20 °C, por pasos de 50V/20 min, 70V/20 min, 250V/20 min, 4,000V/2 h, 10,000V/h (IEF Cell Protean BioRad, Hercules, CA, USA). Una vez terminado el IFE, las tiras se incubaron en amortiguador de equilibrio con 1% DTT (Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Glicerol al 30%, SDS al 2%, DTT al 1% y Azul de bromofenol) durante 15 min. Posteriormente, se le retiró el amortiguador de equilibrio con DTT y se le colocó amortiguador de equilibrio con IAA al 2.5% (Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Glicerol al 30%, SDS al 2%, IAA al 2.5% y Azul de bromofenol) durante 20 min; la tira se lavó con agua MiliQ estéril y se colocó en un gel de poliacrilamida al 10% y se corrió la segunda dimensión durante 80 min a 120V.

### **7.20 Zimografía 2-D en gelatina**

Taquizoítos purificados obtenidos de dos ratones o de cultivo celular se lisaron bajo condiciones no reductoras con amortiguador de lisis para zimografía 2-D desarrollando el mismo método para el gel en 2-D descrito anteriormente (sección 7.19), pero sin agentes reductores. Una vez terminado el IFE, las tiras se incubaron en amortiguador de equilibrio (Urea 6 M, Tris 50 mM pH 8.8, Glicerol al 30%, SDS al 2% y Azul de bromofenol) durante 20 min, la tira se lavó con agua MiliQ y se colocó en un gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina al 0.1% y se corrió la segunda dimensión durante 80 min a 120V.

### **7.21 Inhibición de proteasas en zimografía 2-D**

El mismo protocolo de zimografía 2-D se siguió (sección 7.20), salvo que en el amortiguador de lavado y de activación se le agregó el inhibidor EGTA (1 mM).

## 8.0 Resultados

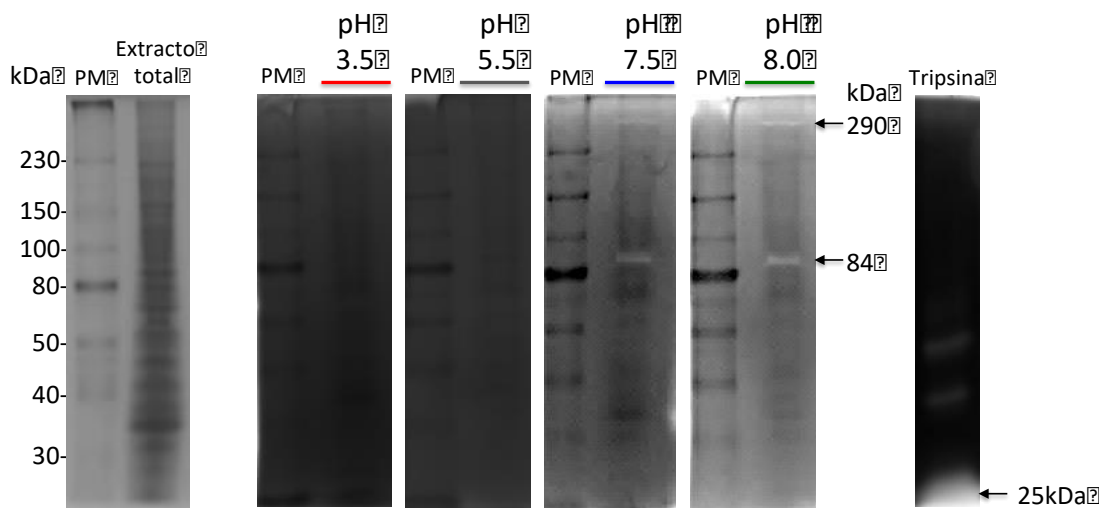
Los resultados se presentan de manera secuencial para cumplir con los objetivos del presente trabajo. Los pesos moleculares indicados en los ensayos fueron proporcionados por el programa Image™ Lab Software Versión 4.1 (BioRad, Hercules, CA, USA), con excepción de las bandas de alto peso molecular, mismas que fueron analizadas de manera manual. Todos los resultados se repitieron al menos tres veces, obteniendo patrones proteolíticos idénticos.

### 8.1 Detección del perfil proteolítico de extractos totales de taquizoitos en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina

Con el fin de caracterizar las proteasas presentes en los extractos totales (ET) de *T. gondii* decidimos analizar los ET de  $10 \times 10^6$  de taquizoitos a diferentes pH en ausencia de agentes reductores y cofactores. Como sabemos, las diferentes familias de proteasas tienen pH de activación distintos, esto nos permitió analizar la muestra en diferentes condiciones. Realizamos una búsqueda bibliográfica para conocer cuáles son los amortiguadores de activación que suelen utilizarse para la detección de las diferentes familias de proteasas mediante zimografía en gelatina. Decidimos utilizar los siguientes amortiguadores de activación en donde se abarcan rangos de pH amplios para optimizar la detección de las diferentes familias de proteasas: acetato de sodio 10 mM, **pH 3.5** (Oliveira-Jr et al., 2013); Tris-HCl 10 mM, **pH 5.5** (Oliveira-Jr et al., 2013); Tris-HCl, 100 mM, **pH 7.5** (Saboia-Vahia et al., 2013; Saboia-Vahia et al., 2014) ó Tris-HCl 50 mM, **pH 8.0** (Sampieri, de la Pena, Ochoa-Lara, Zenteno-Cuevas, & Leon-Cordoba, 2010) (Modificado de (Toth, Sohail, & Fridman, 2012)). También conocemos que las APs son activas a pH ácidos (Barrett, 1994; Oliveira-Jr et al., 2013; Tang & Wong, 1987), las CPs en rangos de pH 4-6.5 (Álvarez-Sánchez et al., 2000; Grzonka et al., 2001; Hernández-Gutiérrez et al., 2004; Mendoza-López et al., 2000), SPs a pH 7.5 (Saboia-Vahia et al., 2013; Saboia-Vahia et al., 2014) y las MPs en rangos alcalinos de pH (Branquinha, Vermelho, Goldenberg, & Bonaldo, 1996; Oliveira-Jr et al., 2013).

Procedimos a evaluar la muestra de ET en presencia de los diferentes amortiguadores de activación, y utilizando como control positivo tripsina.

Como efecto único de pH, podemos observar que ni a pH 3.5 ni 5.5 observamos bandas de degradación en el gel (Figura 12). Sin embargo, para las muestras incubadas a pH 7.5 y 8.0 observamos dos bandas de degradación, una a 84 kDa y otra de 290 kDa aproximadamente. Cabe destacar que la degradación de la tripsina en los ensayos fue constante y se redujo su actividad a pH ácidos, lo que comprobó el buen funcionamiento de nuestro sistema. La actividad de tripsina que se observa en la Figura 12, es a pH neutro.



**Figura 12. Perfil proteolítico de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH) por activación a diferentes pH.** La actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de **ratón** se evaluó en presencia exclusiva de pH. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó en presencia de los diferentes pH. Los geles se incubaron durante 18 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular.

La degradación del sustrato a pH alcalinos no requirió de cofactores o agentes reductores para su actividad, es decir fue exclusivo de pH. Sin embargo, es bien sabido que algunas proteasas requieren la presencia de agentes reductores

como el DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol, o bien de cofactores como  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad. Por lo anterior decidimos analizar los ET ahora en presencia de DTT y diferentes cofactores y diferentes pH. Para ello, se probaron dos concentraciones distintas de DTT (1 y 5 mM) como agente reductor, y tres concentraciones distintas para cada uno de los cofactores  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$  (1, 5 y 10 mM). Cabe destacar que las concentraciones que se evaluaron para la caracterización, son concentraciones que se suelen ocupar en ensayos zimográficos (Oliveira-Jr et al., 2013; Song & Nam, 2003). El DTT se utilizó ya que se ha reportado que se requiere de un agente reductor para evidenciar la actividad de CPs.

Iniciamos primero evaluando la muestra a pH 5.5, como se observa en la Figura 13, en presencia de  $\text{CaCl}_2$  desde la concentración más baja probada, 1 mM, hay un incremento en la actividad de proteólisis del sustrato en comparación con la basal, y se conserva hasta la concentración de 10 mM. Bajo estas condiciones, pudimos observar seis proteasas, con pesos aproximados de: 290 kDa, 254 kDa, 199 kDa, 172 kDa, 110 kDa y 84 kDa. Con relación a los demás cofactores, no observamos actividad proteolítica del sustrato. En el caso del DTT, tampoco se observó un incremento en la actividad proteolítica (Figura 13). Este resultado corrobora que existen proteasas en los ET que requieren calcio para su actividad.

Con base en el hallazgo anterior, evaluamos si el pH podría ayudar a mejorar la actividad de estas proteasas. Analizamos entonces la actividad de las proteasas del ET a pH 7.5, en presencia de los diferentes cofactores, a las mismas concentraciones antes descritas. Cabe destacar que el DTT ya no fue usado en este pH, dado que únicamente se probó para la actividad de cisteína proteasas (pH óptimo: 5.5).

En las condiciones de pH 7.5 y  $\text{CaCl}_2$ , se presentó un incremento importante de la actividad proteolítica con relación al basal y con relación a pH 5.5 (Figura 14). Las diversas bandas de degradación se observaron claramente. Aparentemente

desde la concentración más baja de  $\text{CaCl}_2$  se obtuvo la máxima actividad proteolítica. Con  $\text{ZnCl}_2$  a la concentración  $1 \mu\text{M}$ , se observó un aparente incremento con relación al basal (pH 7.5 sin cofactores). Para  $\text{MgCl}_2$  no se observó incremento en la actividad proteolítica del sustrato a ninguna de las concentraciones evaluadas del catión.

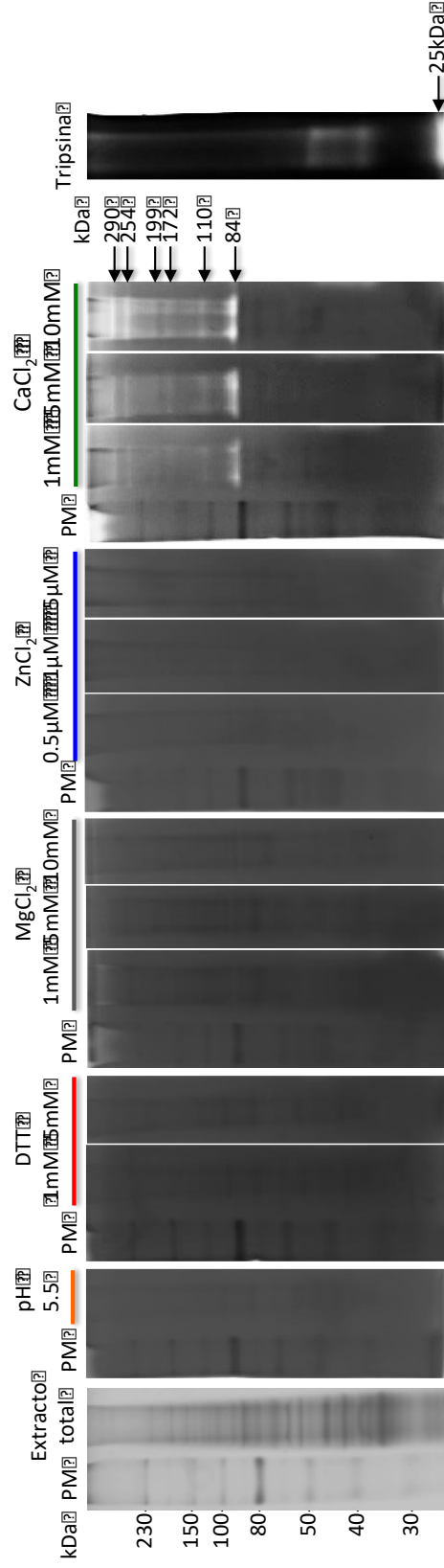
Por último, decidimos evaluar pH 8.0 bajo las mismas condiciones de cofactores. Como se muestra en la Figura 15, en presencia de  $\text{CaCl}_2$  se evidencia un patrón proteolítico similar a pH 7.5. En lo que respecta a  $\text{ZnCl}_2$  no se observó un incremento en la proteólisis del sustrato a ninguna concentración a este pH, la actividad proteolítica aparentemente se conservó en lo basal. Con relación a  $\text{MgCl}_2$  a ninguna concentración observamos proteólisis.

Con base en los resultados anteriores podemos afirmar que en el ET de taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii* proveniente de ratón existen proteasas que son detectadas mediante zimografía utilizando como sustrato gelatina. Estas proteasas que no han sido reportadas para *T. gondii* son dependientes de pH alcalino y del cofactor  $\text{Ca}^{2+}$ .

La actividad obtenida a pH 7.5 y 8.0 a  $1 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$  resultó en un perfil proteolítico similar. El cofactor  $\text{ZnCl}_2$  a la concentración de  $1 \mu\text{M}$  en pH 7.5 favoreció la actividad de proteólisis de la proteasa de  $84 \text{ kDa}$  y otra más de  $290 \text{ kDa}$ . El  $\text{MgCl}_2$  no fue un cofactor necesario para la actividad de las proteasas. Siendo el  $\text{CaCl}_2$  el cofactor determinante para la actividad de estas proteasas.

Con base en los resultados anteriores, decidimos tomar como condiciones óptimas para los ensayos zimográficos futuros las siguientes: pH 7.5,  $1 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$  y  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Uno de los determinantes para la elección de estas condiciones óptimas, es el hecho de que es un pH cercano al fisiológico. Cabe aclarar que se decidió utilizar  $\text{ZnCl}_2$  ya que el zinc es un cofactor necesario para la actividad de algunas proteasas (metaloproteasas) y en la concentración antes mencionada este cofactor contribuyó a la proteólisis en ausencia de  $\text{CaCl}_2$ .

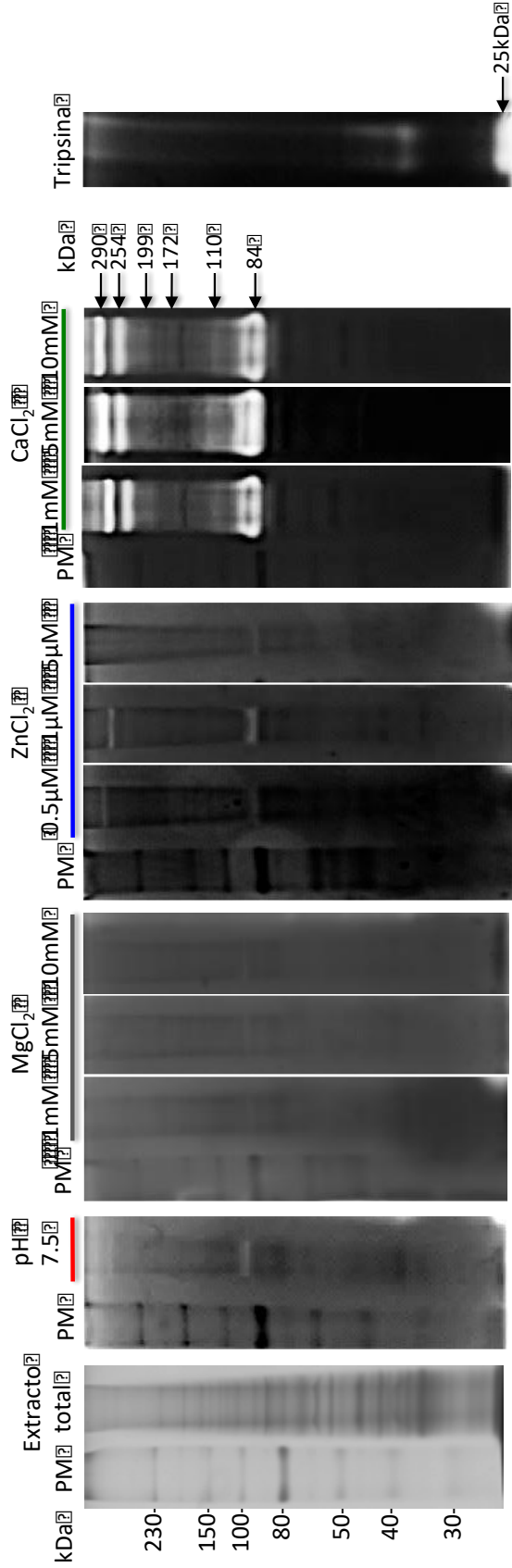
## pH 5.5



**Figura 13. Perfil proteolítico de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH) a pH 5.5 en presencia de diferentes cofactores o agente reductor.** La actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón se evaluó en presencia de pH 5.5 y diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> o DTT. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 5.5 en presencia de los diferentes cofactores o agente reductor. Los geles se incubaron durante 18 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular.

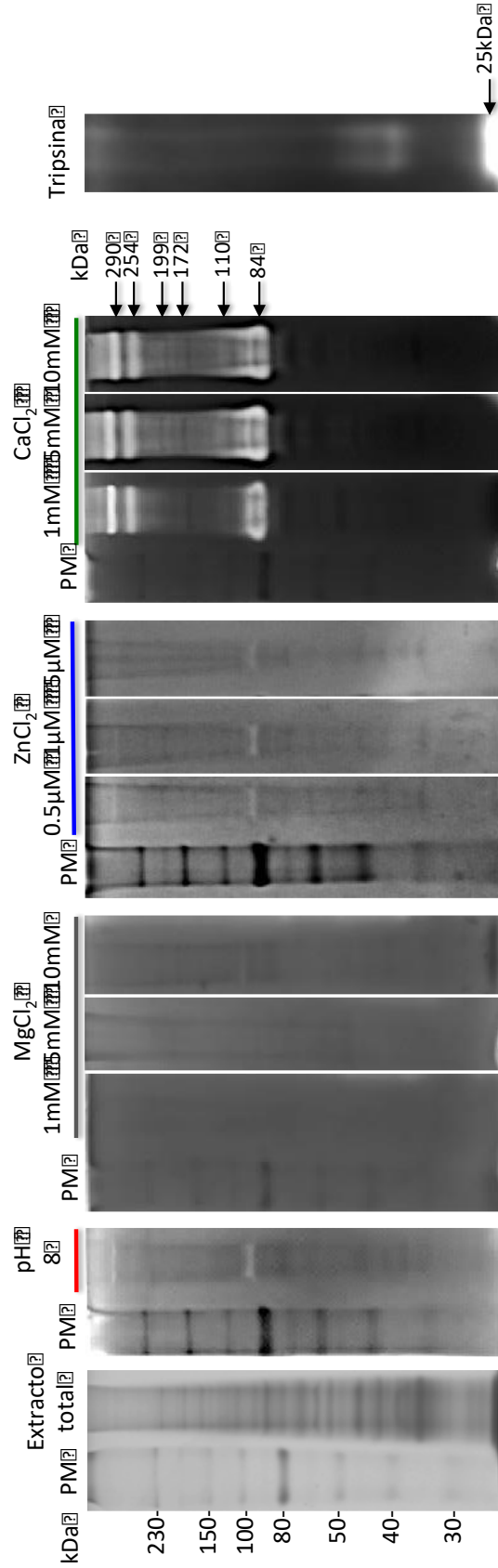


# pH 7.5



**Figura 14. Perfil proteolítico de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH) a pH 7.5 en presencia de diferentes cofactores.** La actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón se evaluó en presencia de pH 7.5 y diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> ó CaCl<sub>2</sub>. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 en presencia de los diferentes cofactores o agente reductor. Los gels se incubaron durante 18 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular.

# pH 8.0

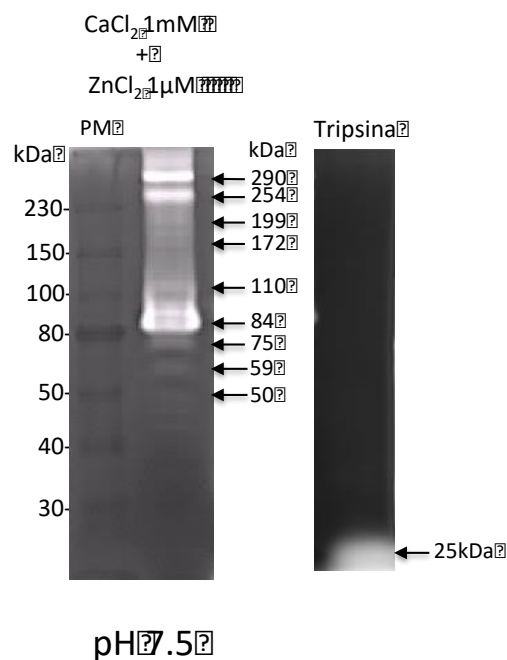


**Figura 15. Perfil proteolítico de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH) a pH 8.0 en presencia de diferentes cofactores.** La actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón se evaluó en presencia de pH 8.0 y diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> ó CaCl<sub>2</sub>. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 8.0 en presencia de los diferentes cofactores o agente reductor. Los gels se incubaron durante 18 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular.

## 8.2 Detección del perfil proteolítico de extractos totales de taquizoitos en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina bajo condiciones óptimas

Con la finalidad de evaluar el efecto que propicia la combinación de las condiciones óptimas, nos propusimos analizar mediante zimografía el ET bajo las siguientes condiciones: Tris-HCl 100 mM, pH 7.5; ZnCl<sub>2</sub> 1 μM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM.

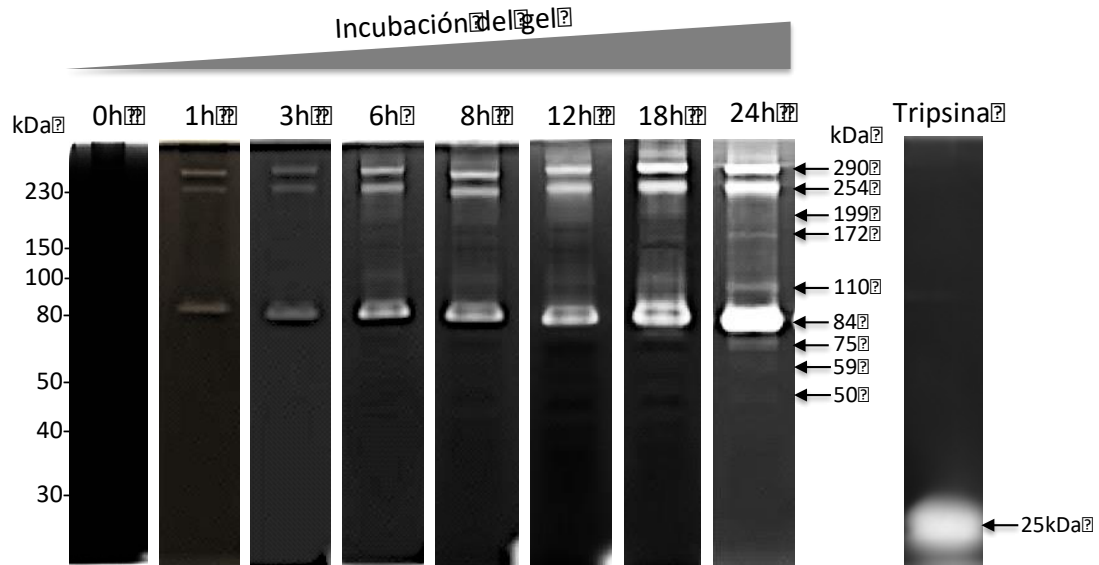
La combinación de estas condiciones resultó en la resolución de al menos nueve proteasas, es decir, bajo estas condiciones se logró visualizar tres proteasas más con pesos moleculares inferiores a 80 kDa (Figura 16). En total nuestro sistema detectó nueve proteasas, con pesos aproximados de 290 kDa, 254 kDa, 199 kDa, 172 kDa, 110 kDa, 84 kDa, 75 kDa, 59 kDa y 50 kDa.



**Figura 16. Perfil proteolítico de extractos totales *Toxoplasma gondii* (RH) en condiciones óptimas.** La actividad proteolítica de extractos totales de 10x10<sup>6</sup> taquizoítos aislados de **ratón** se evaluó en condiciones óptimas. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de ZnCl<sub>2</sub> 1 μM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel acrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. PM: peso molecular.

Con la finalidad de optimizar la detección de proteasas en el gel, decidimos incrementar el tiempo de incubación hasta 24 h, cabe destacar que hasta el momento todos los ensayos zimográficos se habían incubado por 18 h. Realizamos un curso temporal de incubación del gel desde 0 h hasta 24 h, con la finalidad de observar la expresión progresiva de las actividades proteolíticas más abundantes desde tiempos cortos y de precisar el peso molecular de las proteasas responsables de dichas actividades.

A las 24 h de incubación del gel logramos observar una mejor definición de las bandas de degradación; sin embargo, seguimos observando las mismas nueve bandas que se observaban a las 18 h, pero con una mejor resolución (Figura 17). Como podemos observar, desde 1 h de incubación ya existe actividad proteolítica del sustrato, observándose inicialmente tres bandas de degradación, la de 84 kDa y dos de alto peso molecular: 254 kDa y 290 kDa. Lo cual nos indica que estas tres proteasas son o las más abundantes o las más activas con respecto a las demás. Por cuestiones prácticas en la presentación de las imágenes decidimos, a partir de esta imagen (Figura 17), omitir el carril del peso molecular (PM).



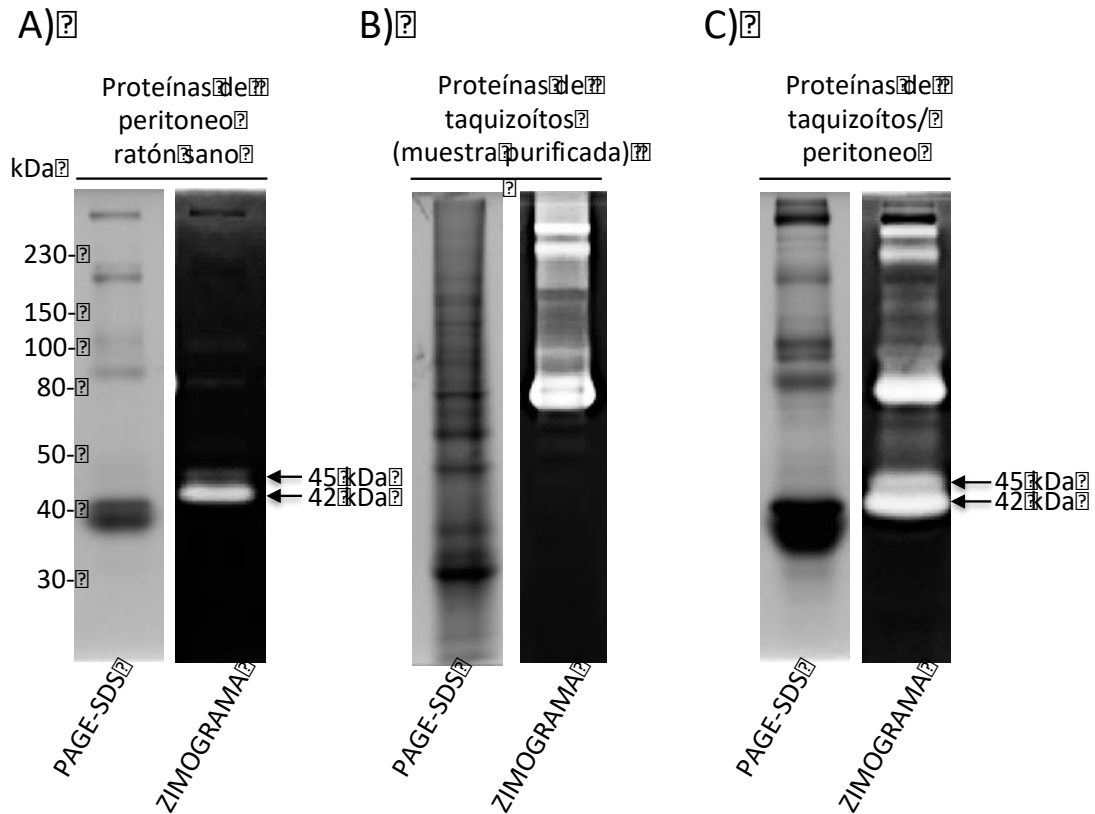
**Figura 17. Curso temporal de actividad proteolítica exhibida en extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH).** La expresión de la actividad proteolítica en extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de **ratón** se evaluó en un curso temporal de 0-24 h. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y en presencia de  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$  y  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Los geles se incubaron hasta 24 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.

### 8.3 Las proteasas detectadas provienen exclusivamente de *Toxoplasma gondii*

Con la finalidad de corroborar que las proteasas que hemos detectado son exclusivas de los ET de *T. gondii*, y no son producto de contaminantes del sistema murino del cual fueron aislados los taquizoítos (proteasas del peritoneo del ratón o componentes celulares), decidimos analizar las proteasas presentes en el peritoneo del ratón bajo diferentes condiciones: exudados peritoneales de ratones sanos, a los que se les había inoculado a nivel peritoneal previamente con PBS o con aceite mineral con los mismos volúmenes en que se hace la infección con taquizoítos; a los tres días post-inoculación se analizó la actividad proteolítica de los exudados recuperados. El aceite mineral fue empleado con la finalidad de producir en el peritoneo irritación, y consecuentemente un reclutamiento de macrófagos, simulando el reclutamiento que propicia la

infección con *T. gondii*. En ambos sistemas de ratones sanos (PBS y aceite mineral), obtuvimos patrones similares al mostrado en la Figura 18 inciso A, donde se evidencian las proteasas presentes en el peritoneo de un ratón sano.

Ahora, con la finalidad de corroborar que nuestro proceso de purificación de los parásitos por lavados y filtraciones eliminó las proteasas presentes en el exudado peritoneal proveniente de células del hospedero, comparamos el patrón proteolítico de ET de taquizoítos que fueron purificados (Figura 16, inciso B) y ET de taquizoítos que no fueron purificados corriéndose el ensayo con la mezcla de taquizoítos y líquido peritoneal del ratón (Figura 16, inciso C). Los ET de taquizoítos a los que no se les realizó el proceso de purificación, conservaron las proteasas contaminantes presentes en el peritoneo de un ratón sano junto con las actividades proteolíticas descritas para el extracto puro de taquizoítos (Figura 18, inciso C). En contraste, cuando los parásitos fueron lavados mediante nuestro proceso de purificación, observamos que se eliminaron por completo las proteasas contaminantes, quedando exclusivamente las proteasas pertenecientes a los taquizoítos (Figura 18, inciso B.) Con este resultado corroboramos que con nuestro método de purificación estamos eliminando exitosamente las proteasas contaminantes que se encuentran en el peritoneo de un ratón sano, por ende, las proteasas observadas mediante zimografía son exclusivas de taquizoítos de *T. gondii*.



**Figura 18. Las proteasas detectadas son exclusivas de *Toxoplasma gondii*.**

A) Detección de proteasas presentes en el exudado de ratones sanos inoculados con aceite mineral o PBS; B) detección de proteasas cuando la muestra se purificó y ajustó a  $10 \times 10^6$  tachizoitos y C) detección de proteasas cuando la muestra no se purificó y simplemente se ajustó a  $10 \times 10^6$  tachizoitos. Tanto los ratones sanos inoculados con aceite mineral como los inoculados con PBS presentaron el mismo patrón de proteólisis mostado en A). La purificación se realizó como se describe en materiales y métodos. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$  y  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.

#### 8.4. Identificación de las proteasas presentes en extractos totales de *Toxoplasma gondii* mediante el uso de inhibidores específicos.

Con la finalidad de identificar a qué familia pertenecen las proteasas detectadas en nuestro sistema, se utilizaron inhibidores para las diferentes familias de proteasas. En nuestros ensayos de inhibición se utilizó: TPCK, TLCK y PSMF como inhibidores de SP; E64 como inhibidor de CP; Pepstatina A como inhibidor

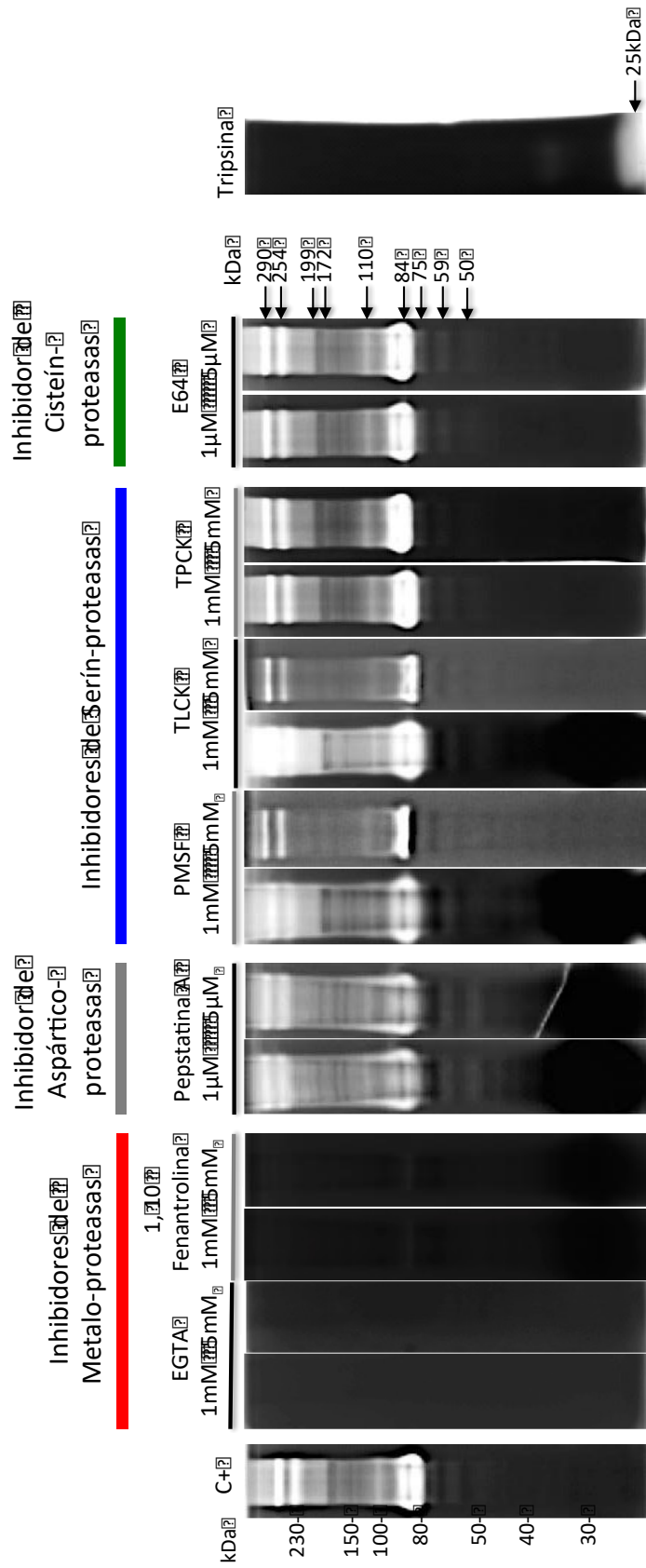
de AP y EGTA y 1, 10 fenantrolina como inhibidores de MP. Las concentraciones empleadas en nuestros ensayos se decidieron con base en reportes anteriores o bien en la hoja técnica del producto; se evaluaron dos diferentes concentraciones para cada inhibidor.

Con respecto a los inhibidores de metaloproteasas: EGTA y 1, 10 fenantrolina, desde las concentraciones más bajas empleadas, observamos la inhibición total de la actividad proteolítica (Figura 19). En contraste, con ningunos de los inhibidores de las otras familias de proteasas se observó inhibición en la actividad proteolítica.

Cabe destacar que para el caso de 1,10 fenentrolina, se detectó sólo una mínima actividad de proteólisis de la banda de 84 kDa, que en el gel es casi imperceptible y sólo el análisis densitométrico la evidenció. Posiblemente al incrementar la concentración del inhibidor a 10 mM se logre apagar la actividad por completo.

Como dato, la hoja técnica del producto menciona que este inhibidor es efectivo a concentraciones entre 1-10 mM (Disponible en: <https://www.sigmaldrich.com>).

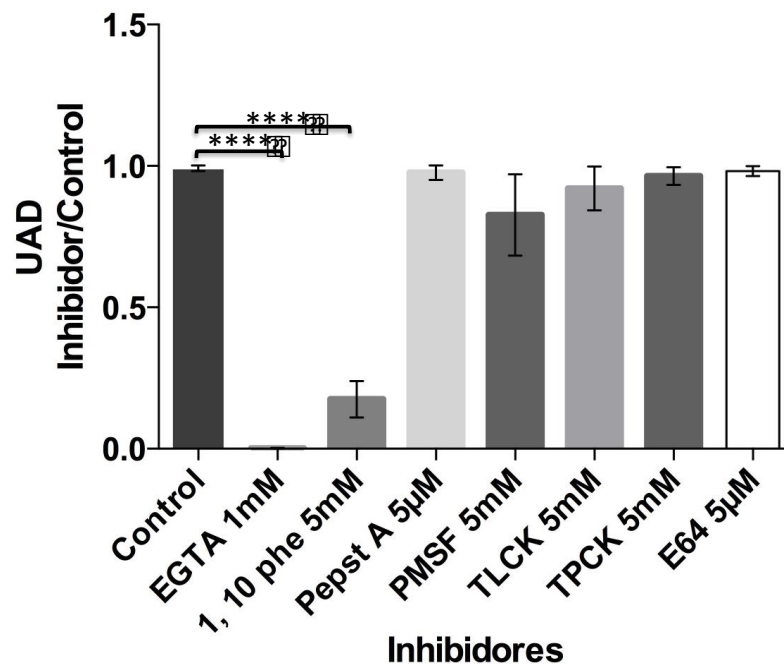




**Figura 19. Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH).** Se evaluó el efecto de diferentes inhibidores en actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de **ratón**. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó en presencia de los inhibidores en diferentes concentraciones a pH 7.5 y presencia de  $ZnCl_2$  1 μM y  $CaCl_2$  1 mM. Los gels se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control positivo se trató a la muestra bajo las mismas condiciones en ausencia de inhibidor (C+). Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.

Con la finalidad de buscar diferencias estadísticas de los resultados obtenidos en los zimogramas, decidimos realizar la cuantificación de las bandas de degradación mediante densitometría. Para ello, analizamos la banda más abundante, la de 84kDa, mediante el programa Image J. Los datos fueron normalizados con el control positivo de cada ensayo. Como se puede observar en la Gráfica 1, únicamente la actividad de los inhibidores EGTA y 1, 10 fenantrolina mostraron diferencias estadísticas, con una  $p < 0.0001$ . Para los demás inhibidores no hubo diferencias.

Este resultado nos indica que las proteasas presentes en los ET de *T. gondii* son metaloproteasas, las cuales dependen de pH alcalino y  $Ca^{+2}$  para su actividad y que fueron inhibidas mediante el uso de agentes quelantes como el EGTA y 1, 10 fenantrolina.



**Gráfica 1. Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH) medido mediante densitometría.** El análisis densitométrico se realizó midiendo la intensidad de la banda de 84 kDa de cada perfil proteolítico problema (Image J). La medición se normalizó con el control positivo de cada ensayo. Los valores se muestran promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ). Estadística: prueba t de dos colas para muestras no pareadas (GraphPad Prism). UAD: Unidades Arbitrarias de Densitometría.

### **8.5 Proteasas presentes en los productos de excreción/secreción de taquizoitos de la cepa RH aislados de ratón**

De acuerdo a los ensayos anteriores, tenemos certeza que existen proteasas en el parásito que pueden ser detectadas mediante zimografía. El paso siguiente a evaluar fue la búsqueda de proteasas en los productos de excreción/secreción (E/S) del parásito pensando en que estas pudieran ser moléculas efectoras involucradas en la virulencia de este parásito.

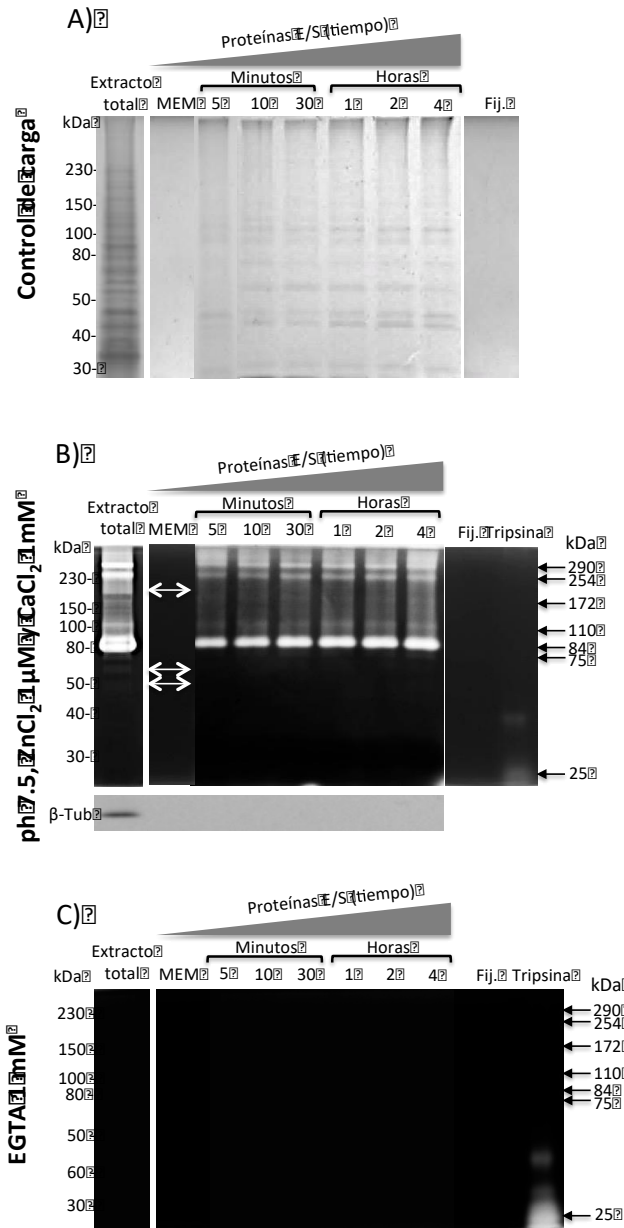
Con la finalidad de conocer si el parásito secreta proteasas a diferentes tiempos, primeramente decidimos conocer el patrón de secreción o de excreción de componentes proteicos en un curso temporal desde 5 min hasta 4 h. Los productos de E/S fueron analizados mediante SDS-PAGE convencional como control de carga y tinción con nitrato de plata así como con ensayos zimográficos.

Primero, analizamos los productos de E/S en geles SDS-PAGE convencionales. Para ello los parásitos se dejaron en reposo con agitación cada 30 min resuspendidos en medio MEM sin suero; al término del periodo de incubación el sobrenadante se cosechó por centrifugación a los diferentes tiempos, se precipitaron las proteínas y se analizaron por electroforesis. Al realizar el ensayo se detectó desde los 5 min de incubación la presencia de productos de E/S, que correspondieron a proteínas que se liberaron de manera constitutiva y que cuya concentración aparentemente incrementó de acuerdo al tiempo transcurrido (Figura 20, inciso A).

Con la finalidad de evaluar la presencia de proteasas en los productos de E/S, analizamos la muestra de diferentes tiempos de incubación mediante zimografía. En los productos de E/S hay proteasas, mismas que son liberadas por el parásito de forma constitutiva. De manera interesante, podemos observar que desde tiempos cortos como 5 min ya hay liberación de proteasas y que esta liberación aparentemente se mantiene e incrementa conforme el tiempo (Figura 20, inciso B). Con ayuda del zimograma correspondiente a los productos de E/S, fue evidente la existencia de proteasas que no están presentes en los productos de

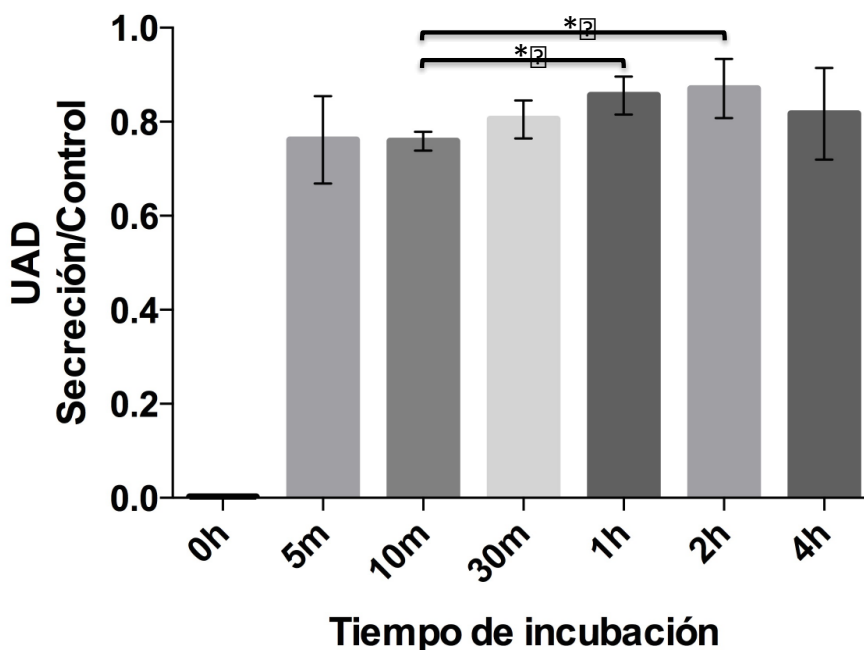
E/S pero sí en los ET (indicado con flechas blancas) como ocurrió para las proteasas de 199 kDa, 59 kDa y 50 kDa (Figura 20, inciso B). No descartamos la posibilidad de que estas proteasas puedan secretarse de manera diferencial y requieran más tiempo de incubación para lograr su detección. Sin embargo, no utilizamos periodos de incubación más largos puesto se compromete la viabilidad del parásito.

De forma paralela, se evaluó el curso temporal de la detección de proteasas en los productos de E/S en presencia del inhibidor de metaloproteasas EGTA a una concentración de 1 mM. Como se puede observar en la Figura 20 inciso C, la actividad de estas proteasas fue inhibida para todos los tiempos de incubación corroborando que las actividades observadas correspondían a metaloproteasas de E/S (Figura 20, inciso C).



**Figura 20. Perfil proteolítico de proteasas presentes en los productos de excreción/secreción de *Toxoplasma gondii* (RH).** Se evaluó la presencia de proteasas en los productos de excreción/secreción de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón. A) perfil proteico de productos de E/S en diferentes tiempos; el gel se tiñó con nitrato de plata; B) perfil proteolítico de proteasas presentes en la muestra a diferentes tiempos y C) efecto del EGTA 1 mM en el perfil proteolítico. La incubación de la muestra se realizó a 37 °C durante los diferentes tiempos. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de  $ZnCl_2$  1  $\mu M$  y  $CaCl_2$  1 mM. Para el inhibidor el gel se lavó e incubó en las mismas condiciones que el control pero en presencia de EGTA 1 mM. Como controles: parásitos fijados (Fij.) con glutaraldehído al 1%,  $\beta$ -tubulina como control de no-lisis y MEM sin suero donde se realizó la secreción. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. La viabilidad fue >99% al inicio y >96% al término del ensayo.

Con la finalidad de buscar diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos a los diferentes tiempos de incubación, se realizó la densitometría de los zimogramas. La secreción de componentes por el parásito de manera constitutiva se mantuvo con relación a los 5 min; sin embargo, existen diferencias que indicaron que para los tiempos de 1 y 2 h el parásito secretó en mayor medida y de manera significativa, con respecto a los 10 min de secreción (Gráfica 2). Las significancia se presentó con una  $p < 0.05$  para ambos casos.



**Gráfica 2. Secreción de proteasas de forma constitutiva a diferentes tiempos determinado mediante densitometría.** El análisis densitométrico se realizó midiendo la intensidad de la banda de 84 kDa de cada perfil proteolítico problema (Image J). La medición se normalizó con el control positivo de cada ensayo (ET de  $10 \times 10^6$  taquizoítos). Los valores se muestran promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* ( $p < 0.05$ ). Estadística: prueba t de dos colas para muestras no pareadas (GraphPad Prism). UAD: Unidades Arbitrarias de Densitometría.

Cabe destacar que el sistema no nos permitió analizar la muestra en un tiempo de 0 h, dado que el parásito proveniente de ratón se encuentra tan activo que detectamos proteínas y proteasas incluso a ese tiempo, debido a que el parásito sigue secretando proteasas incluso en el proceso de resuspensión de la muestra

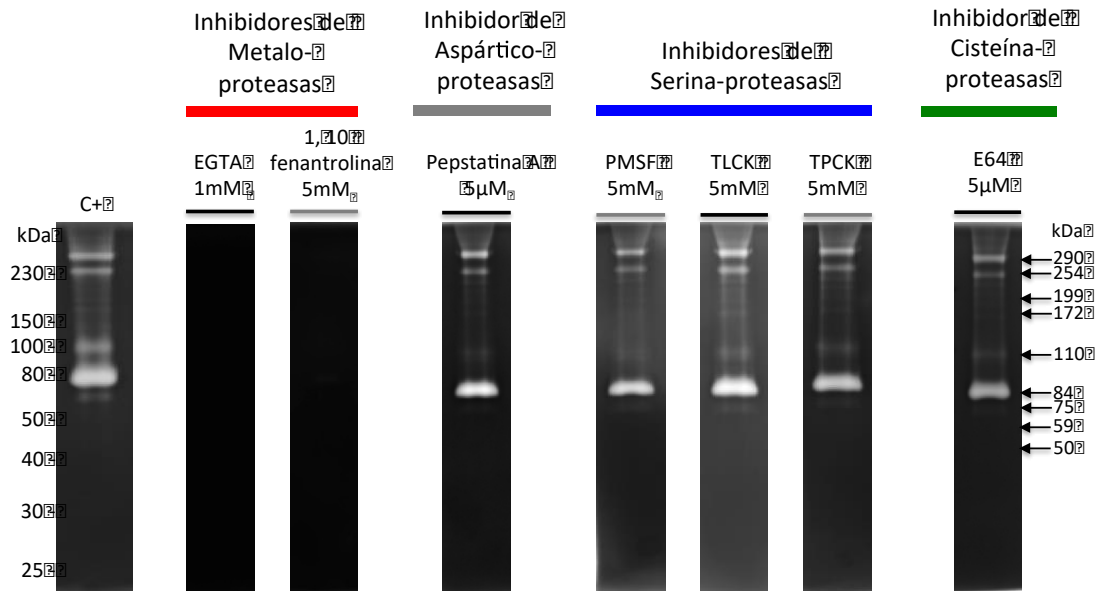
y periodo de centrifugación. Por lo anterior, decidimos iniciar el curso temporal desde los 5 min.

Como controles en el ensayo utilizamos parásitos fijados con glutaraldehído al 1%. Estos parásitos, como era de esperarse, no manifestaron secreción alguna en ninguno de los tiempos evaluados. Como control de que no hay lisis de parásitos se trató de detectar a la proteína citoplásmica  $\beta$ -tubulina; la ausencia de esta marca nos corroboró que en todo el tiempo que transcurrió el ensayo no hubo lisis de los parásitos. Como control negativo se utilizó MEM sin suero. Como control adicional, se analizó la viabilidad de los taquizoítos a lo largo de todo el experimento mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano antes y después de cada ensayo. El resultado mostró una viabilidad >99% al inicio del ensayo y >96 al finalizar los tiempos más largos de incubación.

Con lo anterior podemos concluir que el parásito secreta proteasas de manera constitutiva. Las proteasas detectadas se encuentran presentes desde tiempos cortos como 5 min y permanecen hasta tiempos largos como 4 h. Concluimos también que no todas las proteasas detectadas en los ET se secretan, existen por lo menos tres que no son detectadas en los productos de E/S bajo estas condiciones.

Como se mencionó previamente, se evaluó el curso temporal de la detección de proteasas en los productos de E/S en presencia del inhibidores de metaloproteasas EGTA a 1 mM. Como se puede observar en la Figura 20 inciso C, la actividad de estas proteasas fue inhibida para todos los tiempos de incubación corroborando que las actividades observadas correspondían a metaloproteasas de E/S (Figura 20, inciso C). Como complemento a este ensayo, evaluamos el efecto de los inhibidores de proteasas anteriormente utilizados sobre los productos de E/S a las 2 h de secreción, tiempo en que se obtiene la mayor actividad de proteólisis en la muestra (Gráfica 2). Ningún inhibidor afectó la actividad de las proteasas, con excepción de EGTA y 1, 10 fenantrolina (Figura

21), resultado que confirma que las proteasas presentes en los productos de secreción son metaloproteasas.



**Figura 21. Efecto de inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de los productos de excreción/secreción de *Toxoplasma gondii* (RH).** El efecto de diferentes inhibidores se evaluó en la actividad proteolítica de productos de excreción/secreción de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de **ratón**. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó en presencia de los inhibidores a pH 7.5 y presencia de  $ZnCl_2$  1  $\mu$ M y  $CaCl_2$  1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control positivo se trató a la muestra bajo las mismas condiciones en ausencia de inhibidor (C+). Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.

El detectar proteína y por ende proteasas desde tiempos cortos, nos muestra la gran capacidad de secreción con la que cuenta el parásito aislado de nuestro sistema *in vivo*. Pensamos que la alta capacidad de secreción de este parásito le pudiera funcionar como mecanismo para llevar a cabo procesos como invasión, diseminación y protección contra el sistema inmune en el sistema *in vivo*. La alta capacidad de secreción estaría dada por inductores presentes en el organismo, como componentes de MEC, macrófagos, factores del complemento, etc.

Si el anterior razonamiento fuera cierto, entonces se podría hipotetizar que en los taquizoítos aislados de cultivo celular, mismos que no están sujetos a la



presión ambiental producida por las células y moléculas del sistema inmune o al impedimento ejercido por la existencia de las barreras biológicas, podríamos ver una capacidad de secreción disminuida reflejada en los productos de E/S y en particular en las proteasas detectadas. Con base en lo anterior, se procedió a evaluar la presencia de proteasas en productos de E/S procedentes de taquizoítos aislados y purificados de cultivos celulares de la línea HEP-2 infectados con la cepa RH de *T. gondii*.

### **8.6 Proteasas presentes en los extractos totales de taquizoitos de la cepa RH mantenidos en cultivo celular**

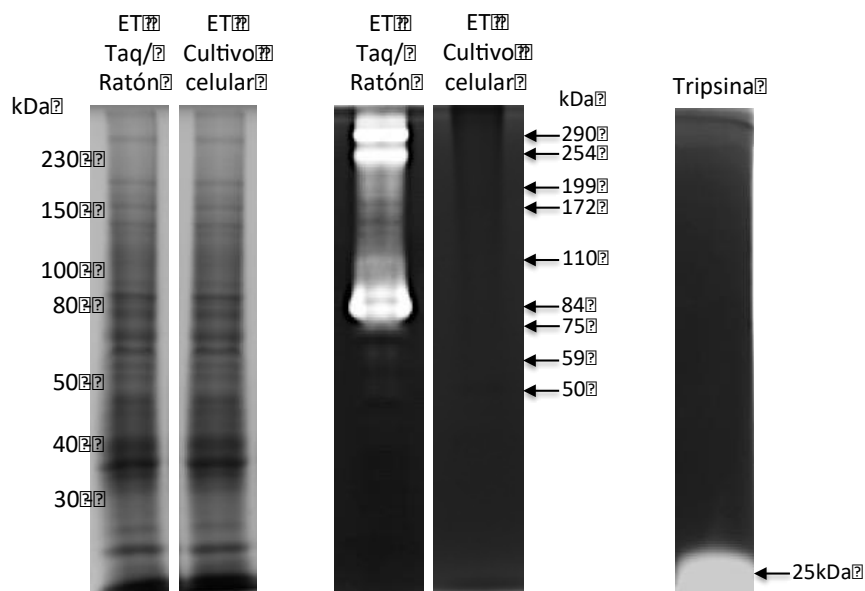
Como sabemos, *T. gondii* tiene la capacidad de invadir de manera eficiente a prácticamente todas las células nucleadas de los organismos de sangre caliente. No obstante, decidimos utilizar a las células HEP-2 como modelo para mantener la cepa RH en cultivo celular principalmente por ser el sistema de uso cotidiano en nuestro laboratorio, conocemos sus propiedades morfológicas y su dinámica de replicación; además el sistema nos proporcionó taquizoitos cada tercer o cuarto día, a la par del modelo *in vivo*. Adicionalmente, al ser una célula epitelial, representa de alguna forma una de las barreras a las que se somete el parásito cuando atraviesa el intestino o cuando atraviesa los endotelios vasculares durante la diseminación tisular.

Con el fin de evaluar la presencia de proteasas en los ET de taquizoitos aislados de cultivo celular, se analizaron parásitos aislados del cultivo celular que mantenemos normalmente en el laboratorio. El análisis de zimogramas se realizó siguiendo la misma estrategia experimental que la aplicada para taquizoítos aislados de ratón (mismos cofactores, pH y técnica zimográfica).

De manera sorprendente, los taquizoitos aislados de cultivo celular en el mismo número que los aislados de ratones infectados, no presentaron actividad proteolítica del sustrato, un resultado que fue reproducido en al menos seis ocasiones (Figura 22). Resultado que nos parece dramático si lo comparamos

con la actividad que presentaron en todo momento los taquizoítos aislados del modelo *in vivo*. Antes de lisar los parásitos, evaluamos la viabilidad de la muestra mediante exclusión de azul de tripano siendo siempre >97%.

Con este resultado no afirmamos que el parásito de cultivo celular deje de expresar las proteasas que presentan los parásitos aislados de ratón, sino que el parásito aislado de cultivo celular las expresa de manera diferencial, posiblemente en cantidades tan bajas que ya no sean detectadas mediante el método de zimografía bajo las condiciones aquí descritas.



**Figura 22. Comparación del perfil proteolítico de extractos totales *T. gondii* (RH) aislados de ratón y de cultivo celular.** La actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de **ratón** y de **cultivo celular** se evaluó bajo las mismas condiciones. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de  $ZnCl_2$  1  $\mu$ M y  $CaCl_2$  1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.

### 8.7 Productos de excreción/secreción de taquizoítos de la cepa RH aislados de cultivo celular

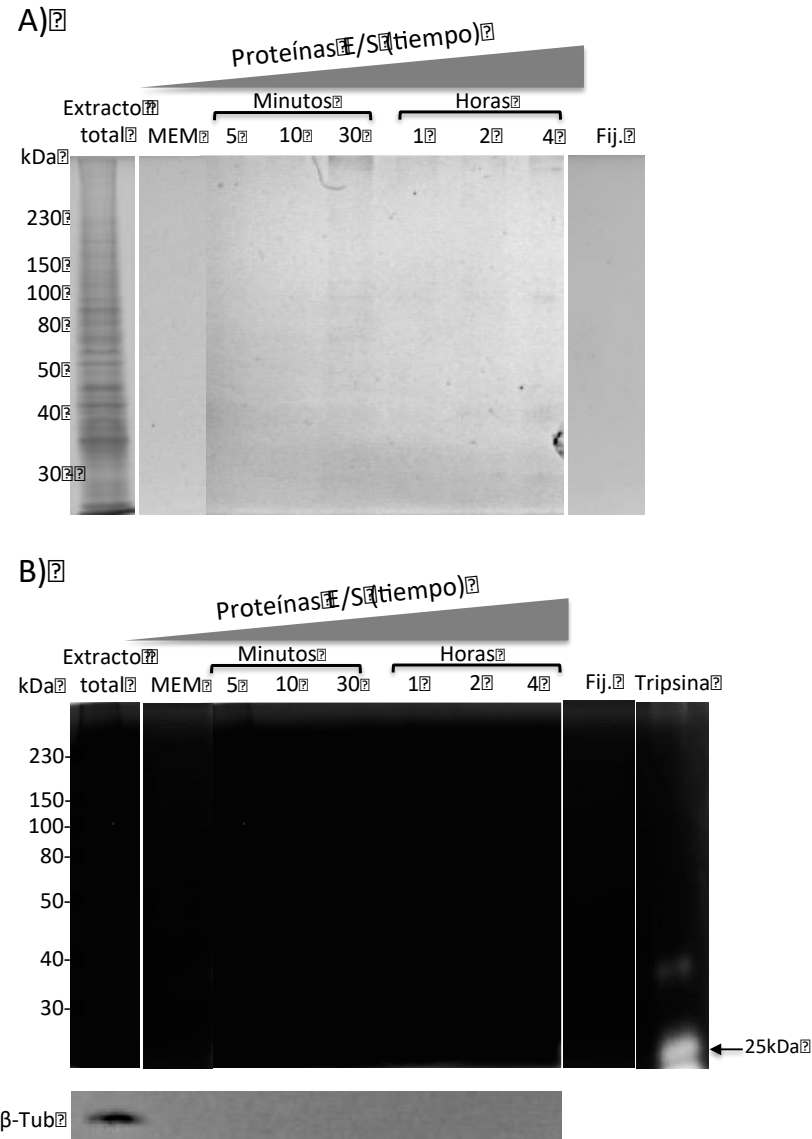
Hasta el momento, observamos claras diferencias en la expresión de proteasas en los ET de taquizoítos aislados de ratones infectados o de cultivos celulares.

Con la finalidad de evaluar si estas diferencias en expresión de proteasas también ocurre para los productos de E/S de parásitos aislado de cultivo celular, realizamos un curso temporal con las mismas características que el realizado para productos de E/S de parásitos aislados de ratón.

Inicialmente se observó que para ningún tiempo de incubación del parásito se detectaron proteínas secretadas y detectadas mediante la tinción con nitrato de plata (Figura 23, inciso A). Este resultado nos pareció sumamente interesante puesto que los parásitos aislados de ratón muestran una capacidad secretora evidente en el sistema desde los 5 min.

Con la finalidad de evaluar las proteasas presentes en los productos de E/S, analizamos la muestra mediante zimografía. Lo que observamos fue que para ningún tiempo de secreción del parásito se detectó la secreción de proteasas, ni incluso a tiempos largos (Figura 23, inciso B). Este resultado nos parece dramático, puesto que los taquizoítos aparte de secretar en menor cantidad, también expresan las proteasas de manera diferencial.

Sabemos que el parásito debe secretar para cumplir con su rol de invasión en cultivo celular, por lo que decidimos realizar un ensayo más sensible que la tinción con nitrato de plata para evidenciar la presencia de proteínas secretadas por los taquizoítos de manera constitutiva. En nuestro laboratorio contamos con un anticuerpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii*, el cual nos sirvió para llevar a cabo este ensayo mediante la técnica de Western Blot en los sobrenadantes recuperados. Los resultados mostraron que los parásitos aislados de cultivo celular secretaron proteínas desde tiempos cortos y con una intensidad similar en todos los tiempo evaluados (Figura 24, inciso A).

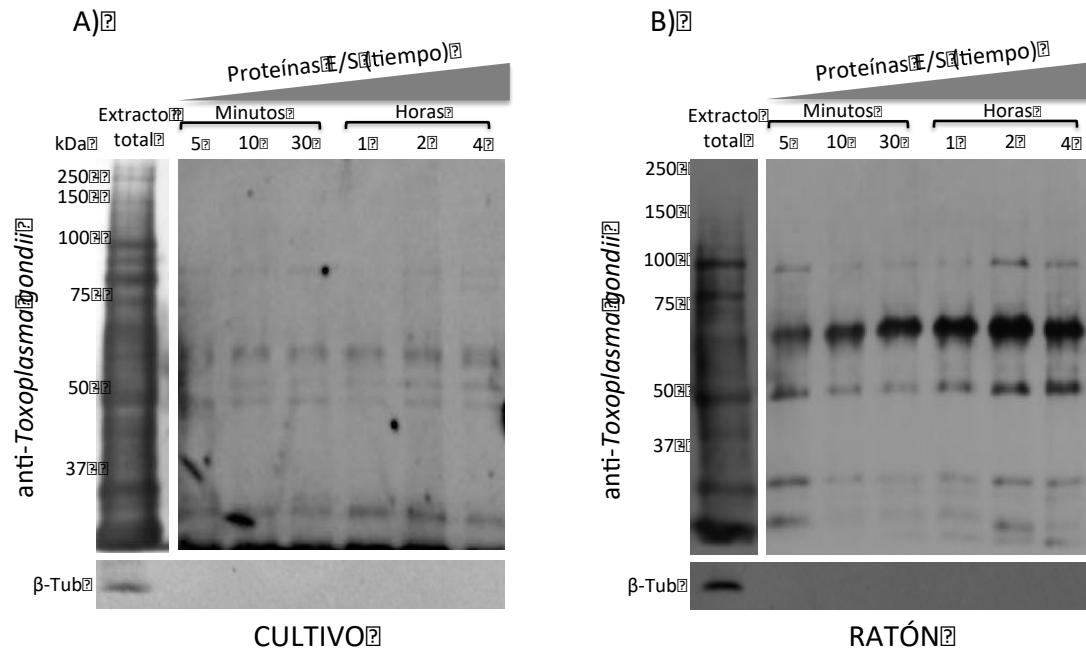


**Figura 23. Ausencia proteólisis en los productos de excreción/secreción de *Toxoplasma gondii* (RH).** La presencia de proteasas se evaluó en los productos de excreción/secreción de  $20 \times 10^6$  taquizoítos aislados de **cultivo celular**. A) perfil de los productos E/S a diferentes tiempos; el gel se tiñó con nitrato de plata y B) ausencia de proteólisis de sustrato por la muestra a diferentes tiempos. La incubación de la muestra se realizó a 37 °C durante los diferentes tiempos. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$  y  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Como controles: parásitos fijados (Fij.) con glutaraldehído al 1%,  $\beta$ -tubulina como control de no-lisis y MEM sin suero donde se realizó la secreción. Los gels se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%. La viabilidad fue >99% al inicio y >95% al término del ensayo.

A la par con este ensayo, realizamos un Western Blot de la misma manera pero con los productos de E/S de taquizoítos aislados de ratón (Figura 24, inciso B). Este resultado nos sirvió para comparar el comportamiento de los parásitos de cultivo con los aislados de ratón. Al compararlos, observamos que ambos sistemas presentan proteínas desde los 5 min; en el caso del modelo animal (Figura 24, inciso B) es evidente que se secreta una mayor cantidad de proteínas siendo las más abundantes las de masas de aproximadamente 50 kDa, 60 kDa y 98 kDa, en comparación con el modelo celular (Figura 24, inciso A). Interesantemente el patrón de proteínas secretadas en toxoplasmas de cultivo es aparentemente diferente que el patrón de proteínas secretadas por los taquizoítos provenientes de ratón.

Los resultados anteriores nos indican que los parásito del sistema *in vitro* tiene una menor capacidad de secreción que sus homólogos *in vivo*. Esta condición nos hace pensar que posiblemente el parásito de cultivo celular no este expresando proteínas que no requiere utilizar *in vitro*, incluyendo proteasas. Sería muy interesante saber qué otras proteínas no se están secretando.

Creemos que el parásito *in vivo* secreta componentes que le permiten: evadir el sistema inmune, degradar componentes de la MEC para lograr invadir, atravesar barreras biológicas y diseminarse por todo el organismo. Esta capacidad secretora pudiera estar dada por estas proteasas que el sistema *in vivo* le induce al parásito a secretar. Moléculas como componentes de la MEC, factores del complemento entre otros pudieran estar implicados en la inducción de estas proteasas. En cambio, el parásito de cultivo celular no tiene ningún inductor en el medio, este parásito se encuentra en condiciones ideales que le permiten únicamente invadir la célula, proliferar exitosamente y exteriorizarse.



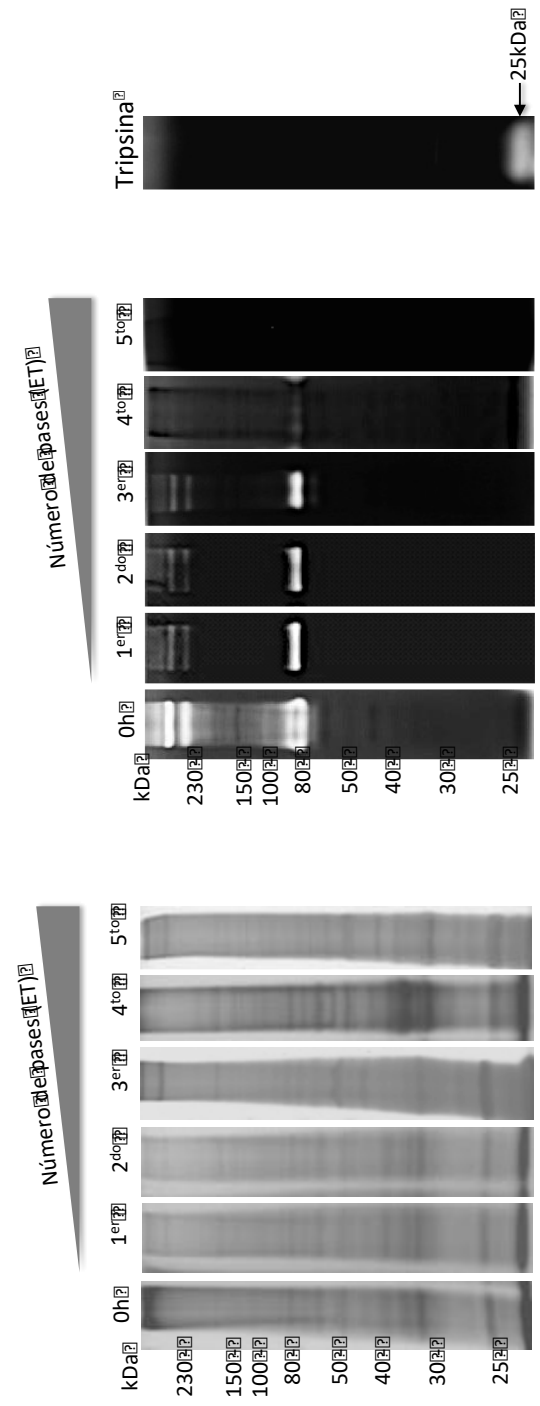
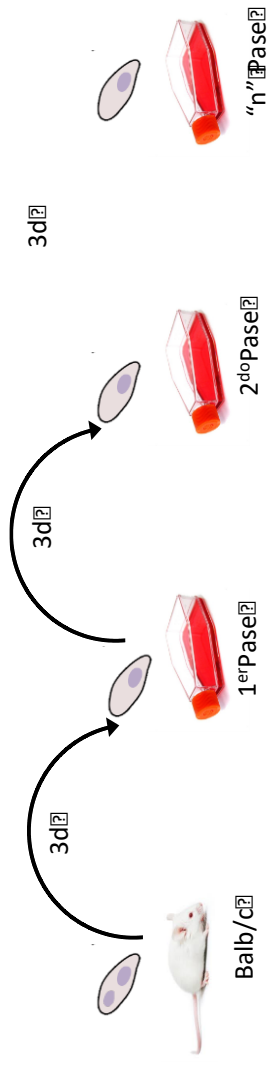
**Figura 24. Inmunodetección de proteínas presentes en los productos de excreción/secreción de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (RH) aislados de ratón y cultivo celular a través del tiempo.** Se analizaron 20 µg de proteína de excreción/secreción obtenida de ambos sistemas. Como control positivo se cargó 20 µg de extracto total de taquizoítos de su correspondiente sistema y se detectó β-tubulina como control de no-lisis. Anticuerpo primario: policlonal conejo-*anti-Toxoplasma gondii* 1:1,000. Anticuerpo secundario: chivo *anti-conejo* IgG conjugado a HRP 1:7,000.

### 8.8 Disminución consecutiva de la expresión de proteasas de taquizoítos aislados de ratón e ingresados a cultivo celular a diferentes pases

Con la finalidad de esclarecer el proceso mediante el cual los parásitos de cultivo dejan de expresar estas proteasas, analizamos ET de parásitos aislados de ratones infectados e inoculados a cultivos de células HEP-2 siguiendo los pases celulares.

Desde el primer pase celular, los parásitos presentaron un decremento en la actividad proteolítica del sustrato, el cual siguió disminuyendo conforme se aumentaba el número de pases por las células en cultivo. Cada pase se realizó cada 72 h, simplemente rompiendo las células, cosechando los parásitos, ajustando el número e inoculando cultivos nuevos de células HEP-2. Al quinto pase ya no se detectó actividad proteolítica en los taquizoítos aislados (Figura

25). Este resultado nos pareció muy interesante, y representa un proceso por el cual el parásito se adapta de un modelo animal a uno de células cultivadas, remodelando su mecanismos biosintético para dejar de expresar ciertas proteínas, algunas de ellas proteasas. En un transcurso de 15 días aproximadamente, los taquizoítos dejan de expresar estas proteasas en tal cantidad que ya no son detectadas por nuestro sistema. No tenemos certeza si se dejan de expresar completamente las proteasas o lo hacen pero en cantidades no detectables mediante zimografía. Interesantemente, en el gel teñido con azul de Coomassie sin sustrato no se notan cambios evidentes en los patrones electroforéticos de los diferentes pases estudiados.



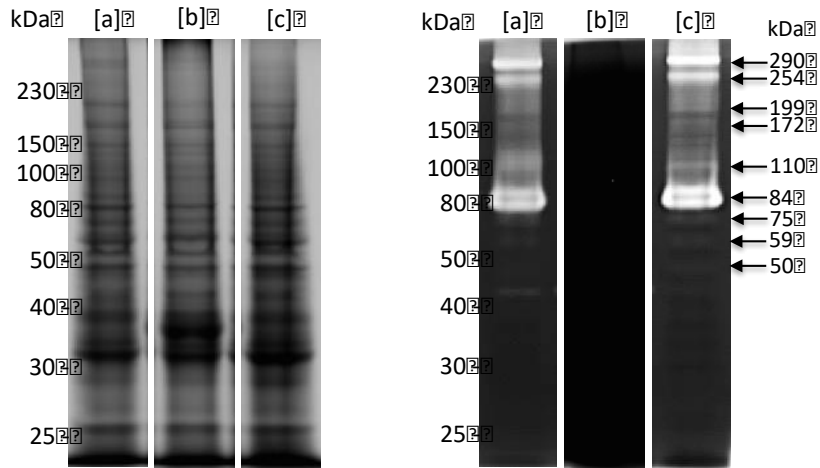
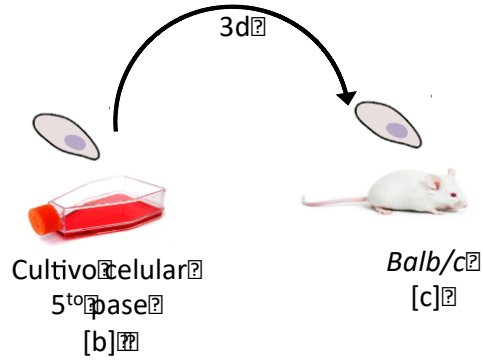
**Figura 25. Perfil proteolítico en curso temporal de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH) en diferentes pases de cultivo celular.** La actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de cultivo celular se evaluó a los diferentes pases bajo las mismas condiciones. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de  $ZnCl_2$   $1 \mu M$  y  $CaCl_2$   $1 mM$ . Los gels se incubaron durante 24 h a  $37^\circ C$ . Como control positivo Tripsina 100ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.



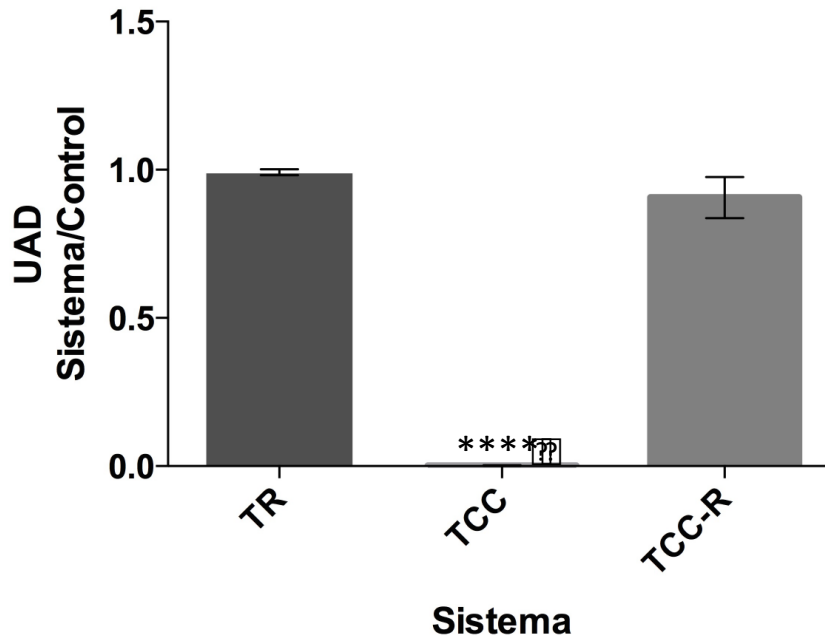
### **8.9 Retorno de la actividad proteolítica en los taquizoítos mantenidos en cultivo celular y reingresados a ratón**

Con la finalidad de corroborar que la disminución en la expresión de proteasas es producido al mantener a los parásitos en cultivo celular, decidimos ahora revertir el proceso. Los taquizoítos de cultivo celular pertenecientes al quinto pase (mismos parásitos que ya no tienen actividad proteolítica evidenciable por zimografía), fueron inoculados a un ratones sanos. Tres días post-infección fueron sacrificados y se analizaron los ET de taquizoítos mediante zimografía.

Al reingresar los parásitos a su sistema *in vivo*, la capacidad de degradación de los parásitos se recuperó totalmente (Figura 26). Al realizar la densitometría de los ensayos, observamos que no existen diferencias entre la actividad de taquizoítos de ratón y los taquizoítos de cultivo celular reingresados a ratón (Gráfica 3). Con lo observado anteriormente, podemos decir que los mecanismos inductores para que el parásito exprese estas proteasas se encuentran en un modelo *in vivo*. Los principales responsables, pensamos, pudieran ser células como los macrófagos, factores de complemento, o componentes de MEC como laminina, fibronectina o colágena. Todos estos componentes no están presentes en el sistema *in vitro*.



**Figura 26. Retorno de la expresión de proteasas en taquizoítos aislados de cultivo celular y reingresados a ratón.** (a) Control de actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón; (b) extracto total de taquizoítos pertenecientes al 5<sup>to</sup> pase, misma muestra que se inoculó en ratón y (c) extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos **reingresados a ratón**. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de  $ZnCl_2$  1  $\mu$ M y  $CaCl_2$  1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control extracto total de taquizoítos de la misma muestra que se inoculó en ratón y extracto total de taquizoítos de ratón. Como control positivo Tripsina 100 ng. Gel de poliacrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.



**Gráfica 3. Recuperación de la expresión de proteasas de taquizoítos aislados de cultivo celular por reingreso al ratón medido mediante densitometría.** El análisis densitométrico se realizó midiendo la intensidad de la banda de 84 kDa de cada perfil proteolítico problema (Image J). La medición se normalizó con el control positivo de cada ensayo (ET de  $10 \times 10^6$  taquizoítos). Los valores se muestran promedio  $\pm$  SD (n= 3). \*\*\*\* (p<0.0001). Estadística: prueba t de dos colas para muestras no pareadas (GraphPad Prism). UAD: Unidades Arbitrarias de Densitometría.

### 8.10 Análisis bioinformático de metaloproteasas en *Toxoplasma gondii*

Con los resultados anteriores, se realizó una búsqueda bioinformática para ver qué es lo que ya se conoce de este parásito y si las proteasas con las características encontradas están identificadas.

En UniProt se encuentran disponibles los genomas de diferentes organismos, entre ellos *T. gondii*: ID 5811. Analizamos entonces el proteoma del parásito (ID: up000002226) con búsqueda avanzada: metaloprotease. El sistema nos arrojó que únicamente existen reportadas ocho metaloproteasas (Figura 27). Además sólo están reportadas para a cepa VEG de *Toxoplasma gondii* (cepa tipo II, virulencia intermedia).

Term  
All metallopeptase

AND Organism [OS] Toxoplasma gondii [5811]

AND Proteomes Proteome ID

Identifier  
up000002226

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
V5B1Y9	V5B1Y9_TOXGO	Aspartyl aminopeptidase (EC 3.4.11.21)	TGVEG_297970	Toxoplasma gondii	508
V4YPG9	V4YPG9_TOXGO	CAAX metallo endopeptidase (EC 3.4.24.84)	TGVEG_221170B	Toxoplasma gondii	200
V5BK98	V5BK98_TOXGO	M28 family peptidase	TGVEG_231130	Toxoplasma gondii	711
B9Q3Z6	B9Q3Z6_TOXGO	Peptidase family M3 protein (EC 3.4.24.59)	TGVEG_272670	Toxoplasma gondii	1,090
V4YK18	V4YK18_TOXGO	Peptidase family M3 protein	TGVEG_216150	Toxoplasma gondii	506
B9Q7W2	B9Q7W2_TOXGO	Peptidase, M28 family protein	TGVEG_225850	Toxoplasma gondii	1,555
V4ZWG5	V4ZWG5_TOXGO	Rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1 (EC 3.4.24.56)	TGVEG_269885A	Toxoplasma gondii	1,363
V5BMK2	V5BMK2_TOXGO	Rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1 (EC 3.4.24.56)	TGVEG_269885B	Toxoplasma gondii	354

**Figura 27. Análisis bioinformático de metaloproteasas presentes en el genoma de *Toxoplasma gondii*.** Proteoma disponible en: [http://www.uniprot.org/proteomes/?query=organism\\_id:5811](http://www.uniprot.org/proteomes/?query=organism_id:5811)

También se buscó la información reportada en la base de datos de MEROPS, sitio especializado en proteasas. Encontramos que para *T. gondii* hay más de cuarenta proteasas reportadas para las cepas VEG, ME49 y GT1 (cepas tipo II) (Figura 28), para la cepa RH (nuestro modelo de estudio) no existe información. Para las tres cepas de este parásito existe una amplia variedad de familia de metaloproteasas. Las metaloproteasas dependientes de  $Ca^{2+}$ , de acuerdo al sitio MEROPS, pertenecen a la familia M10. En esta familia se encuentran todas las metaloproteasas de matriz extracelular o MMPs. Como podemos observar en la Figura 28, ninguna de las metaloproteasas detectadas bioinformáticamente para *T. gondii* pertenece a esta familia. Lo anterior nos confirma que las proteasas

detectadas y caracterizadas en el presente trabajo no han sido reportadas para *T. gondii*.

Clan	Family	MEROPS ID	Peptidase or homologue (subtype)	MERNUM	Gene	Link	Locus
MA	M1	<a href="#">M01.005</a>	alanyl aminopeptidase (bacterial-type)	<a href="#">MER173247</a>			TGVEG_065130
MA	M1	<a href="#">M01.005</a>	alanyl aminopeptidase (bacterial-type)	<a href="#">MER175360</a>			TGGT1_078970
MA	M1	<a href="#">M01.005</a>	alanyl aminopeptidase (bacterial-type)	<a href="#">MER464764</a>			TGME49_024350
MA	M1	<a href="#">M01.005</a>	alanyl aminopeptidase (bacterial-type)	<a href="#">MER171420</a>			TGVEG_051960
MA	M3	<a href="#">M03.006</a>	mitochondrial intermediate peptidase	<a href="#">MER175413</a>			TGGT1_111970
MA	M3	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M3B unassigned peptidases	<a href="#">MER171804</a>			TGVEG_038150
MA	M3	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M3B unassigned peptidases	<a href="#">MER175394</a>			TGGT1_081590
MA	M13	<a href="#">unassigned</a>	family M13 unassigned peptidases	<a href="#">MER172314</a>			TGME49_102650
MA	M13	<a href="#">unassigned</a>	family M13 unassigned peptidases	<a href="#">MER090653</a>			TGVEG_050320
MA	M41	<a href="#">M41.007</a>	Afg3-like protein 2	<a href="#">MER170527</a>			TGME49_002630
MA	M41	<a href="#">M41.018</a>	AtFtsH11 peptidase	<a href="#">MER172093</a>			TGVEG_007780
MA	M41	<a href="#">M41.018</a>	AtFtsH11 peptidase	<a href="#">MER117609</a>			TGVEG_074980
MA	M48	<a href="#">M48.A08</a>	zmpste24 g.p. ( <i>Dictyostelium discoideum</i> -type)	<a href="#">MER171388</a>			TGME49_021170
MA	M76	<a href="#">M76.A03</a>	DDB_G0270738 g.p. ( <i>Dictyostelium discoideum</i> )	<a href="#">MER169278</a>			TGVEG_077340
MA	M76	<a href="#">unassigned</a>	family M76 unassigned peptidases	<a href="#">MER233763</a>			TGVEG_077340
MC	M14	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M14A unassigned peptidases	<a href="#">MER468743</a>			TGGT1_110670
MC	M14	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M14A unassigned peptidases	<a href="#">MER468737</a>			TGVEG_046430
MC	M14	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M14B unassigned peptidases	<a href="#">MER308850</a>			TGME49_265780
MC	M14	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M14B unassigned peptidases	<a href="#">MER382765</a>			TGGT1_002140
ME	M16	<a href="#">M16.003</a>	mitochondrial processing peptidase beta-subunit	<a href="#">MER315498</a>			TGME49_036210
ME	M16	<a href="#">M16.004</a>	chloroplast (stromal) processing peptidase	<a href="#">MER171202</a>			TGME49_035680
ME	M16	<a href="#">M16.008</a>	Ste23 peptidase	<a href="#">MER169218</a>			TGVEG_077440
ME	M16	<a href="#">M16.008</a>	Ste23 peptidase	<a href="#">MER173234</a>			TGVEG_104280
ME	M16	<a href="#">M16.018</a>	PreP2 peptidase ( <i>Arabidopsis</i> -type)	<a href="#">MER173258</a>			TGME49_027950

**Figura 28 parte 1. Análisis bioinformático de metaloproteasas presentes en el genoma de *Toxoplasma gondii*.** Proteoma disponible en: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp001059;type=peptidase>

Clan	Family	MEROPS ID	Peptidase or homologue (subtype)	MERNUM	Gene	Link	Locus
ME	M16	<a href="#">M16.021</a>	toxolysin-1	<a href="#">MER169735</a>	TLN1		TGVEG_017120
ME	M16	<a href="#">M16.022</a>	toxolysin-4	<a href="#">MER170820</a>	TLN4		TGVEG_042990
ME	M16	<a href="#">M16.985</a>	mitochondrial processing peptidase subunit alpha unit 2	<a href="#">MER043923</a>	MPPA		TGVEG_046660
ME	M16	<a href="#">M16.A12</a>	C05D11.1 g.p. ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	<a href="#">MER171700</a>			TGVEG_031390
ME	M16	<a href="#">non-peptidase homologue</a>	subfamily M16A non-peptidase homologues	<a href="#">MER511112</a>			TGME49_244490
ME	M16	<a href="#">non-peptidase homologue</a>	subfamily M16A non-peptidase homologues	<a href="#">MER469959</a>	TLN4		TGME49_206510
ME	M16	<a href="#">non-peptidase homologue</a>	subfamily M16B non-peptidase homologues	<a href="#">MER006277</a>	MPPA		TGVEG_046660
ME	M16	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M16B unassigned peptidases	<a href="#">MER005917</a>	cmp		TGVEG_061100
ME	M16	<a href="#">unassigned</a>	subfamily M16B unassigned peptidases	<a href="#">MER171226</a>			TGVEG_057140
MF	M17	<a href="#">M17.A03</a>	At2g24200 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<a href="#">MER175918</a>			TGVEG_084080
MG	M24	<a href="#">M24.001</a>	methionyl aminopeptidase 1 ( <i>Escherichia</i> -type)	<a href="#">MER394952</a>			TGME49_057730
MG	M24	<a href="#">M24.002</a>	methionyl aminopeptidase 2	<a href="#">MER485636</a>			TGVEG_106770
MG	M24	<a href="#">M24.007</a>	Xaa-Pro dipeptidase (eukaryote)	<a href="#">MER175449</a>			TGVEG_022240
MG	M24	<a href="#">M24.017</a>	methionyl aminopeptidase 1 (eukaryote)	<a href="#">MER170245</a>			TGVEG_002930
MG	M24	<a href="#">M24.028</a>	mitochondrial methionyl aminopeptidase	<a href="#">MER171947</a>			TGVEG_009210
MG	M24	<a href="#">M24.028</a>	mitochondrial methionyl aminopeptidase	<a href="#">MER169350</a>			TGVEG_076710
MG	M24	<a href="#">M24.032</a>	Mername-AA273 peptidase	<a href="#">MER481281</a>			TGVEG_073110
MG	M24	<a href="#">M24.A05</a>	At1g13270 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )-type peptidase	<a href="#">MER483166</a>			TGME49_011330
MH	M18	<a href="#">M18.A01</a>	At5g60160 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )-like peptidase	<a href="#">MER171894</a>			TGVEG_054730
MH	M20	<a href="#">M20.A03</a>	At5g56650 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<a href="#">MER171852</a>			TGVEG_034800
MP	M67	<a href="#">M67.A01</a>	At1g22920 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<a href="#">MER169101</a>			TGVEG_092900
MP	M67	<a href="#">M67.A11</a>	rpn-11 g.p. ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	<a href="#">MER169724</a>			TGVEG_017070

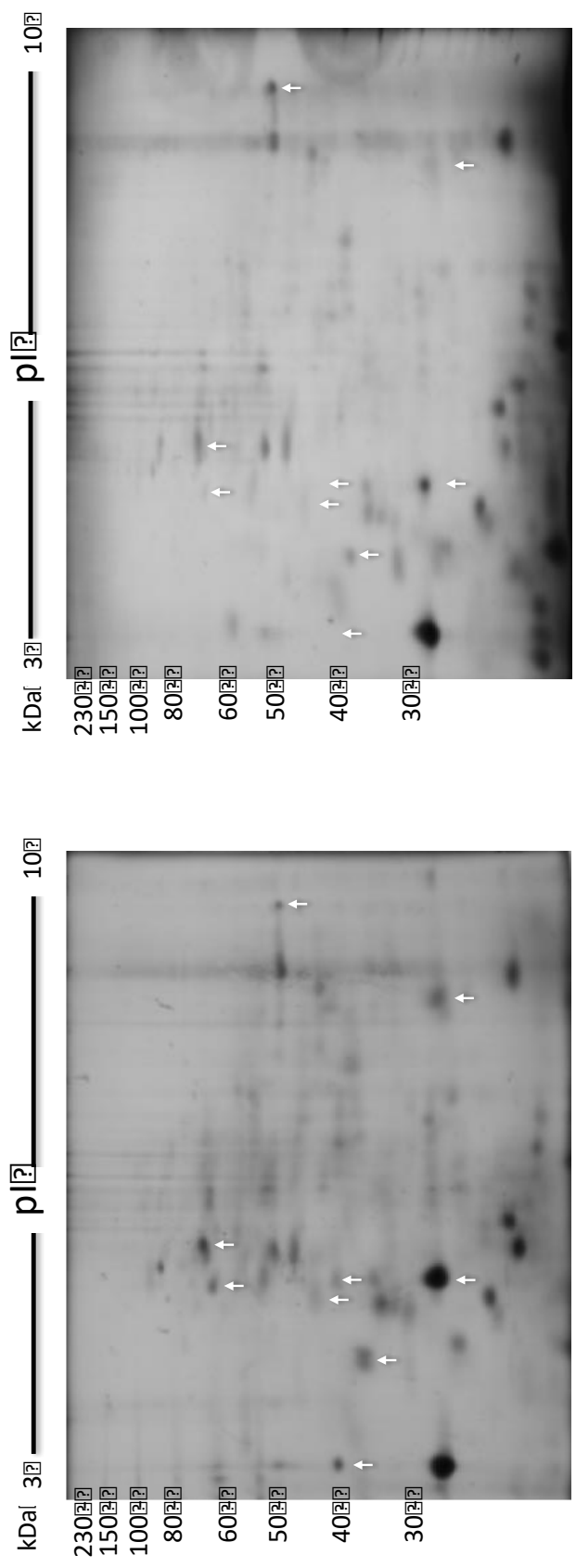
**Figura 28 parte 2. Análisis bioinformático de metaloproteasas presentes en el genoma de *Toxoplasma gondii*.** Proteoma disponible en: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp001059;type=peptidase>

### **8.11 Comparación de extractos totales de taquizoítos aislados de los sistemas *in vivo* e *in vitro* mediante geles bidimensionales**

Con todos los resultados anteriores, hemos comprobado que en el modelo *in vitro* existe una expresión diferencial de proteasas. Con base en este resultado, nos preguntamos qué otras proteínas pudieran estar sub-expresándose o bien sobre-expresándose en los parásitos al ser mantenidos en cultivo celular.

Con la finalidad de evaluar si existen diferencias en expresión de proteínas entre ambos sistemas, se realizaron geles bidimensionales. Decidimos analizar ET de parásitos aislados de ratón y de cultivo celular y los analizamos mediante esta técnica. Cabe destacar que estos resultados son preliminares y nos dará pauta para un posterior estudio más a detalle. Todos los resultados que se presentarán a continuación son ensayos únicos, es decir de un solo repetido y por lo tanto deben de considerarse como “preliminares”.

Nuestros resultados preliminares sugieren que aparentemente existen diferencias en la expresión de algunas proteínas (Figura 29). Algunas de las proteínas que aparentemente muestran diferencias entre ambos sistemas se encuentran marcadas con flechas blancas en el gel (Figura 29). Al comparar los geles de ambos sistemas, podemos afirmar que aparentemente existe una tendencia al decremento de proteínas en el sistema *in vitro*, comparándolo con el sistema *in vivo*.



**Ratón**

**Cultivo**

**Figura 29. Comparación del perfil de proteínas de extractos totales de *Toxoplasma gondii* aislados de ratón y cultivo celular.** El gel se tiñó con nitrato de plata. La primera dimensión, pH 3-10; segunda dimensión SDS-PAGE al 10%. La proteína se ajustó a 120 µg para ambos casos.



### **8.12 Detección de la actividad proteolítica de extractos totales de taquizoitos de aislados de ratón y cultivo celular mediante zimografía 2-D**

Como último ensayo preliminar, se evaluó la actividad de ET de taquizoitos aislados de ambos sistemas mediante zimografía 2-D. Cabe destacar que no hay reportes de zimografía bidimensional (2-D) para *T. gondii*, y los reportes para el estudio de metaloproteasas mediante zimografía 2-D en parásitos es escasa, por lo que nos vimos en la necesidad de estandarizar un método para la detección de estas proteasas en el parásito basándonos en otros sistemas. Los resultados obtenidos son alentadores.

Una muestra tratada igual que el problema y analizada en 2-D en un gel de SDS-PAGE sin sustrato se utilizó como control de carga (Figura 30 y 31, incisos A). Cabe destacar que este gel se tiñó con nitrato de plata, dada la resolución mayor que presenta en comparación con el azul de Coomassie.

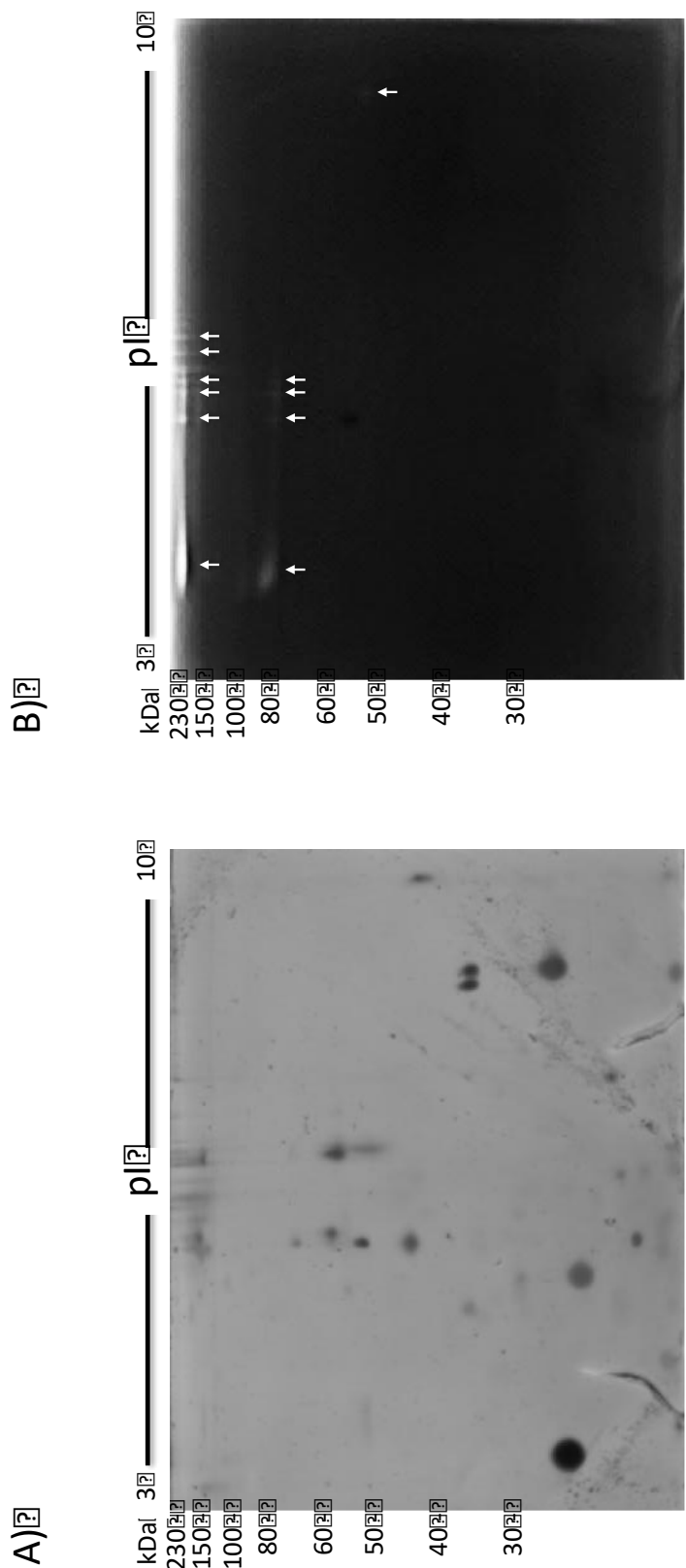
Mediante zimografía 2-D logramos detectar proteasas (Figura 30, inciso B). Aparentemente se trata de las proteasas que observamos en zimografía unidimensional (1-D) entre los pesos de 290 kDa, 254 kDa, 84 kDa y 75 kDa. Los puntos de degradación se encuentran marcados en el zimograma 2-D con flechas color blanco. Lo que se observa en el zimograma 2-D es que posiblemente se trate de cúmulos de proteasas y este resultado explicaría la alta degradación que se observa en zimografía 1-D.

Únicamente la proteasa de aproximadamente 50 kDa mostró un pI con tendencia básica, aproximadamente pI 9.5. Las demás proteasas mostraron actividades en pI que tienden a lo ácido: pI 4.5 y el cúmulo de proteasas ronda el pI 6.

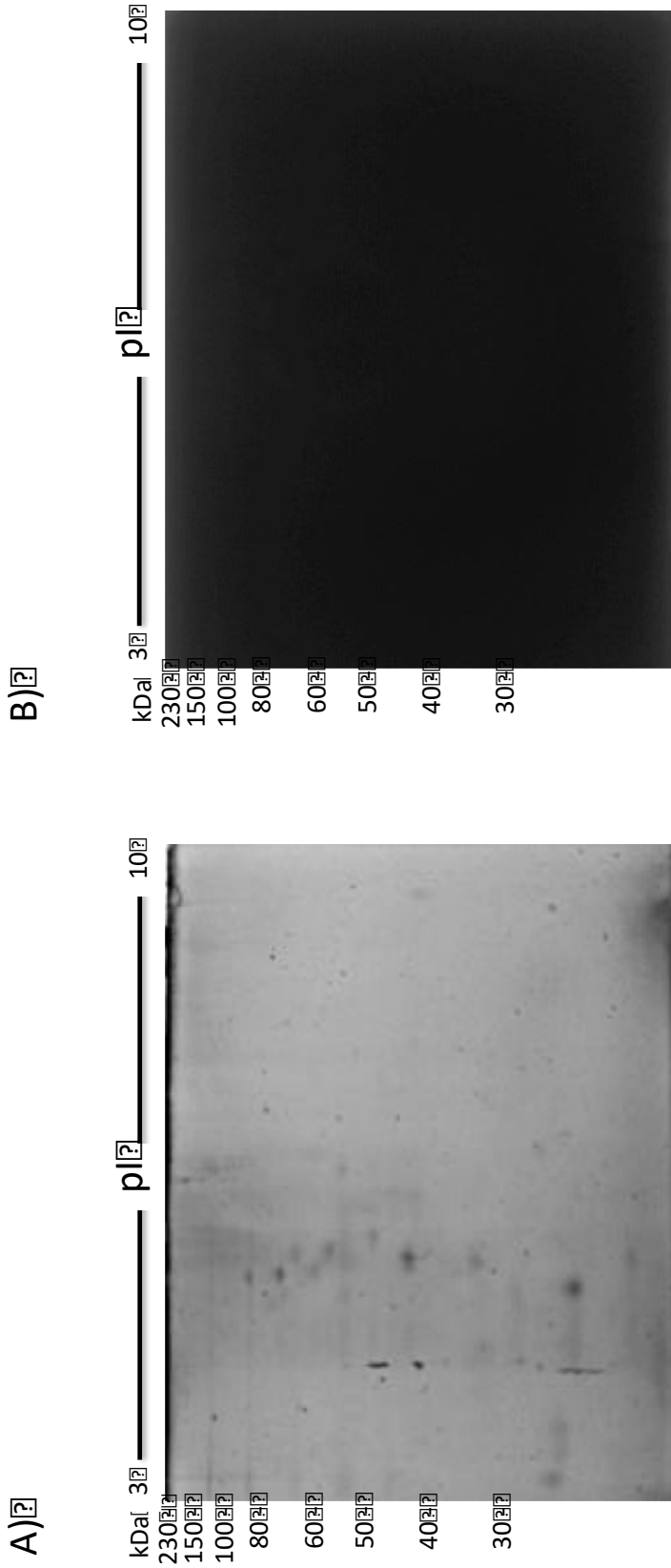
Con la finalidad de comparar los perfiles proteolíticos en zimografía 2-D de ambos sistemas, se analizó el extracto total de parásitos de cultivo celular, bajo las mismas condiciones. Como se muestra en la Figura 31, no se detectó actividad proteolítica en el gel (inciso B).

Para el caso de los controles de carga, al comparar ambos sistemas, observamos un patrón muy similar entre muestras (Figura 30 y 31, incisos A). Cabe destacar

que estos controles de carga mostraron diferencias con los geles bidimensionales de la Figura 29, correspondientes a ET de ambos sistemas. Pensamos que posiblemente esta diferencia se deba a que la preparación de la muestra para zimografía 2-D se realiza en ausencia de DTT y IAA, mismos agentes que son necesarios en el procesamiento de un gel bidimensional convencional.



**Figura 30. Perfil proteolítico por zimografía 2-D de extracto total de *Toxoplasma gondii* aislados de ratón.** La muestra se analizó en ausencia de agentes reductores. El zimograma se tiñó con azul de Coomassie A) y el control de carga se tiñó con nitrato de plata B). La primera dimensión, pH 3-10; segunda dimensión SDS-PAGE al 7.5% (para zimografía copolimerizado con gelatina al 0.1%). El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de ZnCl<sub>2</sub> 1 μM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. La proteína se ajustó a 120 μg para ambos casos.



**Figura 31. Perfil proteolítico por zimografía 2-D de extracto total de *Toxoplasma gondii* aislados de cultivo celular.** La muestra se analizó en ausencia de agentes reductores. El zimograma se tiñó con azul de Coomassie A) y el control de carga se tiñó con nitrato de plata B). La primera dimensión, pH 3-10; segunda dimensión SDS-PAGE al 7.5% (para zimografía copolimerizado con gelatina al 0.1%). El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de ZnCl<sub>2</sub> 1 μM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. La proteína se ajustó a 120 μg para ambos casos.

## 9.0 Discusión

En términos generales, los mecanismos que los patógenos utilizan para lograr diseminarse por todo el organismo hospedero permanecen por elucidarse (Barragan & Sibley, 2003); sin embargo, se piensa que la diseminación y virulencia de patógenos, así como ocurre en las células cancerígenas, se deba a la expresión de una variedad de proteasas que potencian la invasión tisular (Kim, 2004). Algunos patógenos como parásitos, bacterias, virus y hongos, son capaces de atravesar las barreras biológicas, tales como la placenta, la barrera hematoencefálica y la pared intestinal (Barragan & Sibley, 2003). En la actualidad, sabemos que los patógenos que evitan la primera línea de defensa del cuerpo son los causantes de las enfermedades humanas más severas (Barragan & Sibley, 2003). Sin embargo, hoy en día tratamos de explicar este proceso por diferentes métodos, una de las estrategias que se piensa utilizan estos patógenos para atravesar las barreras biológicas, incluye su tránsito dentro de leucocitos y migración transcelular y paracelular (Huang & Jong, 2001; Kerr, 1999).

Para el caso de *T. gondii*, el proceso más importante de su patogenicidad es la alta capacidad de diseminación que presenta. Este patógeno puede estar presente en todos los órganos del hospedero. Siguiendo una infección oral, *T. gondii* inicialmente atraviesa el epitelio intestinal, diseminándose por los tejidos y atravesando barreras biológicas inmunológicamente privilegiadas, como la placenta y la barrera hematoencefálica (Barragan & Sibley, 2003). Es aquí donde el parásito causa las patologías más severas: problemas congénitos en el feto (Desmonts & Couvreur, 1974), complicaciones neurológicas severas en individuos inmunocomprometidos (Luft et al., 1993) y patologías oculares en organismos sanos (Roberts & McLeod, 1999). Sin embargo, al igual que para muchos parásitos, el mecanismo por el cual el parásito puede diseminarse por todo el cuerpo se desconoce. Sin embargo, como se mencionó en líneas anteriores, en nuestro laboratorio pensamos que la diseminación y virulencia de *T. gondii* se debe, en gran medida, a la expresión de una variedad de proteasas

que potencian la invasión tisular, como ocurre en las células cancerígenas (Kim, 2004).

Los estudios actuales de proteasas en *T. gondii* no se han centrado en el estudio de estas proteínas en el proceso de diseminación, si no en el proceso de invasión del parásito a la célula hospedera o al procesamiento proteolítico de diversas proteínas como las proteínas de adhesión MIC. Una variedad de datos han sido publicados sugiriendo que las proteasas juegan un importante rol en la invasión de los Apicomplexa. Los datos son muy limitados con respecto a *T. gondii*; algunos estudios han demostrado que inhibidores para SP y CP bloquean la invasión del parásito a la célula hospedera (Conseil, Soete, & Dubremetz, 1999; Que et al., 2002). Con relación al procesamiento proteico, se ha demostrado la participación de algunas proteasas en este proceso, como la toxolisina-1, involucrada en el procesamiento de proteínas (Que et al., 2002).

Sin embargo, en nuestro conocimiento poco se ha relacionado a las proteasas expresadas por *T. gondii* en procesos de diseminación. Incluso en revisiones del presente año, no se mencionan a las proteasas como posibles efectores de virulencia en proteínas secretadas por *T. gondii* (English, Adomako-Ankomah, & Boyle, 2015).

En nuestro laboratorio, creemos que la presencia de proteasas es fundamental para que *T. gondii* logre diseminarse de manera exitosa, degradando componentes de la MEC y evadiendo la respuesta inmune, tal como lo realizan otros parásitos con similares capacidades de diseminación (Kim et al., 2003). En varios parásitos se han descrito la participación de tres familias de proteasas (SP, CP y MP) que están involucradas en procesos de degradación de la MEC en parásitos extracelulares, por citar algunos trabajos: (Aldape et al., 1994; Hernández-Gutiérrez et al., 2004; Serrano-Luna et al., 2007); e intracelulares, por citar algunos trabajos: (Duaso et al., 2012; Ghosh et al., 1999; McGwire et al., 2003). Sin embargo, han sido muy pocos los estudios donde han utilizado la técnica de zimografía para la detección de proteasas, por citar algunos trabajos:

(Álvarez-Sánchez et al., 2000; Coradi & Guimaraes, 2006; Hernández-Gutiérrez et al., 2004; Mendoza-López et al., 2000; Nogueira de Melo et al., 2010; Sissons et al., 2006; Williams & Coombs, 1995).

A pesar que la zimografía es una técnica ampliamente usada para la detección de proteasas, ha sido utilizada de manera escasa en el estudio de proteasas en *T. gondii* (Song & Nam, 2003), y los reportes no se han centrado en el estudio de proteasas como factor de virulencia o bien en procesos de diseminación.

Por todo lo anterior empezamos a caracterizar las proteasas presentes en los ET de taquizoítos de una cepa altamente virulenta como la RH, de uso cotidiano en nuestro laboratorio y que es mantenida tanto en un sistema *in vivo* como *in vitro* de toxoplasmosis. Creemos que al analizar el contenido de proteasas de los parásitos que se encuentran en un modelo *in vivo*, como en el ratón de la cepa BALB/c, podremos conocer con mayor precisión las características con las que cuenta el parásito para lograr diferentes procesos, como su diseminación. Su caracterización nos puede ayudar a comparar diferencias que se presenten en otras cepas o bien en otros sistemas de propagación del parásito.

Inicialmente caracterizamos la detección de proteasas utilizando como método zimografía en gelatina, basándonos en condiciones de detección que ya están reportadas para estudios zimográficos en otros parásitos; con base en la anterior, decidimos analizar sistemas para la detección de las cuatro familias de proteasas. Nuestros resultados indicaron la existencia de al menos nueve proteasas que se detectaron mediante zimografía 1-D. Estas proteasas con pesos aproximados de: 290 kDa, 254 kDa, 199 kDa, 172 kDa, 110 kDa, 84 kDa, 75 kDa, 59 kDa y 50 kDa, no han sido reportadas para *T. gondii*. Todas ellas sensibles a quelantes de Ca<sup>2+</sup> como EGTA y 1, 10 fenantrolina, indicando en consecuencia su naturaleza como metaloproteasas.

En nuestro conocimiento, únicamente un grupo de investigadores coreano ha tratado de caracterizar las proteasas presentes en los ET de *T. gondii* y las presentes en los productos de E/S hace más de diez años. Reportaron no

observar proteasas en la muestra de ET y sí en la de productos de secreción, donde observaron tres proteasas (Song & Nam, 2003). En comparación con lo que este grupo reportó, nosotros logramos detectar al menos nueve proteasas en ET de taquizoítos aislados de ratón. Cabe aclarar que el grupo coreano utilizó la misma técnica de detección de proteasas que nosotros, el mismo sistema *in vivo* y la misma cepa.

Analizamos también las proteasas presentes en los productos de E/S de parásitos aislados de ratón, logrando observar seis proteasas que también están presentes en los ET, en contraste con lo reportado en el grupo coreano, donde solamente se reportaron tres proteasas secretadas (Song & Nam, 2003). La similitud más relevante es que, en ambos resultados, se presenta una proteasa secretada que ronda los 80 kDa, misma que depende de  $Ca^{2+}$  y es inhibida por quelantes como el EGTA y 1, 10 fenantrolina.

De acuerdo a nuestros resultados, podemos concluir que el parásito que proviene de ratón tiene una capacidad mucho mayor para secretar proteínas de forma constitutiva, incluso desde tiempos cortos. Y que su capacidad de secretar incluye tanto proteínas como proteasas. Creemos que uno de los posibles roles de estas proteasas sea en procesos de diseminación, su abundancia en ET y en productos de E/S nos hace pensar que el parásito pudiera usarlas cuando se encuentra en el medio extracelular y está disponible para migrar.

En nuestro laboratorio, tenemos la fortuna de contar con los dos sistemas de mantenimiento de *T. gondii* que se emplean en el mundo: el modelo *in vivo* y el modelo *in vitro*. Creemos que una de los factores que pudiera estar asociado a la expresión de las proteasas es la inducción que recibe el parásito de los componentes de MEC y de la respuesta inmune del organismo hospedero. Por lo que, si lo anterior es cierto, posiblemente en el sistema *in vitro* habría diferencias en la expresión de los componentes que el parásito utiliza para realizar de manera eficiente la migración.

Por lo anterior, analizamos muestras de ET de taquizoítos aislados de cultivo celular, de la misma cepa y bajo las mismas condiciones que para los taquizoítos aislados de ratón. Nuestro resultado fue impresionante, los taquizoítos aislados



de nuestro sistema *in vitro* no expresaron proteasas en cantidades suficientes para ser detectadas mediante zimografía. Lo anterior nos pareció sumamente interesante, si lo comparamos con la cantidad de proteasas que expresa el parásito que proviene de ratón, que desde tiempos cortos ya se evidencia degradación de sustrato. Al analizar los productos E/S, encontramos diferencias evidentes también, los parásitos no secretaron ninguna proteasa, incluso a tiempos largos. Además de las diferencias evidentes en la expresión de proteasas, nos dimos cuenta que el parásito aislado de cultivo celular tiene una capacidad secretora mucho menor si lo comparamos con su homólogo *in vivo*. La capacidad secretora de *T. gondii in vitro* únicamente es evidenciable bajo ensayos tan sensibles como el Western Blot; mientras que para los parásitos aislados de ratón, se pudo detectar la capacidad secretora del parásito mediante geles teñidos con nitrato de plata e incluso con Coomassie (datos no mostrados), lo que nos muestra la abundancia de las proteínas secretadas y de la alta capacidad de secreción con la que cuenta el parásito proveniente del sistema *in vivo*.

Por todo lo anterior, creemos que el parásito de cultivo es diferente al parásito aislado de ratón, además otros resultados corroboran nuestra afirmación. En un ensayo realizado con la finalidad de esclarecer el proceso que conlleva al parásito en cultivo celular a dejar de expresar las proteasas, se evidencia la disminución en la expresión de estas hidrolasas desde el primer pase de cultivo y culmina en el quinto pase con la pérdida de la actividad. Al ver la disminución gradual de la expresión de las proteasas en los ensayos, creemos que el parásito de ratón, al ser ingresado a cultivo celular, se adapta al sistema. En cultivo celular se carece de mecanismos de defensa que pudieran afectar al parásito, además de otro tipo de moléculas inductoras que le pudiera estar incitando al parásito a expresar dichas proteasas. Al no haber la presión ambiental para expresar las proteasas, el parásito ahorraría esta necesidad dedicando solamente sus componentes a la interiorización de la célula hospedera, proliferación y exteriorización.

Al momento de mantener la cepa en cultivo celular, hemos notado que los parásitos no infectan cuando la monocapa de células es mayor al 80% de confluencia, en contraste con los parásitos recién ingresados al sistema *in vitro* y que provienen del ratón que realizan este proceso con mayor facilidad. Tal vez los parásitos de cultivo celular tienen una capacidad limitada para invadir células que forman un epitelio en confluencia en donde hay una estabilidad epitelial otorgada por las uniones intercelulares (uniones estrechas, desmosomas y uniones adherentes) y el citoesqueleto que las estabiliza. En cierto punto, el parásito de cultivo celular tiene todo lo necesario para vivir, y no requiere de gastar energía en productos que no requiere.

Al sub-expresar las proteasas, pensamos que tal vez estarían relacionadas con su capacidad de virulencia. Por lo anterior, realizamos un último ensayo con la finalidad de corroborar que la sub-expresión de las proteasas es debida al mantenimiento de la cepa en cultivo celular. Cuando reingresamos al ratón parásitos que ya no expresaban las proteasas, logramos ver que la actividad de estas enzimas retornaba a la normalidad.

En conclusión, con todos estos resultados podemos decir que las proteasas presentes en ET y en productos de E/S de taquizoítos de *T. gondii* aislados de ratón son metaloproteasas, que dependen de  $Ca^{2+}$  para su actividad. Además, que para que estas proteasas se expresen, deben estar presentes en un sistema que sea altamente demandante, como lo es el ratón (*in vivo*).

Las MMPs son endopeptidasas dependientes de  $Ca^{2+}$  que contienen  $Zn^{2+}$ . Según el sitio especializado en proteasas MEROPS, las proteasas bajo estas características estarían incluidas dentro de la familia M10, donde se localizan todas las MMPs. De acuerdo con el sitio MEROPS, *T. gondii* cuenta con una amplia variedad de proteasas, y entre ellas están presentes las metaloproteasas. Sin embargo, al analizar los datos bioinformáticos nos dimos cuenta de varios puntos importantes: 1) No hay reportes hasta el momento del proteoma de *T. gondii* de la cepa RH; 2) las proteasas que están reportadas pertenecen a cepas de virulencia intermedia y 3) de las proteasas reportadas ninguna pertenece a la

familia M10. Por lo anterior consideramos fuertemente que las proteasas que hemos detectado no han sido reportadas para *T. gondii* de la cepa RH.

Como complemento a estos resultados, decidimos hacer uso de los geles bidimensionales para la detección de proteínas en ET del parásito en ambos sistemas. Pensamos que si los parásitos de cultivo sub-expresan proteasas, tal vez también estén sub-expresando muchas más proteínas. Realizamos entonces geles bidimensionales para observar las posibles diferencias entre ambos sistemas. De manera preliminar nuestros resultados apuntan a que los parásitos del sistema *in vitro* expresan de manera diferencial algunas proteínas.

Existen estudios que muestran diferencias visibles entre cepas virulentas y no virulentas de *T. gondii*, haciendo uso de geles bidimensionales (Zhou et al., 2014; Zhou et al., 2013). Por lo que consideramos que es una buena herramienta que podemos explotar en ensayos futuros.

De forma preliminar y a manera de comparación también, realizamos un zimograma 2-D. En nuestro conocimiento, no existe reportado ningún gel de esta naturaleza para *T. gondii*, por lo que nos dimos a la tarea de caracterizar y estandarizar las condiciones para la detección de proteasa, analizamos tanto las muestras de ET de taquizoítos aislados de ratón como de cultivo celular bajo las mismas características, y únicamente la muestra de taquizoítos aislados de ratón presentó actividad proteolítica. De la proteólisis presente en el gel se evidencian aparentemente varias proteasas que tienen pesos moleculares similares, lo cual nos podría dar una idea de que para zimogramas 1-D estamos viendo actividad de cúmulos de proteasas, y por ende la actividad sea tan abundante. La actividad de las proteasas observadas tiende a pI ácidos, tal como se reporta para algunas metaloproteasas en otros sistemas (Grudkowska, Lisik, & Rybka, 2013; Rossano et al., 2014). Sin embargo, de igual forma estos resultados son preliminares, pero alentadores.

A la fecha, es bien sabido que múltiples parásitos tanto intracelulares como extracelulares hacen uso de proteasas como las MMP para llevar a cabo procesos de diseminación de manera exitosa. En parásitos extracelulares como *Acanthamoeba* (Khan et al., 2000; Sissons et al., 2006) y *Trypanosoma brucei* (Huet et al., 1992) la degradación de la MEC por las MMPs les confiere la capacidad de migrar a través de los tejidos del hospedero. Lo mismo sucede con los parásitos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* (Nogueira de Melo et al., 2010; Visse & Nagase, 2003) y *Leishmania* (McGwire et al., 2003), donde se ha reportado que las MMP cumplen roles que le permiten a los parásitos poder degradar componentes de la MEC, y llevar a cabo más fácilmente su proceso de diseminación. Pero en el caso de *Plasmodium falciparum* (Prato et al., 2005) y *Toxoplasma gondii* (Buache et al., 2007), se ha reportado que la estimulación por mecanismos desconocidos de la maquinaria de la célula hospedera, produce una liberación de MMPs que podrían ayudar a la degradación de la MEC.

Para *T. gondii* otros estudios han evaluado la maquinaria de invasión que presentan células de un linaje monocítico/macrófago infectadas con *T. gondii*, los macrófagos infectados mostraron un incremento en la expresión de algunas metaloproteasas de membrana (MT1-MMP y ADAM10) (Seipel et al., 2010). MT1-MMP es conocida como un activador de MMP-2, y MMP-2 es una proteasa que degrada la MEC (Sato et al., 2005). Tomando en cuenta este mecanismo, pudiera ser incluso que el parásito ocupe la maquinaria de las células hospederas para potenciar su virulencia.

Por todo lo anterior, consideramos que las proteasas que hemos encontrado posiblemente están involucradas en procesos que son esenciales para llevar a cabo la invasión y diseminación de *T. gondii* de manera exitosa. Probablemente, las diferencias de virulencia entre las cepas de este parásito estén basadas en mecanismos de virulencia como las proteasas. Por ello, consideramos que es necesario que se realicen más estudios para lograr comprender más a fondo los procesos en los que se basa *T. gondii* para llevar a cabo este mecanismo.

## 10.0 Conclusiones

1. En extractos totales de taquizoítos aislados de ratón hay al menos nueve proteasas, que dependen de  $\text{Ca}^{2+}$  y de pH. Su actividad es sensible a quelantes de metales como EGTA y 1, 10 fenantrolina a concentraciones desde 1 mM.
2. En productos de excreción/secreción de taquizoítos aislados de ratón hay al menos seis proteasas con las mismas características que las obtenidas para los extractos totales.
3. Los parásitos de cultivo celular sub-expresan estas proteasas, tanto en extractos totales como en productos de excreción/secreción, en comparación con su homólogo en ratón.
4. El parásito mantenido en cultivo celular recupera su actividad proteolítica al ser reingresado al ratón, posiblemente por la presencia de factores inductores que están ausentes en cultivo celular.

## 11.0 Perspectivas

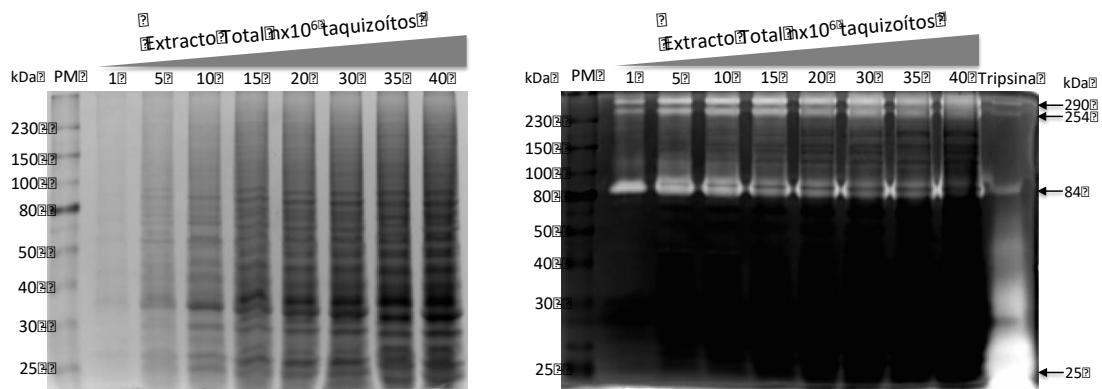
1. Ampliar el estudio de proteínas diferenciales en taquizoitos aislados del sistema *in vivo* e *in vitro* de toxoplasmosis, analizar las proteínas mediante espectrometría de masas.
2. Ampliar el estudio de proteasas utilizando zimografía 2-D, e identificación de las proteasas mediante espectrometría de masas.
3. Creación de anticuerpos anti-proteasas para ubicación especial en el taquizoíto de *Toxoplasma gondii* y su expresión en las diferentes etapas de invasión, internalización y proliferación.
4. Estudio de inhibidores de proteasas.
5. Caracterizar la secreción inducida de proteasas utilizando inductores fisiológicos, como por ejemplo componentes de matriz extracelular.
6. Caracterizar en la secreción inducida de proteasas las rutas de señalamiento intracelular y su papel en la regulación de la secreción.
7. Desarrollar una cepa KO para estas proteasas a fin de determina su virulencia *in vivo* e *in vitro*.

## 12.0 Anexo I. Resultados complementarios

### 12.1 Elección del número de taquizoítos para el extracto total

Con la finalidad de decidir con qué cantidad de parásitos era ideal trabajar para realizar la caracterización de proteasas (pH, cofactores y agente reductor), decidimos hacer una curva de actividad y conocer el patrón proteolítico de diferentes numero parásitos. Este ensayo se realizó al inicio del proyecto y antes de la caracterización de proteasas.

Decidimos que  $10 \times 10^6$  taquizoítos era el número adecuado para observar un perfil proteolítico adecuado (Figura 32). Elegimos este número de parásitos de acuerdo a lo siguiente: 1) se observan definidamente las tres bandas de degradación consistentes en todas las muestras; 2) la degradación proteolítica del sustrato se define únicamente en el carril de la muestra (ver carril de tripsina contaminada con las proteasas de  $40 \times 10^6$  taquizoítos) y 3) es un número de parásitos que nos permitirá obtener varias muestras de un solo ratón (aproximadamente 10 muestras de  $10 \times 10^6$  taquizoítos por ratón infectado). Con relación a cultivo celular,  $10 \times 10^6$  taquizoítos se obtienen de aproximadamente una botella con células infectadas.

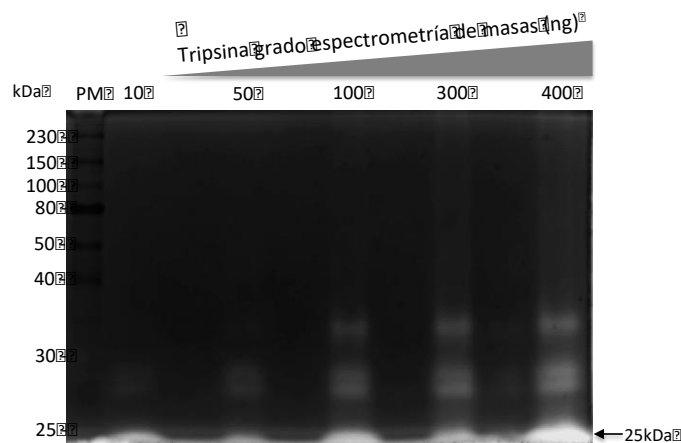


**Figura 32. Perfil proteolítico del extracto total de diferentes número de parásitos.** Se evaluó la actividad proteolítica de extractos totales desde  $1 \times 10^6$  y hasta  $40 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 8 y presencia de  $\text{CaCl}_2$  5 mM. Los gels se incubaron durante 18 h a 37 °C. Como control positivo Tripsina 500 ng. Gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con gelatina 0.1%

## 12.2 Elección de la cantidad de Tripsina a utilizar como control positivo

Inicialmente evaluamos la actividad de tripsina utilizada para cultivo celular como control positivo en los zimogramas; sin embargo, la actividad de esta tripsina resultaba en una degradación prácticamente de todo el sustrato que correspondía al carril en el gel (datos no mostrados). Por lo anterior, decidimos probar la tripsina que se ocupa en nuestro laboratorio para el análisis de espectrometría de masas.

Con la finalidad de evaluar la actividad diferentes cantidades de la tripsina grado espectrometría de masas en los zimogramas, decidimos hacer una curva de actividad con diferentes cantidades de tripsina, desde 10-400 ng (Figura 33) y desde 500 ng-20 µg (datos no mostrados). Este análisis nos permitió decidir qué cantidad de tripsina sería la adecuada utilizar en nuestros zimogramas. Como se observa en la Figura 33, obtuvimos actividad de degradación del sustrato desde 10 ng de tripsina; sin embargo, consideramos que sería adecuado utilizar 100 ng como control para futuros ensayos zimográficos, puesto que es la menor cantidad donde consideramos se observa claramente el perfil proteolítico de la tripsina. Consideramos siempre una banda de degradación en el orden de 25 kDa para la tripsina que fue consistente en todos los ensayos realizados.



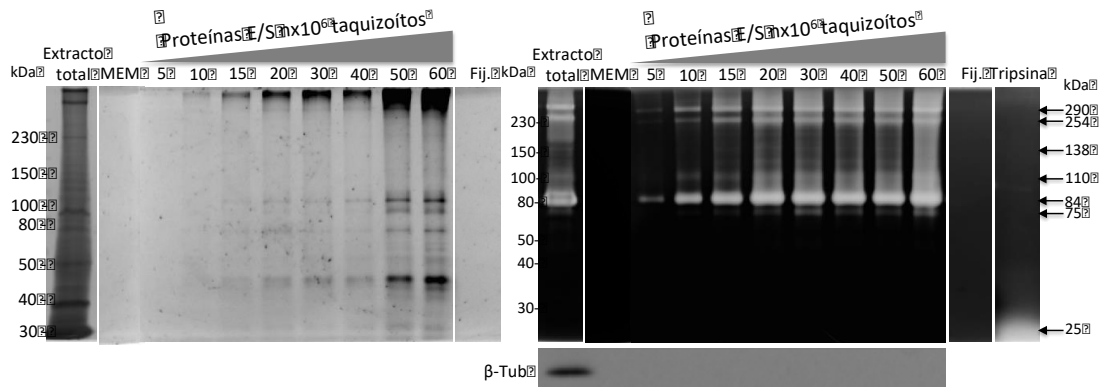
**Figura 33. Perfil proteolítico de diferentes cantidades de Tripsina grado espectrometría de masas.** Se evaluó la actividad proteolítica de 10 ng – 400 ng de Tripsina. La Tripsina se disolvió en HCl 1 mM y ajustada a las concentraciones a evaluar en Tris-HCl 50 mM pH 7.2. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.2. Los geles se incubaron durante 18 h a 37 °C. Gel de acrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina al 0.1%



### 12.3 Elección del número de taquizoítos para evaluar los productos de excreción/secreción.

Con la finalidad de decidir con qué cantidad de parásitos era ideal trabajar para realizar los ensayos de excreción/secreción, decidimos hacer una curva de actividad y conocer el patrón proteolítico de la secreción de diferentes número parásitos aislados de ratón. Este ensayo se realizó con diferentes número de parásitos incubados 2 h a 37 °C, bajo las condiciones ideales. Tomamos este tiempo de incubación puesto que en el laboratorio se tiene conocimiento de un tiempo máximo de viabilidad del parásito cercano a las 4 h, decidimos 2 h por ser el tiempo medio.

Decidimos que la secreción de  $20 \times 10^6$  taquizoítos (Figura 34) era la ideal para este ensayo de acuerdo a lo siguiente: 1) en nuestro control de carga se evidencian proteínas secretadas a las 2 h de manera clara, 2) en el zimograma tiene una mejor resolución de las proteasas y 3) es el menor número de parásitos que presenta estas características. Cabe destacar que no elegimos mayor cantidad de parásitos para este ensayo puesto que nos iba a ser más difícil su obtención en cultivo celular.

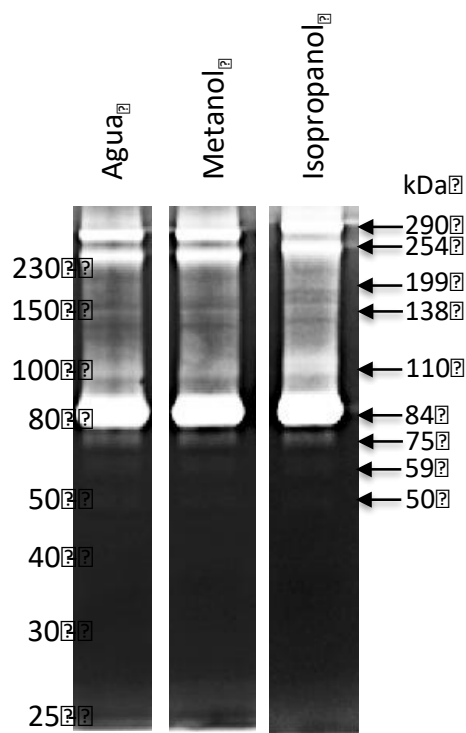


**Figura 34. Perfil proteolítico de productos de excreción/secreción de diferentes número de parásitos.** Se evaluó la actividad proteolítica de productos de excreción/secreción desde  $5 \times 10^6$  y hasta  $60 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó a pH 7.5 y presencia de  $\text{ZnCl}_2$   $1 \mu\text{M}$  y  $\text{CaCl}_2$  1 mM. El control de carga (izquierda) se tiñó con nitrato de plata. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Como control positivo se utilizó Tripsina 500 ng. Gel de acrilamida al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%.

## 12.4 Control de actividad proteolítica en presencia de los disolventes de los inhibidores empleados

Con la finalidad de corroborar que la inhibición observada no se debía al empleo de los disolventes correspondientes, analizamos la muestra bajo las mismas condiciones sin presencia de inhibidor, pero con la misma cantidad de disolvente (metanol 5% e isopropanol al 5%).

Como observamos en la Figura 35, no existió efecto inhibitorio por parte de los disolventes empleados.



**Figura 35. Efecto de disolventes de los inhibidores de proteasas en el perfil proteolítico de extractos totales de *Toxoplasma gondii* (RH).** Se evaluó el efecto de diferentes disolventes en actividad proteolítica de extractos totales de  $10 \times 10^6$  taquizoítos aislados de ratón. Las diluciones evaluadas corresponden a las diluciones empleadas en presencia del inhibidor. El gel conteniendo la muestra se lavó e incubó en presencia de los disolventes a pH 7.5 y presencia de  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$  y  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Los geles se incubaron durante 24 h a 37 °C. Gel acrilamida al 7.5% copolimerizado con gelatina 0.1%.

## 13.0 Anexo II. Materiales, reactivos y anticuerpos

### 13.1 Materiales y reactivos.

Azul de tripano: **GIBCO BRL, USA**; Suero Fetal Bovino (SFB): **BYProducts, Guadalajara, Jal, MEX**; Penicilina-Estreptomicina (PES), Albumina Sérica Bovina (BSA), Dodecilsulfato sódico (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamina (TEMED), Persulfato de Amonio (APS), Medio Mínimo Esencial (MEM), Gelatina de piel porcina tipo A, Coomassie R-250, Tritón X-100, Tween 20, Tripsina grado espectrometría de masas, Tripsina grado cultivo celular, N  $\alpha$ -Tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), N-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Monohidrato de 1,10 Fenantrolina, Pepstatina A, Trans-Epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano (E64), Cloruro de Zinc ( $ZnCl_2$ ), Ditiotreitól (DTT), Iodoacetamida (Zainodini et al.), Chaps, Tiourea, Botellas para cultivo celular de 25cm<sup>2</sup> (Corning): **Sigma, St. Louis, MO, USA**; Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), Ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), Cloruro de Sodio (NaCl), Cloruro de Potasio (KCl), Fosfato de Sodio Dibásico ( $Na_2HPO_4$ ), Fosfato de Potasio Monobásico ( $KH_2PO_4$ ), Cloruro de Calcio ( $CaCl_2$ ), Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ ), Tris-HCl, Acetato de Sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ), Tiosulfato de Sodio ( $Na_2S_2O_3$ ), Ácido Cítrico ( $C_6H_8O_7$ ), Nitrato de Plata ( $AgNO_3$ ), Glicerol y todos los solventes utilizados: **J.T. Baker, Edo. Mex., MEX**; Filtros de policarbonato: **Millipore, Bedford, MA, USA**; Placas de 96 pozos: **Thermo Scientific, Roskilde, Denmark**; Leche desnatada: **DIFCO, BD&Co, Franklin Lakes, NJ, USA**; Azul de bromofenol: **Merck, Darmstadt, FR, Germany**; Acrilamida, N'N'-metilen-bis-acrilamida (Bis-Acrilamida), Bradford, Urea, Amortiguador de anfolinas pH 3-10, Membrana de Nitrocelulosa, Tiras IEF pH 3-10, Aceite mineral: **BioRad, Hercules, CA, USA**; Kit quimioluminiscencia: **GE, HealthCare**; Formaldehído al 37%, Glutaraldehído al 25%: **Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA**.

### **13.2 Anticuerpos.**

Ratón anti- $\beta$ -tubulina: **Invitrogen, Frederick, MD, USA**; Conejo anti-*Toxoplasma gondii*: **producido en nuestro laboratorio**; Conejo anti-ratón IgG conjugado a HRP: **Zymed, Santa Fe, CA, USA** y Chivo anti-conejo IgG conjugado a HRP: **Millipore, Temecula, Ca, USA**.

## 15.0 Bibliografía

- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, **103 Pt 3**, 321-329.
- Afonso, S., Romagnano, L., & Babiarz, B. (1997). The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development*, **124**(17), 3415-3425.
- Aldape, K., Huizinga, H., Bouvier, J., & McKerrow, J. (1994). *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp Parasitol*, **78**(2), 230-241. doi: 10.1006/expr.1994.1023
- Álvarez-Sánchez, M. E., Ávila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J., & Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog*, **28**(4), 193-202. doi: 10.1006/mpat.1999.0336
- Barale, J. C., Blisnick, T., Fujioka, H., Alzari, P. M., Aikawa, M., Braun-Breton, C., & Langsley, G. (1999). *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(11), 6445-6450.
- Barbour, S. E., & Marciano-Cabral, F. (2001). *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta*, **1530**(2-3), 123-133.
- Barragan, A., & Hitziger, N. (2008). Transepithelial migration by *Toxoplasma*. *Subcell Biochem*, **47**, 198-207.
- Barragan, A., & Sibley, L. D. (2002). Transepithelial Migration of *Toxoplasma gondii* Is Linked to Parasite Motility and Virulence. *J. Exp. Med*, **195**, 1625-1622.
- Barragan, A., & Sibley, L. D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol*, **11**(9), 426-430.
- Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. *Methods Enzymol*, **244**, 1-15.
- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. (2009). (CDC) 21-1112.
- Black, M. W., Arrizabalaga, G., & Boothroyd, J. C. . (2000). Ionophore-Resistant Mutants of *Toxoplasma gondii* Reveal Host Cell Permeabilization as an Early Event in Egress. *Molecular and Celular Biology*.
- Black, M. W., & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**(3), 607-623.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bradley, P. J., Ward, C., Cheng, S. J., Alexander, D. L., Collier, S., Coombs, G. H., . . . Boothroyd, J. C. (2005). Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, **280**(40), 34245-34258. doi: 10.1074/jbc.M504158200

- Branquinha, M. H., Vermelho, A. B., Goldenberg, S., & Bonaldo, M. C. (1996). Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, **43**(2), 131-135.
- Buache, E., Garnotel, R., Aubert, D., Gillery, P., & Villena, I. (2007). Reduced secretion and expression of gelatinase profile in *Toxoplasma gondii*-infected human monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**(2), 298-303. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.089
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., . . . Johnson, P. J. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, **315**(5809), 207-212. doi: 10.1126/science.1132894
- Carruthers, V. B. (1999). Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int*, **48**(1), 1-10.
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cellular Microbiology*, **1**(3), 225-235.
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, **73**(2), 114-123.
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*, **31**(2), 421-428.
- Castro-Elizalde, K. N. (2013). *CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DEL QUISTE TISULAR DE Toxoplasma gondii in vitro Y DE LAS MODIFICACIONES EN EL CITOESQUELETO DE ACTINA DE LA CÉLULA HOSPEDERA*. (Maestro en Ciencias), CINVESTAV-Zacatenco.
- Cesbron-Delauw, M. F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today*, **10**(8), 293-296.
- Cesbron-Delauw, M. F., Gendrin, C., Travier, L., Ruffiot, P., & Mercier, C. (2008). Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic*, **9**(5), 657-664. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00728.x
- Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W., & Wingfield, P. T. (1995). *Current protocols in protein science*. New York: Wiley.
- Conseil, V., Soete, M., & Dubremetz, J. F. (1999). Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**(6), 1358-1361.
- Coradi, S. T., & Guimaraes, S. (2006). *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite proteases. *Parasitol Res*, **99**(2), 131-136. doi: 10.1007/s00436-005-0124-5
- Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gatel, D., & Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*, **107**(1), 309-316. doi: 10.1182/blood-2005-02-0666
- d'Avila-Levy, C. M., Santos, A. L. S., Cuervo, P., Batista de Jesus, J., & Branquinha, M. H. (2012). Applications of Zymography (Substrate-SDS-PAGE) for

Peptidase Screening in a Post-Genomic Era. *Gel Electrophoresis - Advanced Techniques*.

- Da Gama, L. M., Ribeiro-Gomes, F. L., Guimaraes-Jr, U., & Arnholdt, A. C. (2004). Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect*, **6**(14), 1287-1296. doi: 10.1016/j.micinf.2004.07.008
- Desmonts, G., & Couvreur, J. (1974). Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.*, **290**, 1110-1116.
- Dowse, T., & Soldati, D. (2004). Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol*, **7**(4), 388-396. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.013
- Duaso, J., Yanez, E., Castillo, C., Galanti, N., Cabrera, G., Corral, G., . . . Kemmerling, U. (2012). Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense? *J Trop Med*, 2012, 758357. doi: 10.1155/2012/758357
- Dubey. (1994). Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*, **205**(11), 1593-1598.
- Dubey. (1998a). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **28**(7), 1019-1024.
- Dubey. (1998b). Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. *J Parasitol*, **84**(6), 1279-1282.
- Dubey, & Beattie, C.P. (1988). Toxoplasmosis of animals and man. *CRC Press*, 1-220.
- Dubey, & Frenkel, J.K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool*, **23**(4), 537-546.
- Dubey, Lindsay, D.S., & Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*, **11**(2), 267-299.
- Dubremetz, J. F. (2007). Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol*, **9**(4), 841-848. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00909.x
- Dubremetz, J. F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., & Fourmaux, M. N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol*, **28**(7), 1007-1013.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**(3), 161-174. doi: 10.1038/nrc745
- Ekici, O. D., Paetzel, M., & Dalbey, R. E. (2008). Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci*, **17**(12), 2023-2037. doi: 10.1110/ps.035436.108
- English, E. D., Adomako-Ankomah, Y., & Boyle, J. P. (2015). Secreted effectors in *Toxoplasma gondii* and related species: determinants of host range and pathogenesis? *Parasite Immunol*, **37**(3), 127-140. doi: 10.1111/pim.12166

- Erez, E., Fass, D., & Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, *459*(7245), 371-378. doi: 10.1038/nature08146
- Etheridge, R. D., Alaganaan, A., Tang, K., Lou, H. J., Turk, B. E., & Sibley, L. D. (2014). The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe*.
- Ferguson, D. J. (2002). *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol*, *18*(8), 355-359.
- Ferguson, D. J. (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol*, *9*;34(3), 347-360.
- Ferguson, D. J. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *104*(2), 133-148.
- Ferrante, A., & Bates, E. J. (1988). Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun*, *56*(12), 3320-3321.
- Fingleton, B. (2006). Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci*, *11*, 479-491.
- Foussard, F., Gallois, Y., Tronchin, G., Robert, R., & Mauras, G. (1990). Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. *Parasitol Res*, *76*(7), 563-565.
- Foussard, F., Leriche, M. A., & Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology*, *102 Pt 3*, 367-370.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, *123*(24), 4195-4200.
- Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. *BioScience*, *23*, 343-352.
- Fries, K. M., Blieden, T., Looney, R. J., Sempowski, G. D., Silvera, M. R., Willis, R. A., & Phipps, R. P. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*, *72*(3), 283-292.
- Frixione, E., Mondragón, R., & Meza, I. (1996). Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell Motil Cytoskeleton*, *34*(2), 152-163. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1996)34:2<152::AID-CM6>3.0.CO;2-D
- Gadasi, H., & Kessler, E. (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun*, *39*(2), 528-531.
- Ghosh, A., Bandyopadhyay, K., Kole, L., & Das, P. K. (1999). Isolation of a laminin-binding protein from the protozoan parasite *Leishmania donovani* that may mediate cell adhesion. *Biochem J*, *337 ( Pt 3)*, 551-558.
- Gómez de León, C. T., Díaz Martín, R. D., Mendoza Hernandez, G., Gonzalez Pozos, S., Ambrosio, J. R., & Mondragon Flores, R. (2014). Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Proteomics*, *111*, 86-99. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.008
- Greenbaum, D. C., Baruch, A., Grainger, M., Bozdech, Z., Medzihradzsky, K. F., Engel, J., . . . Bogyo, M. (2002). A role for the protease falcipain 1 in host



- cell invasion by the human malaria parasite. *Science*, 298(5600), 2002-2006. doi: 10.1126/science.1077426
- Grudkowska, M., Lisik, P., & Rybka, K. (2013). Two-dimensional zymography in detection of proteolytic enzymes in wheat leaves. *Acta Physiol Plant*, 35, 3477-3482.
- Grzonka, Z. , Jankowska, Kasprzykowska, R. , Lankiewicz, L. , Wiczak, W. , Ciarkowski, J., . . . Grubb, A. (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 1-20.
- Hadas, E., & Mazur, T. (1993). Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Trop Med Parasitol*, 44(3), 197-200.
- Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Ngoyi, D. M., Matovu, E., Enyaru, J. C., . . . Sanchez, J. C. (2011). Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are powerful staging markers for human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health*, 16(1), 119-126. doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02642.x
- Han, K. L., Lee, H. J., Shin, M. H., Shin, H. J., Im, K. I., & Park, S. J. (2004). The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol Res*, 94(1), 53-60. doi: 10.1007/s00436-004-1158-9
- Hartley, B. S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem*, 29, 45-72. doi: 10.1146/annurev.bi.29.070160.000401
- He, Y. G., Niederkorn, J. Y., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Silvano, R., & Dougherty, J. (1990). In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 31(11), 2235-2240.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*, 102(12), 4501-4524.
- Henskens, Y. M., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1996). Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 377(2), 71-86.
- Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., & Leippe, M. (2002). Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem*, 277(25), 22353-22360. doi: 10.1074/jbc.M201475200
- Hernández-Gutiérrez, R., Ávila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutiérrez, G., & Arroyo, R. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol*, 107(3-4), 125-135. doi: 10.1016/j.exppara.2004.05.004
- Heussen, C., & Dowdle, E. B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem*, 102(1), 196-202.
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, 172(6), 1561-1566.
- Hu, K., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol*, 156(6), 1039-1050. doi: 10.1083/jcb.200112086

- Huang, S. H., & Jong, A. Y. (2001). Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol*, 3(5), 277-287.
- Huet, G., Richet, C., Demeyer, D., Bisiau, H., Soudan, B., Tetaert, D., . . . Degand, P. (1992). Characterization of different proteolytic activities in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys Acta*, 1138(3), 213-221.
- Hutchison, W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206(987), 961-962.
- Huynh, M. H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L. , Sibley, L. D., & Carruthers, V. C. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2±M2AP adhesive protein complex. *The EMBO Journal*, 22(9) 2082-2090.
- Jacobs, L., Remington, J. S., & Melton, M. L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*, 46, 11-21.
- Jensen, K. D., Camejo, A., Melo, M. B., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G. M., . . . Saeij, J. P. (2015). *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *MBio*, 6(2), e02280. doi: 10.1128/mBio.02280-14
- Jerke, U., Hernandez, D. P., Beaudette, P., Korkmaz, B., Dittmar, G., & Kettritz, R. (2015). Neutrophil serine proteases exert proteolytic activity on endothelial cells. *Kidney Int*. doi: 10.1038/ki.2015.159
- Jiang, Y., Goldberg, I. D., & Shi, Y. E. (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*, 21(14), 2245-2252. doi: 10.1038/sj.onc.1205291
- Jimenez, J. C., Fontaine, J., Grzych, J. M., Dei-Cas, E., & Capron, M. (2004). Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(1), 152-160.
- Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Miettinen, H. M., Kasper, L. H., & Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*, 249(4969), 641-646.
- Jones, T. C., & Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med*, 136(5), 1173-1194.
- Katris, N. J., van Dooren, G. G., McMillan, P. J., Hanssen, E., Tilley, L., & Waller, R. F. (2014). The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog*, 10(4), e1004074. doi: 10.1371/journal.ppat.1004074
- Kerr, J. R. (1999). Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *Mol Pathol*, 52(4), 220-230.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., Panjwani, N., Cao, Z., & Paget, T. A. (2000). Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol*, 38(8), 2858-2861.
- Kim. (2004). Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Trop*, 91(1), 69-81. doi: 10.1016/j.actatropica.2003.11.016

- Kim, Ha, Y. R., Yu, H. S., Kong, H. H., & Chung, D. I. (2003). Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. *Korean J Parasitol*, *41*(4), 189-196.
- Kleiner, D. E., & Stetler-Stevenson, W. G. (1994). Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem*, *218*(2), 325-329.
- Lai, S. C., Jiang, S. T., Chen, K. M., & Lee, H. H. (2005). Matrix metalloproteinases activity demonstrated in the infective stage of the nematodes, *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res*, *97*(6), 466-471. doi: 10.1007/s00436-005-1484-6
- Leber, T. M., & Balkwill, F. R. (1997). Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem*, *249*(1), 24-28. doi: 10.1006/abio.1997.2170
- Lei, T., Wang, H., Liu, J., Nan, H., & Liu, Q. (2014). ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *PLoS One*, *13*.
- Lerliche, 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. *Mol Biochem Parasitol*, *45*(2), 249-259.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., . . . Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*, *27*(1), 37-58.
- Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M., & Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, *284*(5751), 67-68.
- Liu, Y. X., Liu, X. M., Nin, L. F., Shi, L., & Chen, S. R. (2013). Serine protease and ovarian paracrine factors in regulation of ovulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *18*, 650-664.
- Luft, BJ, Hafner R, Korzun AH, Lepore C, Antoniskis D, Bosler, EM , . . . al., et. (1993). Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, *329*, 995-1000.
- Magos, M. A., de la Torre, M., & Munoz, M. L. (1992). Collagenase activity in clinical isolates of *Entamoeba histolytica* maintained in xenic cultures. *Arch Med Res*, *23*(2), 115-118.
- Mann, T., & Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, *115*(2), 257-268.
- Martin, P., & Corre, C. (1984). Fractionation of the multiple forms of bovine gastric aspartic proteases by chromatofocusing. *Anal Biochem*, *143*(2), 256-264.
- McGwire, B. S., Chang, K. P., & Engman, D. M. (2003). Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun*, *71*(2), 1008-1010.

- Meissner, M, Reiss, M, Viebig, N, Carruthers, V, Toursel, C, Tomavo, S, . . . Soldati, D. (2002). A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci*, 115, 563-574.
- Mendoza-López, M. R., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ávila-González, L., Ruíz-Tachiquin, M. E., Ortega-López, J., & Arroyo, R. (2000). CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun*, 68(9), 4907-4912.
- Mercer, P. F., Shute, J. K., Bhowmik, A., Donaldson, G. C., Wedzicha, J. A., & Warner, J. A. (2005). MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respir Res*, 6, 151. doi: 10.1186/1465-9921-6-151
- Mercier, C., & Cesbron-Delauw, M. F. (2015). Toxoplasma secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol*, 31(2), 60-71. doi: 10.1016/j.pt.2014.12.002
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., & Ferguson, D. J. P. (2007). Dense granules of the infectious stages of *Toxoplasma gondii*: their central role in the host/parasite relationship. In N. Horizon Bioscience, UK (Ed.), *Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology* (pp. 475-492.). UK.
- Mercier, C., & Delauw, M. F. . (2012). Safe living within a parasitophorous vacuole: the recipe of success by *Toxoplasma gondii*. In E. Ghigo (Ed.), *Pathogen Interaction. At the Frontier of Cellular Microbiology* (pp. 1-18): Transworld Research Network.
- Meza, I. (2000). Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol Today*, 16(1), 23-28.
- Mondragón, R., & Frixione, E. (1996). Ca<sup>2+</sup>-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Eukaryot Microbiol*, 43(2), 120-127.
- Mordue, D. G., Hakansson, K. S., Niesman, R., & Sibley, L. D. (1999). *Toxoplasma gondii* Resides in a Vacuole That Avoids Fusion with Host Cell Endocytic and Exocytic Vesicular Trafficking Pathways. *Experimental Parasitology*, 92, 87-99
- Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A., & Sibley, L. D. (2001). Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol*, 167(8), 4574-4584.
- Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(1), 21-38; table of contents.
- Muller, N., & von Allmen, N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol*, 35(13), 1339-1347. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.008
- Munoz, M. L., Rojkind, M., Calderon, J., Tanimoto, M., Arias-Negrete, S., & Martinez-Palomo, A. (1984). *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J Protozool*, 31(3), 468-470.
- Muñiz, S., & Mondragón, R. . (2009). *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *REB*, 28(2), 52-58.
- Nagase, H., & Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274(31), 21491-21494.

- NCBI. (2015). Taxonomía de *Toxoplasma gondii*. Retrieved Jun, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&mp:id=5811>
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9(6), 255-262. doi: 10.1002/elps.1150090603
- Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool*, 34(2), 217-226.
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L., & O'Connor, G. R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J Ultrastruct Res*, 83(1), 85-98.
- Nichols, B. A., & O'Connor, G. R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab Invest*, 44(4), 324-335.
- Nicolle, C., & Manceaux, L. (1908). Sur une infection á corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *CR Acad Sci*, 147, 763.
- Nicolle, C., & Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *CR Acad Sci*, 148, 369.
- Nilsson, L., Jonasson, L., Nijm, J., Hamsten, A., & Eriksson, P. (2006). Increased plasma concentration of matrix metalloproteinase-7 in patients with coronary artery disease. *Clin Chem*, 52(8), 1522-1527. doi: 10.1373/clinchem.2006.067439
- Nogueira de Melo, A. C., de Souza, E. P., Elias, C. G., dos Santos, A. L., Branquinha, M. H., d'Avila-Levy, C. M., . . . Vermelho, A. B. (2010). Detection of matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, 125(3), 256-263. doi: 10.1016/j.exppara.2010.01.023
- Nopal-Guerrero, T. (2003). *Inducción de la secreción de proteasas de Toxoplasma gondii durante la invasión celular y la interacción con componentes de la matriz extracelular*. (Maestría en Ciencias-Bioquímica), Tesis de Maestría. CINVESTAV-Zacatenco.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250(10), 4007-4021.
- Oliveira-Jr, F. O., Alves, C. R., Silva, F. S., Cortes, L. M., Toma, L., Boucas, R. I., . . . Pereira, M. C. (2013). *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins present a flagellar membrane localization and serine proteinase activity. *Parasitology*, 140(2), 171-180. doi: 10.1017/S0031182012001448
- Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortíz-Estrada, G., de la Garza, M., & Serrano-Luna, J. (2012). Host-Parasite Interaction: Parasite-Derived and -Induced Proteases That Degrade Human Extracellular Matrix. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 24 pages.
- Prato, M., Giribaldi, G., Polimeni, M., Gallo, V., & Arese, P. (2005). Phagocytosis of hemozoin enhances matrix metalloproteinase-9 activity and TNF-alpha production in human monocytes: role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of falciparum malaria. *J Immunol*, 175(10), 6436-6442.

- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Gutierrez-Fernandez, A., Velasco, G., & Lopez-Otin, C. (2005). A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 2), 331-334. doi: 10.1042/BST0330331
- Que, X., Ngo, H., Lawton, J., Gray, M., Liu, Q., Engel, J., . . . Reed, S. L. (2002). The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *J Biol Chem*, 277(28), 25791-25797. doi: 10.1074/jbc.M202659200
- Radke, J. R., & White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 94, 237-247.
- Ramon-Luing, L. A., Rendon-Gandarilla, F. J., Cardenas-Guerra, R. E., Rodriguez-Cabrera, N. A., Ortega-Lopez, J., Avila-Gonzalez, L., . . . Arroyo, R. (2010). Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics*, 10(3), 435-444. doi: 10.1002/pmic.200900479
- Roberts, F., & McLeod, R. (1999). Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today*, 15, 51-57.
- Rosenberg, G. A. (2009). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*, 8(2), 205-216. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70016-X
- Rossano, R., Larocca, M., Riviello, L., Coniglio, M. G., Vandooren, J., Liuzzi, G. M., . . . Riccio, P. (2014). Heterogeneity of serum gelatinases MMP-2 and MMP-9 isoforms and charge variants. *J Cell Mol Med*, 18(2), 242-252.
- Rozario, T., & DeSimone, D. W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol*, 341(1), 126-140. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026
- Russell, D. G., & Burns, R. G. (1984). The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J Cell Sci*, 65, 193-207.
- Saboia-Vahia, L., Borges-Veloso, A., Mesquita-Rodrigues, C., Cuervo, P., Dias-Lopes, G., Britto, C., . . . De Jesus, J. B. (2013). Trypsin-like serine peptidase profiles in the egg, larval, and pupal stages of *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors*, 6, 50. doi: 10.1186/1756-3305-6-50
- Saboia-Vahia, L., Cuervo, P., Borges-Veloso, A., de Souza, N. P., Britto, C., Dias-Lopes, G., & De Jesus, J. B. (2014). The midgut of *Aedes albopictus* females expresses active trypsin-like serine peptidases. *Parasit Vectors*, 7, 253. doi: 10.1186/1756-3305-7-253
- Saffer, L. D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J. F., & Schwartzman, J. D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool*, 39(4), 526-530.
- Sampieri, C. L., de la Pena, S., Ochoa-Lara, M., Zenteno-Cuevas, R., & Leon-Cordoba, K. (2010). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis. *World J Gastroenterol*, 16(12), 1500-1505.

- Sato, H., Takino, T., & Miyamori, H. (2005). Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci*, 96(4), 212-217. doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00039.x
- Schuindt, S. H., Oliveira, B. C., Pimentel, P. M., Resende, T. L., Retamal, C. A., DaMatta, R. A., . . . Arnholdt, A. C. (2012). Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet Parasitol*, 186(3-4), 207-215. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.035
- Seipel, D., Oliveira, B. C., Resende, T. L., Schuindt, S. H., Pimentel, P. M., Kanashiro, M. M., & Arnholdt, A. C. (2010). *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alpha v beta 3 integrin. *Vet Parasitol*, 169(3-4), 312-319. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.042
- Serrano-Luna, J., Cervantes-Sandoval, I., Calderon, J., Navarro-Garcia, F., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2006). Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. *Can J Microbiol*, 52(1), 16-23. doi: 10.1139/w05-114
- Serrano-Luna, J., Cervantes-Sandoval, I., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2007). A biochemical comparison of proteases from pathogenic naegleria fowleri and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. *J Eukaryot Microbiol*, 54(5), 411-417. doi: 10.1111/j.1550-7408.2007.00280.x
- Shi, G. M., Ke, A. W., Zhou, J., Wang, X. Y., Xu, Y., Ding, Z. B., . . . Fan, J. (2010). CD151 modulates expression of matrix metalloproteinase 9 and promotes neoangiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 52(1), 183-196. doi: 10.1002/hep.23661
- Sibley, L. D. (1993). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. *Seminars in Cell Biology*, 4(5), 335-344.
- Sibley, L. D., & Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359(6390), 82-85. doi: 10.1038/359082a0
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., & Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 4), 1669-1677.
- Sibley, L. D., Weidner, E., & Krahenbuhl, J. L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 315(6018), 416-419.
- Sissons, J., Alsam, S., Goldsworthy, G., Lightfoot, M., Jarroll, E. L., & Khan, N. A. (2006). Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiol*, 6, 42. doi: 10.1186/1471-2180-6-42
- Soldati, D., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 31(12), 1293-1302.

- Song, K. J., & Nam, H. W. (2003). Protease activity of 80 kDa protein secreted from the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol*, *41*(3), 165-169.
- Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. *Rev Soc Scient Sao Paulo*, *3*, 109-112.
- Stefanidakis, M., & Koivunen, E. (2006). Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood*, *108*(5), 1441-1450. doi: 10.1182/blood-2006-02-005363
- Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *17*, 463-516. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.463
- Strongin, A. Y. (2010). Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta*, *1803*(1), 133-141. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.04.009
- Sulik, A., & Chyczewski, L. (2008). Immunohistochemical analysis of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1, TIMP-2 expression in the central nervous system following infection with viral and bacterial meningitis. *Folia Histochem Cytobiol*, *46*(4), 437-442. doi: 10.2478/v10042-008-0058-8
- Sullivan-Jr, W. J., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*, *36*(3), 717-733. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x
- Tang, J., & Wong, R. N. (1987). Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem*, *33*(1), 53-63. doi: 10.1002/jcb.240330106
- Teo, C. F., Zhou, X. W., Bogyo, M., & Carruthers, V. B. (2007). Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. *Antimicrob Agents Chemother*, *51*(2), 679-688. doi: 10.1128/AAC.01059-06
- Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M. A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*, *8*, 170. doi: 10.1186/1471-2164-8-170
- Tomley, F. M., & Soldati, D. S. (2001). Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol*, *17*(2), 81-88.
- Toth, M., Sohail, A., & Fridman, R. (2012). Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol*, *878*, 121-135. doi: 10.1007/978-1-61779-854-2\_8
- Ueno, N., & Lodoen, M. B. (2015). From the blood to the brain: avenues of eukaryotic pathogen dissemination to the central nervous system. *Curr Opin Microbiol*, *26*, 53-59. doi: 10.1016/j.mib.2015.05.006
- UniProt. (2015). Taxonomía de *Toxoplasma gondii*. Retrieved Jun, 2015, from <http://www.uniprot.org/taxonomy/5811>



- Van den Steen, P. E., Van Aelst, I., Starckx, S., Maskos, K., Opdenakker, G., & Pagenstecher, A. (2006). Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria. *Lab Invest*, *86*(9), 873-888. doi: 10.1038/labinvest.3700454
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, *92*(8), 827-839. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D
- Vu, TH, & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *GENES & DEVELOPMENT*, *14*, 2123-2133.
- Walsh, P. N., & Ahmad, S. S. (2002). Proteases in blood clotting. *Essays Biochem*, *38*, 95-111.
- Werk, R. (1985). How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev Infect Dis*, *7*(4), 449-457.
- Williams, A. G., & Coombs, G. H. (1995). Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Int J Parasitol*, *25*(7), 771-778.
- Young, J. D., & Lowrey, D. M. (1989). Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic amoebflagellate *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem*, *264*(2), 1077-1083.
- Zainodini, N., Zare-Bidaki, M., Abdollahi, S. H., Afrooz, M., Ziaali, N., Ebrahimian, M., & Kazemi Arababadi, M. (2014). Molecular and serological detection of acute and latent toxoplasmosis using real-time PCR and ELISA techniques in blood donors of rafsanjan city, iran, 2013. *Iran J Parasitol*, *9*(3), 336-341.
- Zheng, B, Lu, S, Tong, Q, Kong, Q, & Lou, D. (2013). The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. *Vaccine*.
- Zhou, Zhao, F. R., Nisbet, A. J., Xu, M. J., Song, H. Q., Lin, R. Q., . . . Zhu, X. Q. (2014). Comparative proteomic analysis of different *Toxoplasma gondii* genotypes by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis combined with mass spectrometry. *Electrophoresis*, *35*(4), 533-545. doi: 10.1002/elps.201300044
- Zhou, Zhao, Q., Das Singla, L., Min, J., He, S., Cong, H., . . . Su, C. (2013). Differential proteomic profiles from distinct *Toxoplasma gondii* strains revealed by 2D-difference gel electrophoresis. *Exp Parasitol*, *133*(4), 376-382. doi: 10.1016/j.exppara.2013.01.009