

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
GRUPO DE ESTUDIO EN PARASITOLOGÍA MOLECULAR (GEPAMOL)

Línea de Investigación: *Toxoplasmosis*

INFORME FINAL DEL PROYECTO

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD SERINA PROTEASA EN TAQUIZOITOS DE
Toxoplasma gondii

INVESTIGADOR PRINCIPAL: JORGE ENRIQUE GÓMEZ MARÍN MD, Ph D.

CO- INVESTIGADOR: FABIANA LORA Lic. Biología

Joven Investigador: Aylan Arenas

Armenia, Febrero de 2005

Tabla de contenidos, tablas y figuras

1. Resumen
2. Introducción
 - 2.1. Generalidades de proteasas
 - 2.2. Proteasas y parásitos
 - 2.3. *Toxoplasma* y toxoplasmosis
 - 2.4. Invasión del *Toxoplasma gondii*
 - 2.5. Proteínas de *Toxoplasma*
 - 2.5.1. Proteínas de las roptrías
 - 2.5.2 Proteínas de micronemas
 - 2.5.3 Proteínas de los gránulos densos
 - 2.5.4 Proteínas mayores de superficie
 - 2.5.5 Antígenos excretorios/secretorios (ESA)
 - 2.6. Proteasas y *Toxoplasma*
3. MATERIALES Y METODOS
 - 3.1. OBTENCIÓN DE TAQUIZOITOS VIVOS DE *Toxoplasma gondii*
 - 3.2. FRACCIONAMIENTO CELULAR
 - 3.2.1. Obtención de antígeno total soluble
 - 3.2.2. Fraccionamiento de los productos liberados de los parásitos extracelulares (Antígeno secretorio excretorio-ESA-)
 - 3.3. Determinación de proteínas totales
 - 3.4. Purificación proteasica
 - 3.4.1. Cromatografía en bacitracina
 - 3.4.2. Cromatografía con arginina
 - 3.4.3. Cromatografía con benzamidina
 - 3.6. Ensayo de azocaseína
 - 3.7. Determinación del peso molecular por electroforesis en poliacrilamida no denaturante y denaturante
4. Resultados
 - 4.1. Obtención y ensayos de actividad proteasica en antígeno total soluble y ESA
 - 4.2. Purificación por cromatografía de afinidad

4.3. Actividad enzimática en las fracciones purificadas

4.4. Electroforesis denaturante y no denaturante

5. **Discusión**

6. Referencias

Tabla 1. Proteínas asociadas a las principales organelas del *T. gondii*.

Tabla 2. Antígenos de Superficie del *T. gondii*.

Figura 1. Gel de electroforesis en poliacrilamida en SDS 30% de antígeno total soluble y antígeno secretorio excretorio de *Toxoplasma gondii*

Figura 2. Zimograma de caseína con antígeno ESA y antígeno total soluble

Figura 3. Picos de absorbancia de fracciones 26, 27 y 28 luego de pasaje por columna de arginina sefarosa

Figura 4. A. Microplaca de reacción de azocaseína. B. Relación unidades de actividad tripsina y absorbancia

Figura 5. Zimograma de caseína en poliacrilamida 10% para fracciones 26, 27 y 28.

Figura 6. Electroforesis nativa de pool de fracciones

Figura 7. Electroforesis denaturante de fracciones purificadas

1. Resumen

Se realizó la caracterización enzimática de la actividad serina proteasa y la purificación de proteínas con esta actividad en antígeno total soluble y en antígeno secretorio excretorio de *Toxoplasma gondii*. Se encontró actividad serina proteasa del tipo tripsina en antígeno total soluble de *Toxoplasma* pero no en el antígeno secretorio excretorio. Luego de probar tres tipos de columnas de afinidad para serina proteasa solo la cromatografía con arginina permitió determinar la presencia de cuatro formas proteicas en la electroforesis nativa, siendo predominantes una de 45 KDa. En antígeno total o en fracción purificada se encuentra que una proteína de 45 KDa, de acuerdo con los resultados de la prueba de zimograma de caseína es la responsable de la mayor actividad serina proteasa del tipo tripsina en *Toxoplasma gondii*.

2. Introducción

2.1 Generalidades de proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que catalizan la degradación de uniones peptídicas tanto de proteínas como de péptidos. Las proteasas se dividen de acuerdo al grupo funcional que poseen en su sitio activo, así se pueden clasificar en cuatro grupos generales: serinas proteasas, aspartico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas (Rao et al. 1998).

Las proteasas son numerosas y están ampliamente distribuidas en virus, bacterias y células eucariotes. Esto sugiere que son vitales y que cumplen funciones que van desde el nivel celular hasta el orgánico. Las proteasas celulares de organismos eucariotes tienen un amplio rango de tamaño molecular que va desde 20 Kda a 800 Kda. Una gran cantidad de proteasas tienen componentes no proteicos como glicoproteínas o lipoproteínas y algunas requieren cationes divalentes, ATP u otro pequeño ligando. De otro lado son responsables de procesos complejos de la fisiología normal de la célula así como también de condiciones patológicas.

2.2 Proteasas y parásitos

Las proteasas están envueltas en el ciclo de vida de protozoarios que causan enfermedades tales como la malaria, la leishmaniasis, la amibiasis y la tripanosomiasis, así como también en la de parásitos como helmintos y en el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida o VIH (RAO et al. 1998).

Varios tipos de proteasas son expresados en diferentes estadios del ciclo de vida de los parásitos para apoyar los procesos de replicación y metamorfosis (MCKERROW et al. 1993,

MITRO et al.1994). Las proteasas son un blanco potencial para desarrollar agentes terapéuticos, como se ha hecho por ejemplo con el VIH. Entre algunas funciones que cumplen las proteasas en los parásitos de una manera general tenemos:

1. Participación en el proceso de invasión, a través de la degradación de las proteínas del citoesqueleto de la célula hospedera durante la invasión o ruptura de esta.
2. Facilitación del desplazamiento de parásitos a través de la degradación del tejido conectivo del hospedero.
3. Evasión de la respuesta inmune o modulación por degradación o activación del sistema inmune del hospedero.
4. Interacción con el sistema de coagulación sanguíneo y fibrinolítico del hospedero, que de por sí está compuesto de cascadas catalizadas por proteasas.
5. Remodelación parasitaria durante la transición de un estado morfológico a otro.
6. Activación o recambio de hormonas peptídicas, enzimas o proteínas regulatorias.
7. Participación en el metabolismo cuando están dentro del hospedero. De esta forma toman ventaja aprovechando las abundantes proteínas del ambiente donde el parásito reside (MCKERROW et al.1993).

2.3. *Toxoplasma* y toxoplasmosis

Toxoplasma gondii pertenece al phylum *Apicomplexa* y a la clase *Sporozoa* (DUBEY et al. 1998) a la cual pertenecen parásitos intracelulares que tienen una estructura celular característica, un citoesqueleto complejo y un arreglo de organelas en sus extremos apicales. *T. gondii* es un parásito cosmopolita con capacidad de infectar y replicarse dentro de virtualmente cualquier célula nucleada de mamíferos o aves. Su ciclo de vida se divide entre infección felina y no felina, lo que corresponde a la replicación sexual y asexual respectivamente.

Los hospederos intermediarios de *T. gondii* son posiblemente más de 220 especies, entre los que se hallan aves, mamíferos, animales domésticos, marsupiales y el hombre (FREYRE 1998, DUBEY 1996). En ellos se encuentran las formas proliferativas al comienzo de la infección: los taquizoitos, que se reproducen endocelularmente en los distintos tejidos y en macrófagos (reproducción asexual). Si el hospedero resiste la infección, el parásito permanece en sus tejidos en forma de quistes toxoplásmicos.

Cuando un felido se alimenta de un hospedero intermediario (pájaros, roedores, entre otros), a partir de los bradizoitos contenidos en los quistes tisulares, se generan en su intestino nuevos elementos de diseminación del parásito: los ooquistes (conteniendo en su interior dos esporoquistes los cuales contienen cada uno cuatro esporozoitos) que son eliminados al medio externo. Además del gato doméstico, se comprobó que algunos felidos silvestres también excretan ooquistes, cuando son infectados con quistes tisulares. Los herbívoros se infectan por ingestión de ooquistes esporulados de *T. gondii*. Los carnívoros y omnívoros se infectan por la ingestión de vísceras y músculos parasitados por bradizoitos contenidos en quistes tisulares. En el caso del hombre, cuando se alimenta sobre todo con carne de cerdo u ovina insuficientemente cocida. Para casi todas las especies, se ha comprobado además la transmisión transplacentaria.

Los bradizoitos contenidos en los quistes tisulares o los esporozoitos de los ooquistes penetran las células epiteliales del intestino, y se transforman en taquizoitos. El taquizoito entra a la célula hospedera por penetración activa de la membrana y posiblemente también por fagocitosis. Una vez en el interior, el taquizoito queda aislado en una vacuola parasitófora (VP). En ella los taquizoitos se multiplican rápidamente por endodiogenia (reproducción asexual). La célula parasitada estalla y los taquizoitos invaden nuevas células. Este protozoo se puede distribuir localmente en los ganglios linfáticos mesentéricos y llegar a órganos distantes a través de la linfa y la sangre, en macrófagos o libres (DUBEY 1997).

Los taquizoitos son extremadamente lábiles frente a factores ambientales comunes, siendo pues la fase por la cual se lleva a cabo la diseminación dentro del hospedero, por lo cual carece prácticamente de significación epidemiológica. Sin embargo, pudiera considerarse eventual la transmisión por vía hemática durante la fase de parasitemia de 10 días y no se puede dejar de lado el importante papel de esta fase en el pasaje transplacentario de la toxoplasmosis al feto (DUBEY 1995).

Hacia la tercera semana de la primoinfección, los taquizoitos comienzan a desaparecer de los tejidos viscerales, se rodean de una membrana propia y se multiplican lentamente, originando unidades llamadas bradizoitos. El conjunto de éstos y la cubierta se denominan quistes tisulares, localizados principalmente en tejido nervioso, retina y el músculo. Los quistes tisulares persisten por largo periodo de tiempo: meses o años, en el humano de por vida, y mantienen el estado latente de infección (DUBEY 1998, SMITH 1995).

Los bradizoitos son resistentes a la digestión péptica. La pared del quiste se disuelve rápidamente en contacto con una solución de pepsina y ácido clorhídrico, pero los organismos liberados de este modo son capaces de sobrevivir en el fluido digestivo hasta por tres horas. Por este motivo, el quiste toxoplásmico tiene gran importancia epidemiológica como estadio infectante. Luego de la ingestión de quistes tisulares por el gato, la pared del quiste es disuelta por las enzimas proteolíticas del estómago e intestino delgado. Los bradizoitos liberados penetran las células epiteliales del intestino delgado e inician la fase agamogónica o esquizogónica (reproducción sexual). La gametogonia comienza hacia las 60 horas, dando rápidamente paso a la formación de ooquistes, lo que se prolonga de 3 a 15 días, y durante este período se excretan millones de ellos.

Los ooquistes para ser infectantes deben esporular, dicha esporulación ocurre en el medio externo en uno a cinco días, dependiendo de la aireación y temperatura. Estos

dependiendo de las condiciones medio ambientales pueden persistir viables entre seis meses y un año, pueden resistir la congelación y la sequía (DUBEY 1998).

2.4. Invasión del *Toxoplasma gondii*

En los diferentes estudios del ciclo biológico, el parásito va a presentar siempre su forma característica de media luna a la que debe su nombre, cuyos componentes celulares se mantienen constantes, consistiendo de una membrana celular, citoplasma con sus organelas, núcleo, membrana nuclear y en su polo anterior o apical una estructura característica del phylum *Apicomplexa*, la roptría, con funciones secretorias y fundamental en el proceso de invasión. Igualmente en este polo encontramos pequeñas organelas apicales denominadas micronemas, presentes en el estadio invasivo de todos los *Apicomplexa*.

Se han estudiado las proteínas constitutivas del parásito en cada uno de sus estadios en el hospedero intermediario, con especial énfasis en las proteínas de membrana y de los gránulos densos secretados por la roptría.

Como cualquier parásito intracelular, el proceso de invasión celular juega un papel crucial para la supervivencia del parásito y para ello la superficie del *T. gondii*, debe de cumplir muchas funciones durante este evento, tales como el anclaje, la señalización, el transporte y la interacción con las células del hospedero. Por estas razones, las investigaciones se han encaminado principalmente a las proteínas de superficie para determinar la importancia en el proceso de invasión, su inmunogenicidad, su papel en la patogénesis, así como su potencial inmunoprotector, además de su utilidad en las pruebas diagnósticas. También se ha evidenciado un importante papel de las proteínas secretorias durante la invasión.

Los eventos mecánicos durante la invasión incluyen (KASPER et al. 1994):

1. Anclaje a la célula hospedera
2. Protrusión del conoide
3. Formación y movimiento de las uniones del parásito y la célula
4. Exocitosis del micronema con secreción de las proteínas MIC
5. Exocitosis de la Roptría (Proteína ROP1 o factor facilitador de la invasión PEF) y adecuación del parásito dentro de la vacuola parasitófora (compartimiento subcelular).

El anclaje es una interacción específica de las membranas del parásito y la célula hospedera, que involucra una serie de moléculas específicas que actúan como ligandos durante el reconocimiento y anclaje celular, como la laminina del parásito así como el receptor de laminina de la célula hospedera, y las moléculas de la superficie SAG2, SAG3 y fosfolipasa A, con importancia variable según los autores (KASPER et al. 1994, TOMAYO S, 1996, BOOTHROYD et al. 1998, GÓMEZ 1997). Se ha descrito que *T. gondii* entra en la célula hospedera por un proceso activo de invasión, promueve la invaginación de la membrana celular por ejecución de movimientos rotatorios y secreción de un factor lítico facilitador de la penetración; bajo deformación ameboide del parásito, la membrana de la célula hospedera no es rota, pero rodea al parásito para formar la vacuola parasitófora (PINGRET et al. 1996).

Una vez establecida la invasión a la célula hospedera, el parásito inicia su fase de reproducción rápida que lisa a la célula hospedera y nuevamente invade otra célula, hasta que las condiciones le son adversas y asume una forma de latencia en su fase de taquizoito la cual le confiere gran resistencia gracias a la formación de los quistes tisulares, donde permanecerá latente, siempre que el estado inmunitario del hospedero sea efectivo, de no serlo, entonces este rápidamente se convierte nuevamente a la fase de

multiplicación rápida o taquizoito, por esto actualmente esta creciendo el interés de los eventos bioquímicos implicados en esta interconversión.

2.5. Proteínas de *Toxoplasma*

2.5.1 Proteínas de las roptrías: Las roptrías son aproximadamente ocho organelos excretorios, como sacos de 2,5 μm alargados, que van por el interior del conoide con salida al exterior. Los ductos alargados de las roptrías desembocan en la superficie del taquizoito (SCHWARTZMAN 1986). Estos organelos pueden excretar productos con actividad lítica que facilitan y están asociados a la invasión. Estas sustancias pueden causar una vacuolización puntual y desintegración de la membrana celular. Diez proteínas de las roptrías de *T. gondii* se han identificado donde se destacan la proteína ROP1 de 61 kDa previamente conocida como factor facilitador de penetración o "penetration-enhancing factor" (PEF) con actividad lítica contra la membrana celular de la célula hospedera, y la ROP2 de 54 kDa, la cual está asociada con la vacuola parasitófora. La liberación del contenido de las roptrías puede ser coadyuvada por una fosfolipasa Ca^{+2} dependiente (SAFFER et al. 1991)

2.5.2 Proteínas de micronemas: Los micronemas son organelos estrechamente relacionados con las roptrías y se cree que tienen igual función excretoria (*DUBEY et al. 1998*). Tres proteínas de micronemas han sido descritas en *T. gondii*: MIC1 de 60 kDa, MIC2 de 120 kDa y MIC3 de 90 kDa (BONHOMME et al. 1998)

2.5.3 Proteínas de los gránulos densos: Los gránulos densos son organelos distribuidos en el citoplasma del taquizoito, su contenido enriquece de proteínas la red reticular de la vacuola parasitófora y se ha demostrado que se localizan en la membrana de este compartimento. Las proteínas de los gránulos densos son también liberados en el ambiente como antígeno excretorio/secretorio (CESBRON 1994, CHARIF et al. 1990). Se

han descrito siete proteínas provenientes de los gránulos densos: GRA1 de 23 kDa, GRA2 de 28,5 kDa, GRA3 de 30 kDa, GRA4 de 40 kDa, GRA5 de 21 kDa, GRA6 de 32 kDa (WONG et al. 1993, CESBRON 1994) y más recientemente GRA7 de 29 kDa (BONHOMME et al. 1998)

2.5.4 Proteínas mayores de superficie: La P30 es la proteína mayor de superficie y tiene importancia en la adherencia a la célula huésped. Otras proteínas mayores de superficie que también se han caracterizado son P22, P23, P35 y P43 de acuerdo a su movilidad electroforética (BOOTHROYD et al. 1998). Estas proteínas tienen carácter inmunogénico y están ancladas a la membrana parasitaria del taquizoito por una molécula de glicosil- fosfatidil- inositol (GPI).

2.5.5 Antígenos excretorios/secretorios (ESA): Son antígenos que se han encontrado en cultivos celulares infectados con *T. gondii*. Estos antígenos constituyen el 90% del antígeno circulante en el hospedero. Estas proteínas son altamente inmunogénicas, están implicadas tanto en la generación de anticuerpos como en la respuesta celular (WONG et al. 1993). La ESA P28, está presente en los gránulos densos, y en lo profundo de la membrana externa del taquizoito, en el aparato de Golgi donde probablemente esta empaquetada para la secreción y en la red intravacuolar de la VP y también esta presente en los bradizoitos y la pared del quiste (WONG et al. 1993, CESBRON 1994). También se ha clonado y expresado otro antígeno P23, el cual está en los gránulos densos tanto de taquizoitos y bradizoitos y se secreta en la red tubulovesicular de la VP. Este antígeno es reconocido por sueros de pacientes con enfermedad crónica y es pobremente reconocido por los pacientes con infección aguda (CESBRON 1994, WONG et al. 1993, CESBRON et al. 1989). Otra proteína considerada antígeno excretorio-secretorio es el factor de aumento de penetración o "penetration enhancing factor" aislada de taquizoitos el cual esta implicado en el proceso invasivo (WONG et al. 1993, NORRBY R, 1971). Otro antígeno excretorio-secretorio de membrana

identificado por clones de células reactivas por *T. gondii* y que es potencialmente protectoro es una proteína de 54 KDa (WONG et al. 1993).

Tabla 1. Proteínas asociadas a las principales organelas del *T. gondii*.

<i>Molécula</i>	<i>KD</i>	<i>Localización</i>
SAG 1/2/3/4/5	30/22/42/23/35	Superficie del trofozoito
GRA 1/2/3/4/5/6/7	22-27/28.5/30/40/21/32/26-29	Gránulos densos
NTP1	63	
ROP 1/2/3/4/5/6/7/8	60/55-59/60-59.5/42/57-60/200	Roptría
MIC 1/2/3	60/120/90	Micronemas

Modificado y actualizado. Smith 1996, Jacobs 1997, Fischer 1998.

Tabla 2. Antígenos de Superficie del *T. gondii*.

<i>Proteínas</i>	<i>Gene</i>	<i>Tamaño KDa</i>	<i>Expresión en el taquizoito</i>	<i>Expresión en el bradizoito</i>	<i>Expresión en el esporozoito</i>
P22	SAG2	19,0	+	-	?
P23	----	----	+	?	?
P30	SAG1	32,9	+	-	-
P35	SRS3	36,2	+	?	?
P43	SAG3	41,8	+	+	?
SRS1	SRS1	44,2	+	-	?
SRS2	SRS2	39,5	+	?	?
P36	BSR4	42,3	-	+	?
P18	SAG4	18,5	-	+	?
SRS4	SRS4	----	?	?	?
SAG5	SAG5	39,1	?	?	?

Tomado de Boothroyd et al. 1998.

2.6. *Proteasas y Toxoplasma*

Al hacer un recorrido de la estructura antigénica del taquizoito así como también de su complejo mecanismo de invasión activa, es obvio pensar que existen grupos de enzimas propias de este protozoario que podrían tener actividad proteolítica y colaborar en esta

compleja acción de invasión, como existen en otros protozoarios de importancia médica. Estas proteasas podrían estar ubicadas o provenir de diversos organelos como roptrías, micronemas, gránulos densos o ser componentes de los antígenos excretorio-secretorio. No solo estas proteasas estarían involucradas en la invasión si no también en el procesamiento de proteínas del parásito como lo señala Carruthers (CARRUTHERS et al. 2000) el cual propone que la MIC2 secretada en el momento de la invasión tiene que ser procesada proteolíticamente por dos proteasas distintas para cumplir su función de adhesina. Una de estas la denominó MPP1 y la otra MPP2 (MPP "microneme protein protease"). Esta última (MPP2) la caracterizó parcialmente como una serina activa a pH neutro (CARRUTHERS et al. 2000). Estos autores infieren en *Toxoplasma gondii* un posible sustrato para proteasas propias del parásito. Pero otras proteasas podrían estar involucradas en la digestión de péptidos exógenos, en el mantenimiento intracelular del parásito o en el complicado ciclo de vida de este coccidio.

Entre los trabajos pioneros de estudio de actividad proteolítica de este protozoario esta el de Choi y colaboradores (1989) los cuales encontraron actividad proteolítica en extracto total de este protozoario purificado por métodos convencionales de cromatografía de intercambio iónico, filtración por gel y cromatografía de hidroxilapatita. Las enzimas parcialmente purificadas se probaron con diferentes inhibidores específicos y promotores. Se detectó una actividad caseinolítica significativa con pH óptimo de 6,0 empleándose como promotor enzimático DTT y que fue inhibido con iodoacetamida (IAA) inhibidor de cisteína proteasa. En estas mismas fracciones se detectó otra actividad con pH óptimo de 8,0 empleándose como promotor enzimático ATP, sin embargo un exceso de ATP por encima de 2 mM inhibía la actividad. La actividad a pH 8,0 fue inhibida por un inhibidor de serinas proteasas, fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF). Con estos datos se estableció que la forma referida al pH 6,0 es una cisteína proteasa ácida y la otra actividad de pH 8,0 fue una serina proteasa neutral ATP dependiente (CHOI et al. 1989).

Otro estudio reciente confirma la posible existencia de actividad serina proteasa, por medio de dos inhibidores irreversibles de serinas proteasas, 3,4-dicloroisocoumarina 27 (3,4-DeI) y Fluoro 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo (AEBSF), con las cuales se obtuvo una disminución en la penetración e invasión celular por parte de los taquizoitos del *T. gondii* en un sistema de cultivo celular y sin alterar la integridad estructural del parásito. El pretratamiento de las células hospederas con estos inhibidores no afectó la invasión, sugiriendo que las enzimas parasitarias son el blanco de estos inhibidores y que estos inhibidores no afectan las proteasas de las células hospederas (CONSEIL et al. 1999).

También otros tipos de actividades proteolíticas, como la actividad metaloproteásica han sido puestas en evidencia por Schwarztmann y colaboradores quienes reportaron que la 1.10 fenantrolina (inhibidor de metaloproteasas) reduce en un 56% la infección de las células hospederas en un sistema in vitro (SCHAWRZTMANN et al. 1992).

Recientemente ha sido purificada y caracterizada una metalopeptidasa inmunogénica, la cual inhibe su actividad proteolítica en presencia de 1.10 Fenantrolina y EDTA (BERTHONNEAU et al. 2000). Otra actividad proteolítica que ha sido propuesta es la actividad cisteína proteásica, descrita en el trabajo de Choi y colaboradores (CHOI et al. 1989) al caracterizar parcialmente una actividad cisteína proteasa ácida (pH 6,0) y recientemente por la identificación de dos genes de cisteína proteasa en *T. gondii* que están relacionados estrechamente con la catepsina B. La caracterización bioquímica y molecular de estas enzimas se encuentra en estudio, citado por Rosenthal (ROSENTHAL, 1999).

Al igual que otros protozoarios de importancia médica, aún quedan muchos vacíos con respecto a las enzimas con actividad proteolítica. Entre las preguntas por contestar se encuentran por ejemplo: cuál es la función que cumplen en el metabolismo de *T. gondii* o el papel en la interacción hospeder-parásito. Esta información es importante para futuras

alternativas de quimioterapia. Sin embargo, se hace necesario aportar conocimientos sobre otras actividades proteásicas que deben existir como las reportadas en otros parásitos, así como su localización en el parásito e inferir sus funciones durante la invasión y sobrevivencia de éste protozoo dentro de la célula hospedera.

Recientemente Buitrago-Rey et al. (2002) demostraron en un modelo murino de infección que AEBSF prolongó la sobrevivencia de ratones ICR ante un reto letal con *Toxoplasma*, sin embargo no se evitó la muerte de estos ratones. Estos resultados demuestran la utilidad potencial de inhibidores de serinas proteasas en terapéutica y la necesidad de conocer mejor la estructura de las serinas proteasas parasitarias con el fin de diseñar inhibidores con más potencia.

La mayoría de las sustancias caracterizadas químicamente que han sido implicadas en la patogenicidad y virulencia del *T. gondii* están localizadas en la pared celular; ellas pueden participar en la adherencia del parásito, en la fagocitosis, en la multiplicación y procesamiento antigénico por parte de los macrófagos, pero no se ha evidenciado el papel ni la ubicación de las proteasas durante el proceso de invasión.

Las proteasas están envueltas en el ciclo de vida de protozoarios que provocan enfermedades tales como la malaria, la leishmaniasis, la amibiasis y la tripanosomiasis, (MCKERROW et al. 1993, ROSENTHAL PJ, 1999) y se ha evidenciado que juegan un papel importante en los procesos de invasión y penetración de los parásitos a la célula hospedera así como también en la de parásitos como helmintos y en virus como el de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH).

En *T. gondii* es obvio pensar que existen grupos de enzimas que podrían tener actividad proteolítica y colaborar en su compleja acción de invasión, como existe en otros protozoarios de importancia médica (AGUILAR F, 2001). Se ha demostrado en otros

Apicomplexos tales como *Plasmodium* que los inhibidores de proteasas pueden bloquear la invasión; aunque hay diferencias entre especies, estos estudios implican especialmente serinas y cisteínas proteasas en la invasión Apicomplexa (MILLER et al. 2001), y su caracterización en *T. gondii* podría guiar la búsqueda de nuevos métodos de control, diagnóstico y prevención.

Se hace necesario caracterizar la actividad de las sustancias químicas involucradas en los procesos de invasión de las células hospederas por el parásito *T. gondii*. Igual que en otros parásitos de importancia médica, las proteasas de *T. gondii* podrían participar en su ciclo de vida promoviendo la proteólisis celular favoreciendo la penetración e invasión. Sin embargo es poco el conocimiento del sustrato fisiológico de muchas de estas proteasas celulares, qué regula los procesos proteolíticos o cuál es la función específica de cada una de estas sustancias

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) caracterizar la actividad proteolítica de serinas proteasas por medio de métodos colorimétricos y electroforéticos en antígeno total y antígeno secretorio/excretorio (ESA) de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, ii) identificar el método cromatográfico más eficiente en la purificación de las serinas proteasas de *Toxoplasma gondii* y realizar la purificación y determinación de actividad serina proteasa en las fracciones obtenidas por estos métodos. Se seleccionó la actividad serina proteasa ya que previamente se mostró que su inhibición disminuye de manera importante la invasión del *Toxoplasma* (BUITRAGO et al, 2002) pero hasta el presente no se han realizado intentos por caracterizarla y purificarla.

3. MATERIALES Y METODOS

3. 1. OBTENCIÓN DE TAQUIZOITOS DE *Toxoplasma gondii*:

Para preparar el antígeno total soluble se inocularon 50 ratones suizo cepa ICR (Instituto Nacional de Salud) con taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. Se obtuvo una concentración de 1×10^8 taquizoitos a partir del exudado peritoneal de los ratones infectados. Se realizaron observaciones al microscopio óptico para verificar la presencia y viabilidad de los taquizoitos. Los taquizoitos se lavaron por centrifugación 2 veces a 2.500 rpm por 15 minutos con solución salina 0,85% (SSN). El sedimento se resuspendió en 5 ml de solución salina 0,85% estéril y se filtró a través de una membrana estéril de policarbonato con una porosidad de $3 \mu\text{m}$, y verificando a través de la microscopía que el preparado estuviera libre de células de ratón. El filtrado se centrifugó a 3.500 rpm por 15 minutos, el sedimento en forma de botón se resuspendió en 1,0 ml de solución salina estéril y se realizó conteo en la cámara de Neubauer (AGUILAR F, 2001)

3.2. FRACCIONAMIENTO CELULAR

3.2.1. Obtención de antígeno total soluble: El lavado peritoneal se centrifugó a 1500 g por 10 minutos, se lavaron y resuspendieron en PBS frío sin calcio y conteniendo 1 mM EGTA e inhibidores de proteasas (10 $\mu\text{g/ml}$ de TLCK, 10 $\mu\text{g/ml}$ de PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de E-64). Los parásitos fueron lisados por cinco ciclos de congelación / descongelación seguido de sonicación en frío por 7 ciclos de 20 segundos de 80A a 20 KHz y se observó a microscopio (40X). Los residuos de parásito fueron centrifugados a baja velocidad (10 min a 2500 x g) y se recuperó el sobrenadante.

3.2.2. Fraccionamiento de los productos liberados de los parásitos extracelulares (antígeno excretorio/secretorio –ESA–): Los taquizoitos de la cepa RH ($1,5 \times 10^8$) fueron pasados por filtro $3 \mu\text{m}$ y resuspendidos en medio de invasión (DMEM, 20 mM HEPES, suero fetal bovino 3%). Las alícuotas fueron inducidas a la secreción añadiendo A23187 0,4 μM . Los parásitos se removieron por centrifugación por 10 min a 1.000 g y se recolectó el antígeno excretorio/secretorio soluble (ESA) del

sobrenadante filtrándolo en una membrana Millipore de 0,22 μm . La preparación ESA se almacena a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (MILLER et al. 2001)

3.3 DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

La cuantificación de proteínas del antígeno total soluble de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* se realizó por el método de Lowry. Se usó reactivo A que era tartrato de sodio 0,2 g, NaCO_3 10 g, NaOH 1N 50 ml y se completó a 100 ml con agua destilada. El reactivo B $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g y tartrato de sodio 1 g en 100 ml de agua destilada. Se mezclaron 25 ml de A y 0,5 ml de B y de la solución resultante se tomaron 120 μl y 80 μl de la muestra a examinar. Luego se agregaron 20 μl de reactivo de Folin en una microplaca de 96 pozos. Se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. La absorbancia a 490 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Dynatech MR 5000). Se utilizó una curva de calibración con patrones de albúmina.

3.4. PURIFICACIÓN PROTEÁSICA

3.4.1 Cromatografía en Bacitracina- Sefarosa 4B: El antígeno total soluble y el ESA fueron concentrados a 2 X el volumen original. Se tomó 1 ml de estas muestras para aplicarla a una columna de Bacitracina (Sigma) ligada a Sepharosa 4B (Pharmacia) empacada en una columna de vidrio de 10 cm x 0,7 cm. La muestra era equilibrada con Tris/HCl 50 mM pH 9,0 y se aplicaba a la columna en un flujo de 0,5 ml/min. La columna fue lavada con tampón acetato de sodio 0,1 M/ NaCl 0,3 M de pH: 7, 6, 5 y 4.

3.4.2 Cromatografía con Arginina-Sepharosa 4B: Los productos del antígeno total soluble y del ESA fueron aplicados a una columna de arginina-sepharosa de 1,5 x 30 cm (Biosciences, Amersham). En un volumen de 1 ml la muestra era equilibrada con Tris/HCl 50 mM pH 9,0 y se aplicaba a la columna en un flujo de 0,5 ml/min.

La columna fue lavada con buffer acetato de sodio 0,1 M/ NaCl 0,3 M a diferentes pH: 7, 6, 5 y 4.

3.4.3 Cromatografía con benzamidina: A 1 ml de las muestras de antígeno total soluble y de ESA se le agrego 25 μ l de NaOH; la muestra fue pasada por un filtro de 0,45 μ M. Después se inyectó un 1 ml en la columna y se eluyeron a una velocidad de 0,5 ml/min con volúmenes de 10 ml de tampón acetato de sodio 0,1 M mas NaCl 3M a pH 7, 6, 5 y 4 respectivamente.

Las fracciones que mostraban absorbancias a 280 nm luego de la elusión, fueron combinadas, concentradas y comprobadas en actividad usando los ensayos de azocaseína y zimograma de caseína.

3.5. ZIMOGRAMA

Para este análisis se utilizó caseinato de sodio (1%) copolimerizado con los geles de poliacrilamida. Las muestras se cargaron en el gel sin calentar y se llevó a cabo una electroforesis a temperatura ambiente, en una corriente constante de 25 mA. Luego de la electroforesis, los geles se lavaron sucesivamente 2 veces con agua desionizada y luego 2 veces con tampón Tris cada uno por 30 min a 4 °C. Los geles se incubaron toda la noche en tampón Tris con $MgCl_2$ 5 mM a temperatura ambiente. Finalmente los geles se colorearon con azul de Coomassie 0,1 % R 250 en 4:1:5 metanol/ácido acético/agua (vol/vol/vol) y fueron desteñidos en la misma solución sin el colorante para revelar las zonas de hidrólisis del sustrato (SECADES y GUIJARRO 1999). Para el cálculo del peso molecular aproximado de las bandas con actividad caseinolítica se utilizó la fórmula de coeficiente de movilidad (R_f) según el frente de corrido y aplicándolo a la curva correspondiente.

3.6. ENSAYO DE AZOCASEINA

La actividad caseinolítica se ensayó a diferentes valores de pH con un rango de 4 a 11 usando azocaseína como sustrato. Se usó una solución madre de azocaseína preparada así: 10 mg de azocaseína (Sigma, USA) en 1 ml de agua destilada. Para medir la actividad se preparó una mezcla de reacción compuesta así: 200 μ l de azocaseína más 100 μ l de la muestra a ensayar más 200 μ l de uno de los siguientes tampones de acuerdo al pH: para pH 5 de tampón citrato disódico 100 mM; para pH 9,6 de tampón glicina NaOH 100 mM; para pH 7,0 de tampón fosfato 100 mM. Cuando se ensayaban inhibidores esto se agregaba en volumen de 100 μ l 10 minutos antes de adicionar la muestra. La mezcla se incubaba a 35°C por 30 minutos para las muestras de antígeno total o de antígeno secretorio / excretorio o 3 h para las fracciones obtenidas luego de la cromatografía. La reacción se detuvo agregando 600 μ l de ácido tricloroacético frío al 10 % a la mezcla. El precipitado se removió por centrifugación a 8.000 g por 3 min y se recogió 0,5 ml del sobrenadante y se mezcló con 0,7 ml de NaOH 1 M y se leyó la absorbancia a 440 nm. Se utilizó una curva de actividad de tripsina 0 a 930 unidades estándar por mg de proteína (U/mg) para estimar las unidades de actividad proteásica tipo tripsina. El inhibidor utilizado fue 100 μ g/ml de AEBSF (4- Aminoethyl-benzene sulfonyl fluoride hydrochloride, Sigma, USA, referencia A8456), un inhibidor específico de serina proteasa.

3.7. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR POR ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA NO DENATURANTE Y DENATURANTE

El peso molecular se determinó tanto por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida como en electroforesis denaturante y en ambas electroforesis se tiñó el gel con azul de Coomassie y coloración de plata. La electroforesis se realizó de acuerdo a lo descrito por otros autores (MARCOLINO et al. 2000). Para el gel nativo o no denaturante se desarrolló la siguiente metodología, se depositaron 10 μ g por pozo de antígeno total soluble, antígeno ESA y pool de fracciones, diluido en tampón de muestra (1 ml de Tris, 1 ml de

glicerol y un 1 ml desionizante con azul de bromofenol 0,25 mg). Se utilizó un marcador de proteínas para electroforesis nativa (Sigma, USA referencia MW-ND 500) preparadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó un gel de poliacrilamida 8%. El corrido se realizó con una corriente de 50 v por seis horas, luego se incubó por dos horas en 100 ml de una solución de fijado (40 ml de metanol, 70 ml de ácido acético y 53 ml de agua) por dos horas. Luego se tiñe con azul de comassie 0,25% por 6 horas y se deja en solución de decoloración (53:7:40 de metanol/ácido acético/agua) por 24 horas.

Para la electroforesis denaturante se utilizó antígeno soluble total de *T. gondii*, antígeno ESA y pool de fracciones a una concentración de 10 µg por pozo diluido en tampón de carga en condiciones reductoras y esta solución se sometió a calentamiento en baño maría a 100°C por 5 minutos. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE), a una concentración de gel de 15% a 150 v por 1 hora. Se usó un patrón de proteínas de pesos moleculares medios de BIO-RAD (USA).

El cálculo del peso molecular para las bandas de proteínas se hizo de acuerdo con los patrones de peso molecular y usando digitalización de la imagen del gel y análisis con el programa UN-Scan-It Densitometer version 5.1 (Silk Corporation, US).

4. RESULTADOS.

4.1. Obtención y ensayos de actividad proteasica en antígeno total soluble y de

ESA: Se obtuvo una concentración de 10 mg/ml de antígeno total soluble de *Toxoplasma gondii* sin contaminación de células de ratón y en el antígeno ESA se obtuvo una concentración de 2,2 mg/ml. En la figura 1 se observa un gel de electroforesis en poliacrilamida con tinción por azul de Coomassie con estos antígenos. En la Figura 2 se observa un zimograma de caseína con estos preparados y se encuentran cuatro bandas en el antígeno total soluble. No hubo actividad serina proteasa detectable en el antígeno ESA en la prueba de azocaseína ni en el ensayo de zimograma de caseína.

4.2. Purificación por cromatografía de afinidad: Se pasaron por las tres columnas de afinidad. De cada columna se obtuvieron treinta fracciones a las cuales se les realizaron los análisis bioquímicos. De todas ellas solo se observaron picos de absorbancia (A280 nm) para proteínas luego de paso y elución en la columna de arginina- sefarosa para las fracciones 21, 22, 23 eluidas con tampón a pH 5 y en las fracciones 26, 27 y 28 eluidas con tampón pH 4 (Figura 3).

4.3. Actividad enzimática en las fracciones purificadas: Las treinta fracciones obtenidas de la columna arginina – sefarosa, se les determinó la actividad proteasica por el método de azocaseína utilizando un sustrato específico de caseína 1 mg/ml (Figura 4). Se utilizó un control de tripsina (10 mg/ml) y un inhibidor específico el AEBSF. El pool de las fracciones tuvo una actividad de 22 U/mg con referencia al patrón tripsina en el ensayo de azocaseína. Se encontró una inhibición completa de la actividad en presencia de este inhibidor específico AEBSF (Figura 4, A). El ensayo tuvo una correlación entre absorbancia y actividad enzimática tipo tripsina de más de 0,99 (Figura 4, B). El zimograma de estas

fracciones mostró actividad serina proteasa y la presencia de dos bandas una por encima y otra por debajo de la banda de albúmina que no tiene actividad enzimática (Figura 5).

4.4. Electroforesis denaturante y no denaturante: En la electroforesis nativa se observaron cuatro bandas, pero predominando la de 46 KDa (Figura 6). El mismo pool en condiciones denaturantes encuentra una sola banda de 46 KDa (Figura 7).

5. DISCUSIÓN.

Este trabajo permitió demostrar la presencia de actividad serina proteasa del tipo tripsina en antígeno total soluble de *Toxoplasma* pero no en el antígeno secretorio excretorio. Esta misma actividad solo se pudo obtener de nuevo luego de cromatografía de afinidad con arginina y permitió determinar la presencia de cuatro formas proteicas en la electroforesis nativa, predominando la de 46 KDa. Es interesante anotar que en el antígeno total el zimograma permite observar cuatro bandas con actividad caseinolítica pero que luego de paso por la columna de arginina solo se encuentran dos; esto a pesar de que en la electroforesis nativa se observan cuatro bandas. De todas maneras la banda que en todos los ensayos de zimograma sea con antígeno total o con fracción purificada muestra mayor intensidad es la de 45 KDa, lo que sugiere que sea esta la responsable de la mayor actividad serina proteasa del tipo tripsina en *Toxoplasma*. Es posible que las otras formas observadas en la electroforesis no denaturante del pool de fracciones purificada, sean forma multimericas de la proteína de 46 KDa. La proteína que se obtuvo en la columna de arginina fue eluida con tampones ácidos (pH 4 y 5).

Las serinas proteasas del tipo tripsina son parte de una familia de enzimas cuya sitio activo esta conformado por un residuo de aspargina unido por puentes de hidrogeno a histidina y a la serina y con residuos vecinos al sitio activo son altamente conservados. Las serinas proteasas poseen un grupo hidroxilo en su sitio catalítico que atacan al grupo

carbonilo de las uniones peptidicas para formar un tetrahedro intermedio antes de la hidrólisis (COOMBS et al, 1997). La actividad serina proteasa podría facilitar el deslizamiento del parásito al intervenir en la degradación de la matriz celular o por activar las integrinas que facilitan la adhesión del taquizoito (COOMBS et al, 1997). Es por ello que dado el papel de las serinas proteasa en invasión del parásito, las serinas proteasas del tipo tripsina podrían ser la señal que activan las integrinas a las lamininas del parasito. El no encontrarla en el antígeno secretorio excretorio podría indicar que serían excretadas solo en el momento de contacto con la membrana de la célula hospedera. Se ha determinado que las proteínas de superficie del parásito o familia SRS a la que pertenecen la SAG1, SAG2 y SAG3 funcionan como adhesina, un modelo plausible entonces es que estas y las proteínas MIC funcionarían reconociendo y adhiriendo al parásito y luego de esto alguna señal implicaría la secreción de la serina proteasa que a su vez permitiría la fusión de membranas.

Previamente se ha descrito una serina proteasa de 85 KDa en *Toxoplasma* que tiene actividad de subtilisina y actúa en procesos de degradación intracelular de proteínas del parásito (MILLER et al. 2001). Dado el tipo de columna utilizada nosotros hemos purificado una serina proteasa diferente que sería del tipo de tripsina y que tendría papel en otras funciones del parásito y más probablemente es aquella que sería inhibida por el AEBSF bloqueando invasión. Aunque evidentemente no se puede descartar que AEBSF inhiba también la subtilisina y que el efecto importante del AEBSF observado en cultivo celular (CONSEIL et al 1998) y en el modelo ratón de infección (BUITRAGO et al 2000) se deba a que puede inhibir varias serinas proteasas con funciones múltiples en el parásito. Es por ello que la etapa siguiente es poder obtener un anticuerpo monoclonal para la serina proteasa del tipo tripsina que hemos obtenido y realizar inmunolocalización y ensayos de inhibición de invasión en cultivo celular con él. Este también podría utilizarse para determinar si un gen putativo para serina proteasa del tipo tripsina que hemos identificado recientemente (Arenas y col, datos no publicados) es quien codifica para esta

proteína. Ensayos adicionales deberán determinar el sustrato o los sustratos de esta serina proteasa tales como integrinas de la membrana de células hospedadas y la secuencia de eventos durante la invasión en las cuales esta implicada.

En conclusión, este trabajo permitió determinar la existencia mayoritaria de una serina proteasa con actividad del tipo tripsina de 46 KDa en *Toxoplasma gondii* y que el único método para su purificación fue el paso por columna de arginina sefarosa y que otras columnas como la de benzamidina o bacitracina no fueron eficaces. Su purificación permitirá en ensayos futuros determinar exactamente su función y potencial como blanco terapéutico.

REFERENCIAS

- Aguilar F.** 2001. Caracterización de la Actividad Proteásica en Antígeno total soluble de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* cepa (RH). Tesis para salud en el trópico. Instituto de Salud del Trópico, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá DC
- Berthonneau J, Rodier MH, El Moundi B, Jacquemin JL.** 2000. *Toxoplasma gondii*: Purification and Characterization of an Immunogenic Metallopeptidase. *Exp Parasitol.* 95: 158-162
- Bonhomme A, Maine GT, Beorchia A, Bulet H, Aubert D, et al.** 1998. Quantitative Immunolocalization of P29 Protein (GRA7), a New Antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Histochem Cytochem.* 46:1411-21
- Boothroyd JC, Hehl A, Manger ID.** 1998 The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol.* 28: 3-9
- Buitrago R, Olarte J, Gómez JE.** 2002. Evaluation of two inhibitors of invasion : LY311727 –3-(3-acetamide-1-benzyl-2-ethyl-indolyl-5-oxy propane phosphonic acid- and AEBSF-4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride- in acute murine toxoplasmosis. *J Antimicrobial Chemotherapy.* 49 : 871-74
- Carruthers V, Sibley GD, Sibley L.** 2000. The *Toxoplasma* Adhesive Proteolytically Processed at Multiple Sites by Two Parasite-derived Proteases. *J Biol Chem.* 275(19): 14346-14353
- Cesbron-Delauw MF, Guy B, Torpier G.** 1989. Molecular Characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:7537-7541
- Cesbron-Delauw MF.** 1994. Dense-granule Organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the Host-Parasite Relationship. *Parasitol Today.* 10:8
- Conseil V, Soete M, Dubremetz JF.** 1999. Serine Protease Inhibitors Block Invasion of Host Cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 43: 1358-1361
- Coombs GH, Mottran JC.** 1997. Parasite proteinases and aminoacid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology* 114, S61-80
- Charif H, Darcy F, Torpier G, Cebron-Delauw MF, Capron A.** 1990. *Toxoplasma gondii*. Characterization and localization of antigens secreted from tachizoites. *Exp Parasitol* 71:114-124
- Choi WY, Nam HW, Youn JH.** 1989. Characterization of proteases of *Toxoplasma gondii*. *Kisaengchunghak Chapchi* 27(3):161-70
- Dubey JP.** 1995. Long-Term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Parasitol.* 81(6): 887-893

- Dubey JP.** 1996. Infectivity and Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J Parasitol. 82(6): 957-961
- Dubey JP.** 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 °C. J Parasitol. 83: 946-49
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer C.** 1998. Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en animales. Memorias segundo congreso internacional de Toxoplasmosis. Junio 4-6; Santafé de Bogotá. Universidad de los Andes.
- Fischer HG, Stachekhaus S, Sahn M, Meyer HE, Reichmann G.** 1998. GRA7, an excretory 29kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. Mol Biochem Parasitol. 91:251-262
- Freyre A.** 1998. Los ciclos de *Toxoplasma* inducidos por infecciones con carne y con ooquistes. Memorias segundo congreso internacional de Toxoplasmosis. Junio 4-6; Santafé de Bogotá. Universidad de los Andes.
- Gómez JE.** 1997. Immunomodulation par l'IFN γ de l'infection par *Toxoplasma gondii* d'une lignee monocyttaire humaine (THP1): Implication des phospholipases A2 parasitaires et cellulaires. These de doctorat de l'universite de Reims. Champagne-Ardenne.
- Griswold KE y Mackie RI.** Isolation and Partial Purification of the Proteolytic Activity of *Prevotella ruminicola* 118B. Department of Animal Sciences, University of Illinois. www.msu.edu/user/rumen/1995RFC.pdf
- Ihara M, Urata H, Kinoshita A, Suzumiya J, Sasaguri M, Kikuchi M, Ideishi M, Arakawa K.** 1999. Increased Chymase-Dependent Angiotensin II Formation in Human Atherosclerotic Aorta. Hypertension. 33:1399-1405
- Jacobs D, Dubremetz JF, Loyes A, Bosman F, Saman E.** 1997. Identification and heterologous expression of new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. 127: 1593-1548
- Kasper LH, Mineo JR.** 1994. Attachment and Invasion of Host Cells by *Toxoplasma gondii*. Parasitol Today. 10: 184-188
- Lecordier L, Mercier C, David S, Cesbron-Delaw MF.** 1999. Transmembrane Insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 Protein Occurs After Soluble Secretion into the Host Cell. Mol Biol Cell. 10: 1277-87

- Lee S, Kato J, Takiguchi N, Kuroda A, Ikeda T, Mitsutani A, Ohtake H.** 2000. Involvement of an Extracellular Protease in Algicidal Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* strain A28. *Appl Environ Microbiol.* 66:4334-39
- Marcolino PT, Silva DA, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR.** 2000. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: Determination of immunoglobulin G avidity by Western-blotting. *Clin Diag Lab Immun.* 7: 384-389
- Mckerrow JH, Rosenthal ES, Rosenthal PJ, Bouvie J.** 1993. The Proteases and Pathogenicity of Parasitic Protozoa. *Annu Rev Microbiol.*47:821-53
- Miller S, Binder EM, Blackman MJ, Carruthers VB, Kim K.** 2001. A Conserved Skubtilisin-like Protein TgSUB1 in Microneme Organelles of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 276: 45341-8
- Mitro K, Bhagavathiammai A, Zhou O, Bobbett G, Mckerrow JH, Chokshi R, Chokshi B, James ER.** 1994. Partial Characterization of the Proteolytic Secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Exp Parasitol.* 78: 377-85
- Norrby R.** 1971. Immunological study on the Host Cell Penetration Factor of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 3: 278-286
- Pingret A. et al.** 1996. Relationship between intracellular free calcium concentration and the intracellular development of *Toxoplasma gondii*. *J Histochem Cytochem* 44: 1123-29
- Potempa J, Mikolajczyk J, Brassell D, Nelson D, Thogersen I, Enghild J, Travis J.** 1998. Comparative Properties of Two Cysteine Proteinases (Gingipains R), the products of Two Related but Individual Genes of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem.* 273: 21648-657
- Rao MB, Deshpande VV.** 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:597-635
- Rosenthal PJ.** 1999. Proteases of Protozoan Parasites. *Adv Parasitol.* 43:105-157
- Schwartzman JD and Saffer LD.** 1992. How *Toxoplasma gondii* Gets In and Out of Host Cells. *Subcell Biochem: Intracellular Parasites.*18
- Secades P y Guijarro JA.** 1999. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3969-75
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85

Smith JE. 1995. A ubiquitous intracellular parasite: The cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 25(11): 1301-1309

Smith JE. 1996. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 25:1309

Tomayo S. 1996. The Major Surface Proteins of *Toxoplasma gondii*: Structures and Functions in *Toxoplasma gondii*. Curr Trop Micro Immunol. 219: 82-89

Wong SY, Remington JS. 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. AIDS. 7:299-316

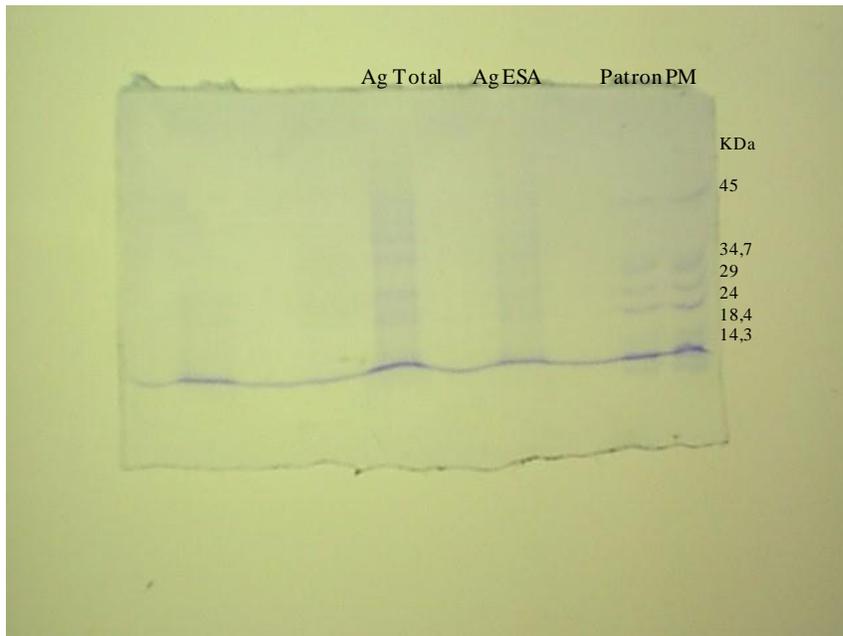


Figura 1. Gel de electroforesis en poliacrilamida en SDS al 30% de antígeno total soluble (Ag Total) y de antígeno secretorio excretorio (Ag ESA) de *Toxoplasma gondii*. Los dos últimos carriles son los patrones de peso molecular (Patron PM). Tinción con azul de coomasie al 0,25%

Ag ESA

Ag Total

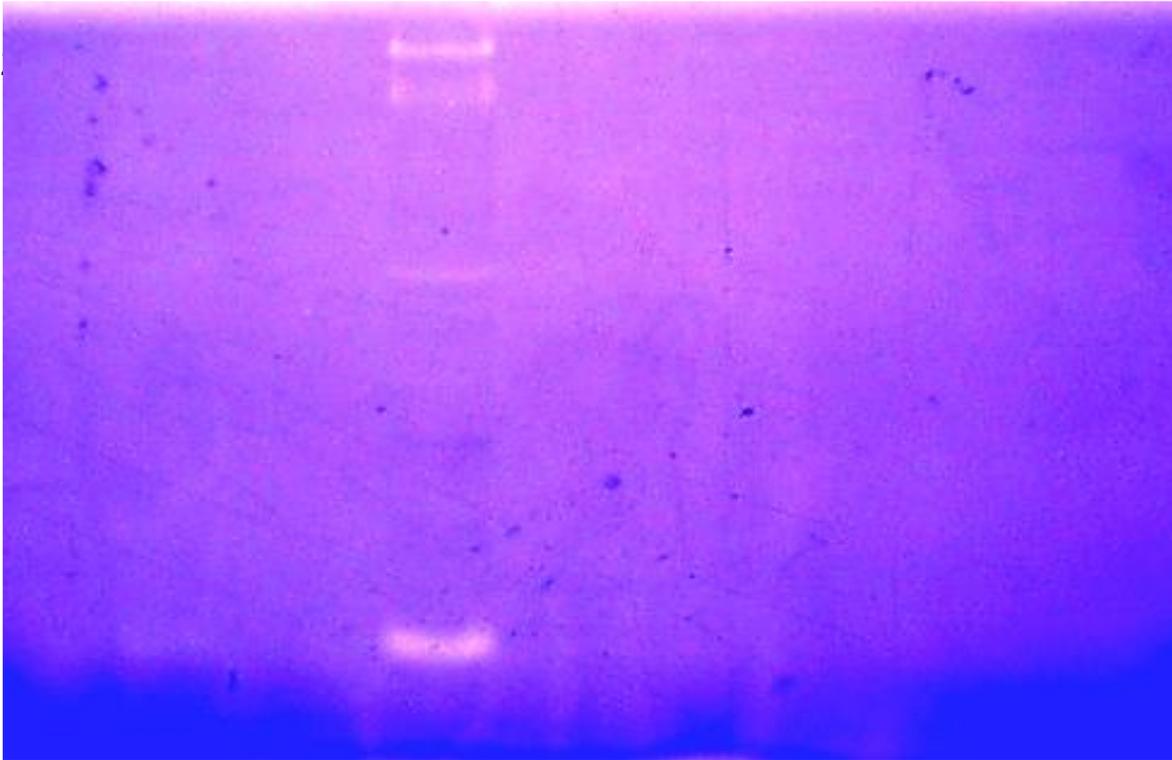


Figura 2. Zimograma de caseína con antígeno ESA (Ag ESA) y antígeno total soluble (Ag Total). El ensayo se realiza en gel de poliacrilamida con caseína 1%, incubadas toda la noche y coloreada con azul Coomassie al 0,1%. Las bandas blancas indican actividad serina proteasa caseinolítica o sea similar a la actividad de tripsina.

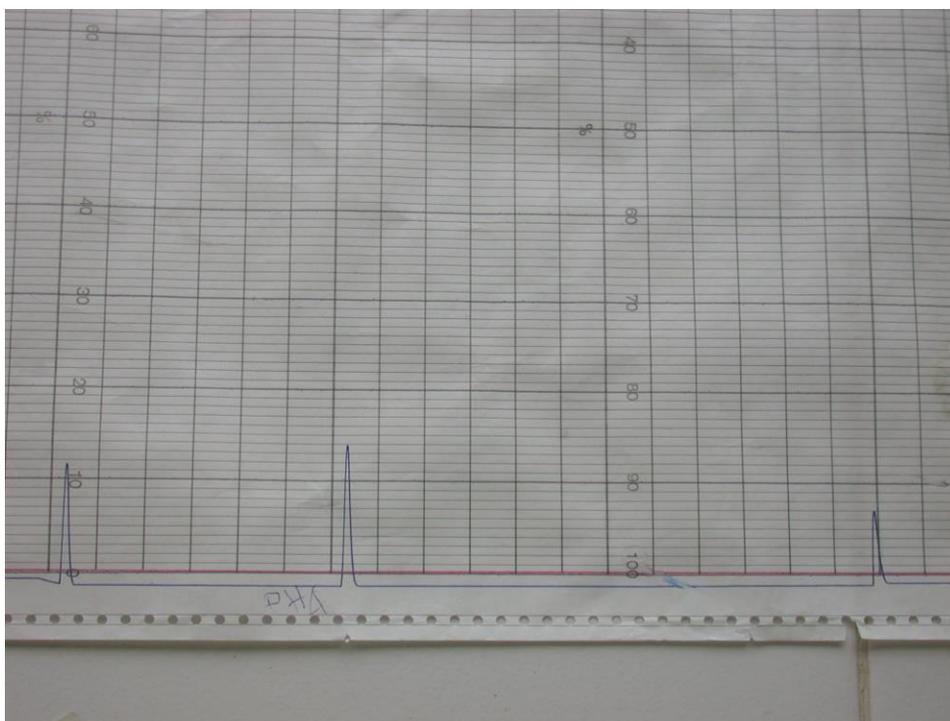


Figura 3. Picos de absorbancia a 280 nm de las fracciones 26, 27 y 28 luego de pasaje por la columna de arginina sefarosa y eluidas con tampón acetato de sodio a pH 4,0.

A.

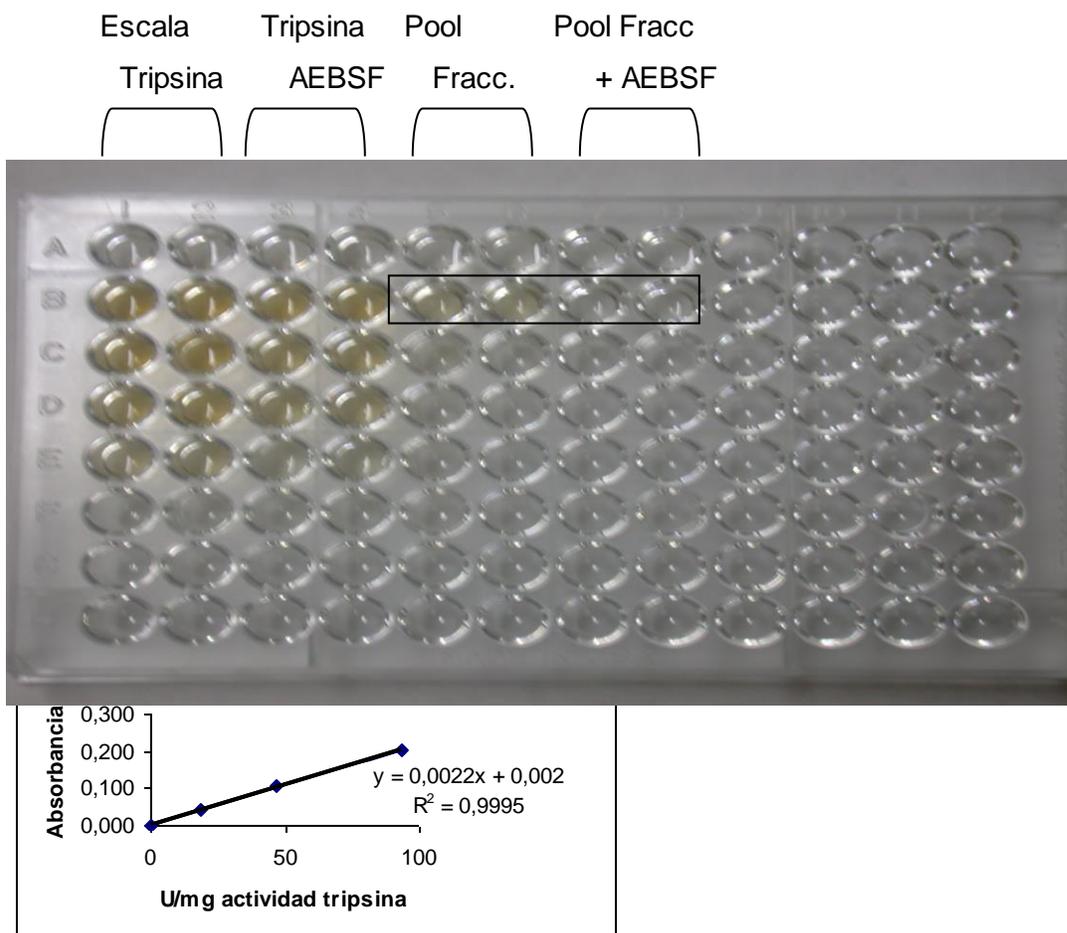


Figura 4. A. Microplaca de la reacción de azocaseína, la fila A corresponde al control negativo. Las dos primeras columnas son el patrón de tripsina, las siguientes de tripsina en presencia de AEBSF y luego los pozos con el pool de fracciones obtenidas luego de paso por la columna de arginina sefarosa y las dos siguientes en presencia de AEBSF (encerradas en el rectángulo). **B.** Relación unidades de actividad tripsina y absorbancia en el ensayo de azocaseína. El coeficiente de correlación es de 0,99.

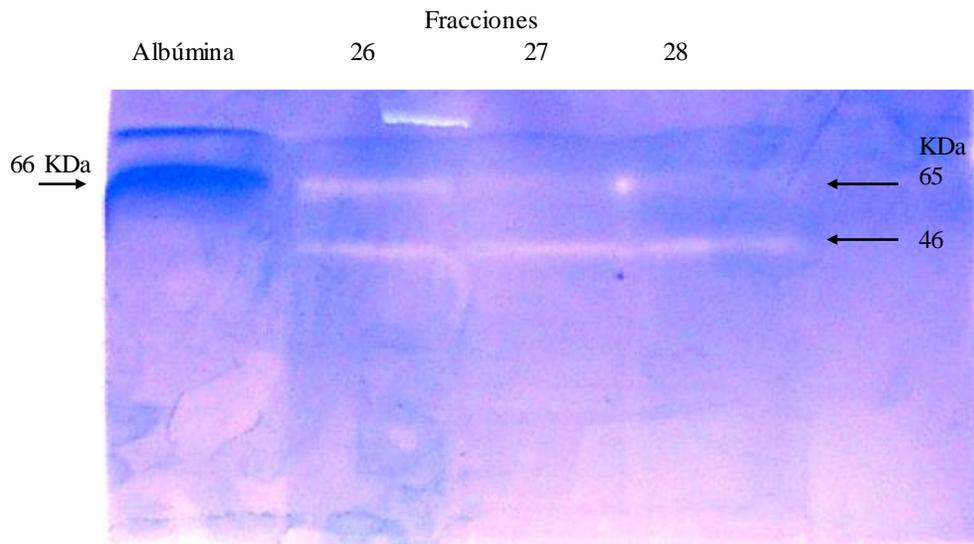


Figura 5. Zimograma de caseína para las fracciones 26, 27 y 28 obtenidas luego de pasaje por columna de arginina sefarosa y elusion. La primera columna (sin actividad caseinolítica) corresponde a albúmina bovina de 66 KDa. El calculo del peso utilizando la formula según movilidad relativa en el gel, da un peso aproximado de 65 KDa a la primera banda de actividad caseinolítica de las fracciones y de 46 KDa a la segunda banda.

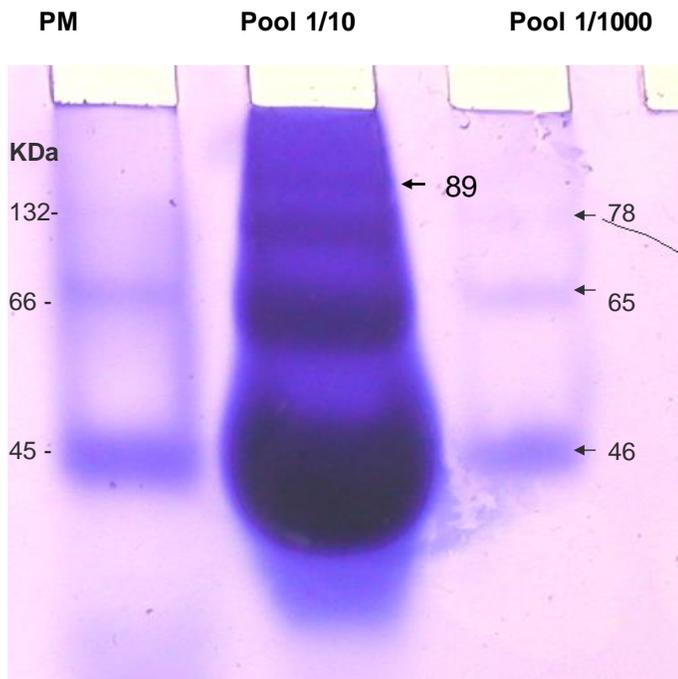


Figura 6. Electroforesis nativa (condiciones no denaturantes). El pool de fracciones fue diluido 1/10 o 1/1000 y comparado con el patrón de peso molecular (PM): albúmina de huevo de pollo 45 KDa, albúmina de suero bovino 66, dimero de albúmina de suero bovino 132 KDa.

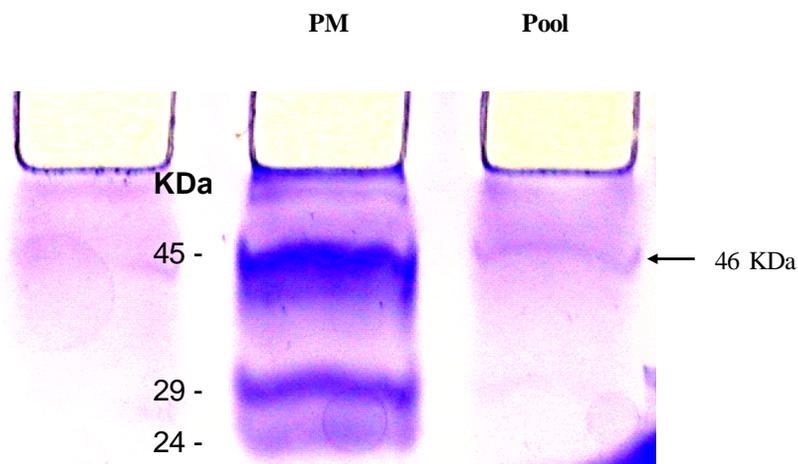


Figura 7. Electroforesis denaturante del pool de fracciones purificadas luego de paso por columna de arginina sefarosa comparadas frente a un patrón de peso molecular (PM). El peso molecular de la banda fue obtenida luego de digitalización de la imagen y aplicación del software UN Scan it (Silk Corporation, USA).