

00550
18



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION DE LA PROTEINA ROP2 DE
Toxoplasma gondii

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)
PRESENTA

Q.F.B. HORTENSIA NACHELLI MALPICA LOPEZ



MEXICO, D. F.

2003

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

Jurado Asignado

PRESIDENTE: Dr. Jorge Vázquez Ramos

SECRETARIO: Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort

VOCAL: Dr. Eleazar Martínez Barajas

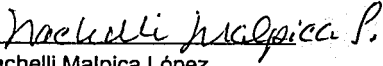
PRIMER SUPLENTE: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

SEGUNDO SUPLENTE: Dr. Mario Calcagno Montans

SITIO DONDE SE REALIZO EL TEMA:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: 
Dr. Pascal Herion Scohy

SUSTENTANTE: 
Q.F.B. Hortensia Nachelli Malpica López

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pascal Herion Scohy mi más sincero agradecimiento por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo y por su acertada dirección en el desarrollo de esta investigación.

A los Drs. Pascal Herion Scohy, Jorge Vázquez Ramos y Rafael Saavedra Durán por sus valiosos comentarios en los exámenes tutoriales.

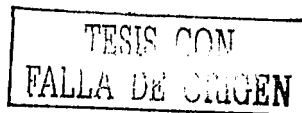
A los Drs. Pascal Herion Scohy, Jorge Ramos Vázquez Ramos, Ruy Enrique Pérez Montfort, Eleazar Martínez Barajas, Mario Calcagno Montans y Bertha Espinoza Gutiérrez por la revisión crítica y acertados comentarios de este trabajo.

A la Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez por el apoyo técnico brindado para el análisis de imágenes.

A los Maestros Rafael Campos Tenorio y Yoalli Malpica López así como a los Ingenieros Ulrich Schmiedel Krieg, Martín Schmiedel Dopke, Francisco Javier López Rodríguez y Ulrich Schmiedel Hilliges por el apoyo técnico brindado en la elaboración escrita de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y amistad

Al CONACYT por haberme otorgado una beca de tesis.



Con mi más profundo cariño y agradecimiento por todo lo que he recibido de ellos,

A mis magníficos padres y maravillosas hermanas

A mi queridísimo esposo

A mis familiares y amigos

A todos mis maestros

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

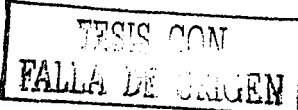
INDICE DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCION	
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	
1.1. Patología	1
1.2. Ciclo de vida.....	4
1.2.1. Ciclo sexual	6
1.2.2. Ciclo asexual	7
1.3. Mecanismo de invasión	8
1.4. Proteínas de las roptrias.....	10
1.5. Estudios inmunológicos.....	17
2. Purificación de proteínas	20
2.1. Cromatografía de afinidad	20
2.2. Inmunopurificación	21
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS.....	24
RESULTADOS.....	27
1. Purificación del anticuerpo monoclonal T5-2D1 a partir de líquido ascítico.....	27
2. Acoplamiento del anticuerpo monoclonal T5-2D1 al gel de afinidad (Affigel 10 o Sefarosa 4B-CNBr).....	30
3. Preparación del lisado de <i>Toxoplasma</i>	30
4. Unión de ROP2 al Ac T5-2D1 acoplado a Affigel 10, en presencia de SDS, CHAPS y Tritón	31
5. Determinación de la capacidad de las matrices de Affigel 10 y	

Sefarosa 4B-CNBr empleando el lisado de <i>Toxoplasma</i> -SDS 0.1% .	34
6. Determinación de las condiciones de elución	39
7. Purificación de la proteína ROP2 por cromatografía de afinidad en una columna de Ac T5-2D1 acoplado a Sefarosa 4B-CNBr	41
8. Determinación del rendimiento de la purificación de ROP2.....	44
9. Determinación de la pureza antigénica de la ROP2 purificada.....	46
10. Determinación de la pureza de la ROP2 purificada por tinción con azul de Coomassie.....	48
 DISCUSION	 51
 PERSPECTIVAS	 57
 APENDICE I (Cromatografía de afinidad)	 59
1. Selección del Ligando	59
2. Selección de la matriz	60
3. Brazo Espaciador.....	61
4. Inmovilización del ligando	62
5. Determinación de las condiciones de adsorción.....	63
6. Determinación de las condiciones de lavado	63
7. Determinación de las condiciones de elución.....	64
 APENDICE II (Procedimientos).....	 65
1. Purificación de anticuerpos monoclonales de ratón a partir de líquido ascítico	
1.1. Soluciones y resina.....	65
1.2. Precipitación del anticuerpo.....	65
1.3. Purificación del Ac por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa DE52	66
2. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida no desnaturalizante	67
2.1. Soluciones	67

v

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2. Procedimiento.....	67
3. Acoplamiento del anticuerpo monoclonal al gel de afinidad	68
3.1. Acoplamiento del Ac monoclonal a Affigel 10	68
3.2. Acoplamiento del Ac monoclonal a Sefarosa – 4B activada con CNBr	68
4. Obtención del lisado de <i>Toxoplasma</i>	69
4.1. Cultivo de parásitos	69
4.2. Preparación del lisado de <i>Toxoplasma</i>	69
5. Método de adsorción-elución en lote.....	70
6. Purificación de la proteína ROP2 de <i>Toxoplasma gondii</i> por cromatografía de afinidad en una columna de Sefarosa-4B CNBr	71
7. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	72
8. Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con azul de Coomassie... ..	73
9. Transferencia electroforética	73
10. Tinción de proteínas con Rojo Ponceau.....	74
11. Inmunodetección de anticuerpos transferidos a nitrocelulosa	75
 BIBLIOGRAFIA.....	 76



 TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

INDICE DE ABREVIATURAS

A	alanina
A	adenina
A 280 nm	absorbancia a una longitud de onda de 280 nanómetros
Abs	absorbancia
Ac	anticuerpo
Ac T5-2D1	anticuerpo monoclonal específico para ROP2
Affigel 10	matriz de agarosa entrecruzada
Ag	antígeno
Ag-Ac	complejo antígeno-anticuerpo
BALB/c	cepa de ratones
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-fosfato
BSA	albúmina sérica bovina
C	cisterna
C	citosina
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
CHAPS	detergente zwitteriónico. 3-[3-(colamidopropil) dimetilamonio]-1-propansulfonato
COREX	marca de tubos de vidrio para centrifugación
D	ácido aspártico
DEAE-Celulosa	
DE52	matriz de intercambio aniónico (dietilaminoetil celulosa)
DO	densidad óptica
E	ácido glutámico
E	fracción eluida
EDTA	etilendiamintetraacetato de sodio (agente quelante)
F	fenilalanina
G	glicina
G	guanina
g	fuerza gravitacional relativa empleada para medir la fuerza de centrifugación
H	histidina
HCl	ácido clorhídrico
HClO ₄	ácido perclórico
I	isoleucina
Ig	inmunoglobulina
IFN	interferón
K	lisina
kDa	kilodaltones (unidades de masa molecular)

K _L	constante de disociación
K76	cepa no virulenta de <i>T. gondii</i>
L	leucina
L	ligando
M	metionina
M	concentración expresada como molaridad
MHC II DPw4	complejo mayor de histocompatibilidad clase dos presente en linfocitos B, macrófagos y células dendríticas.
MgCl ₂	cloruro de magnesio
mM	mili molar
MSA1	antígeno de superficie del merozoito de <i>Plasmodium falciparum</i>
N	asparagina
NaCl	cloruro de sodio
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
NBT	azul de nitro tetrazolio
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amonio
NIH	programa de computadora para el procesamiento y análisis de imágenes
nm	nanómetros
No.	número
NU	fracción no unida
P	prolina
[P]	concentración de proteína
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PEF	factor que facilita la penetración
pH	logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
pHi	punto isoelectrico
[PL]	concentración del complejo proteína-ligando
PM	marcadores de peso molecular
PMSF	inhibidor de proteasas de serina y cisteína (fenil metil sulfonil fluoruro)
Pp.	precipitado
p/v	peso/volumen
P1	pico 1
P2	pico 2
P3	pico 3
P126	antígeno de la vacuola parasitofora de <i>Plasmodium falciparum</i>
Q	glutamina

R	arginina
R	grupo que dentro de la fórmula general de los aminoácidos representa la cadena lateral cuya estructura es diferente para cada uno de ellos.
RH	cepa virulenta de <i>T. gondii</i>
ROP1-ROP6	proteínas de roptrias
rpm	revoluciones por minuto
S	serina
SAG1	proteína de superficie de <i>T. gondii</i>
SDS	detergente aniónico (Sodio dodecil sulfato)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Sefarosa 4B-CNBr	matriz de agarosa entrecruzada preactivada
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SP2/0	células tumorales de mieloma
T	treonina
T	timina
T	lisado de <i>Toxoplasma gondii</i>
Tg 34	clona de ADNc de <i>Toxoplasma gondii</i> que codifica 330 residuos de la proteína ROP2
TNT	solución amortiguadora de lavado que contiene detergente Tween
Tritón X-100	detergente no iónico (t-octilfenoxipolietoxietanol)
ts-4	cepa mutante(termosensible) de <i>T. gondii</i>
T3 4A7	anticuerpo monoclonal que reconoce las proteínas ROP2, ROP3 y ROP4 de <i>T. gondii</i>
V	valina
VERO	células de riñón de mono verde africano
W	triptofano
Y	tirosina
YEQL	secuencia de aminoácidos presente en ROP2 de <i>T. gondii</i>
(+)	cargado positivamente
(-)	cargado negativamente
[L]	concentración del ligando
η	rendimiento de purificación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que puede infectar las células nucleadas de la mayoría de los mamíferos y aves, causando en ocasiones una patología severa. La primoinfección durante el embarazo puede resultar en aborto o en defectos para el feto, mientras que en pacientes con SIDA, representa uno de los patógenos oportunistas más importantes.

La vacunación contra *T. gondii* se ha considerado como una de las principales opciones para controlar la enfermedad. Para lograr esto, sin embargo, se necesitan primero conocer los mecanismos por los cuales el sistema inmunológico reconoce y controla al parásito en un individuo infectado.

Se sabe que la respuesta inmunológica contra el parásito es tanto de tipo humoral como celular. Se conoce también que los linfocitos, el interferón-gama y otras linfocinas, están involucrados en la protección contra la enfermedad. Sin embargo, hasta la fecha todavía no existe una vacuna eficiente contra el parásito.

Son varios los antígenos de *T. gondii* que se han estudiado con la finalidad de elaborar una vacuna. Entre algunos de ellos se encuentra la proteína de 54 kDa (ROP2) que se encuentra en los organelos del parásito llamados roptrias. Se ha observado que esta proteína tiene una función importante en el mecanismo de invasión del parásito a la célula del hospedero, además de que, de acuerdo a estudios, tiene potencial inmunogénico al inducir la producción de anticuerpos protectores clase IgG en el hospedero y estimular una clona de linfocitos T obtenida de un individuo inmune que es productora de interferón gama. Sin embargo, aún faltan por realizarse estudios que permitan evaluar esta proteína como un candidato a vacuna contra la toxoplasmosis.

Considerando lo anterior, el presente trabajo describe una metodología que permite aislar la proteína nativa ROP2 de *Toxoplasma gondii* a partir de una suspensión de taquizoitos, empleando la técnica de cromatografía de afinidad y un anticuerpo monoclonal específico para ROP2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La primera parte del trabajo hace referencia a la patología, ciclo de vida y mecanismo de invasión del parásito, así como a algunos estudios de tipo inmunológico relacionados con sus proteínas. La segunda parte del texto describe la metodología que se empleó para purificar la proteína de interés y muestra los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. En esta segunda parte, la pureza de la proteína obtenida queda demostrada y se determina el rendimiento del proceso de purificación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

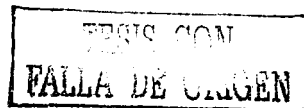
1. TOXOPLASMA GONDII

1.1. PATOLOGIA

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que infecta las células nucleadas de aves y mamíferos. El nombre *Toxoplasma* (toxos = arco, plasma= forma) deriva de la forma en que el parásito tiene bajo el microscopio (Figura 1). Fue observado por primera vez por Nicolle y Manceaux en 1908 en el roedor *Ctenodactylus gondi*. *T. gondii* ha sido siempre reconocido como un protozoario y su clasificación actual es la siguiente:

Filo: Apicomplexa
Clase: Sporozoea
Subclase: Coccidia
Orden: Eucoccidiorida
Suborden: Eimeriorina
Familia: Sarcocystidae

En 1923, Jankú fue el primero en describir la presencia de organismos similares a *T. gondii* en la retina de un niño hidrocefálico. Sin embargo, el papel de *Toxoplasma gondii* como patógeno en el humano no fue reconocido sino hasta 1937, cuando Wolf y Cowen (1937) reportaron un caso confirmado de toxoplasmosis congénita. Cinco años más tarde, Sabin caracterizaría los aspectos clínico-parasitológicos de la toxoplasmosis congénita en el hombre y en 1948, el desarrollo de la prueba de Sabin y Feldman contribuiría de manera importante al conocimiento de la infección. Fue en 1965 cuando se corroboró que la infección podía ser adquirida mediante la ingestión de carne cruda o mal cocida y en ese mismo año Hutchison describió por primera vez



PAGINACIÓN DISCONTINUA

una de las formas resistentes del parásito en heces de felinos. Finalmente, en 1970 se conoció el ciclo de vida completo de *T. gondii* cuando se observó que el ciclo sexual del parásito se llevaba a cabo en el intestino delgado del gato. Actualmente se sabe que la infección por *T. gondii* depende de la interacción entre factores propios del parásito y del hospedero, y que, por lo tanto, la toxoplasmosis humana muestra una patología diversa.

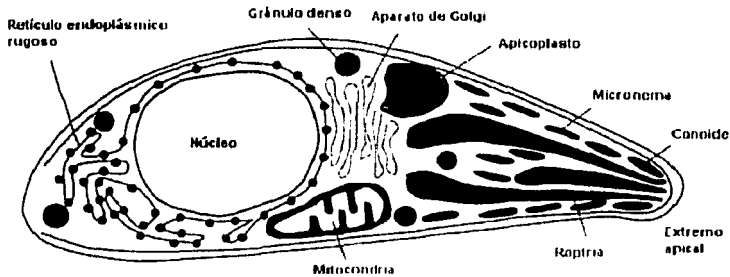


Figura 1. Esquema del taquizoito de *T. gondii*. El taquizoito se observa al microscopio generalmente en forma de media luna y mide aproximadamente 2 X 6 μm . Su extremo anterior es conoidal y su extremo posterior es redondeado. Consta de una cubierta externa llamada películo, así como de un complejo apical conformado por un anillo polar, un conoide, roptrias, micronemas y microtúbulos subpeliculares. También posee retículo endoplásmico, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas, gránulos densos, una mitocondria, un apicoplasto de 4 membranas y un núcleo bien definido (Ajioka et al., 2001).

La infección con *T. gondii* puede ser adquirida en forma congénita o después del nacimiento. En individuos saludables, la infección es por lo general clínicamente asintomática e indefinidamente latente, siempre y cuando, el individuo sea inmunocompetente. En algunos de estos individuos es posible observar linfadenitis que, por lo general, desaparece en cuestión de semanas. Durante la fase crónica, se puede detectar la presencia de

TESIS CON
FALLA DE URGEN

anticuerpos en los enfermos, quienes pueden albergar de por vida quistes en diferentes tejidos (Darcy et al., 1988). La infección congénita ocurre solamente cuando una mujer sufre una primoinfección durante el embarazo y la gravedad de la enfermedad dependerá de la etapa de éste. La transmisión transplacentaria puede dar lugar a malformaciones neonatales e incluso provocar el aborto (Remington, 1982). Cuando la enfermedad no es muy grave, el niño puede presentar ligera pérdida de la visión. Sin embargo, los niños con toxoplasmosis grave presentan retinocoroiditis, hidrocefalia, convulsiones y calcificación intracerebral.

T. gondii es reconocido como uno de los patógenos oportunistas más importantes en pacientes con SIDA. En personas inmunosuprimidas, la ruptura de los quistes que se encuentran en los tejidos de individuos que han tenido una infección primaria, con la consecuente liberación de formas proliferativas, puede causar neumonía, encefalitis e infección generalizada, que ocasionan a veces la muerte.

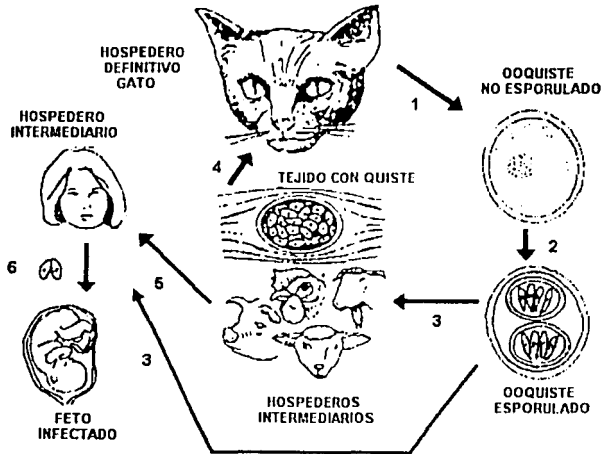
Se estima que dependiendo de la región geográfica, entre 0.5 y 6.5 de cada 1000 niños recién nacidos padecen de toxoplasmosis congénita (Koskiniemi et al., 1989) y entre 5 y 30 % de los pacientes con SIDA desarrollan encefalitis toxoplásmica (McCabe y Remington, 1988). En ambos casos los tratamientos existentes no son satisfactorios. En los Estados Unidos y en el Reino Unido se estima que entre el 16 y el 40 % de sus habitantes están infectados mientras que en América Central, Sudamérica y Europa se estima un nivel de infección del 30% al 50% (Remington et al., 1970). Una encuesta seroepidemiológica realizada en la República Mexicana indicó una seroprevalencia promedio del 32% y mostró niveles particularmente altos (60-70%) en la región costera (Colima, Nayarit, Campeche, Tabasco, Veracruz). Además, se registró un alto índice de infección en la etapa reproductiva de la mujer (Velasco-Castrejón y col., 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. 2. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* incluye los ciclos sexual y asexual para su proliferación y transmisión. El ciclo sexual se lleva a cabo exclusivamente en las células del intestino delgado de muchos de los miembros de la familia *Felidae*, comúnmente conocidos como felinos, mientras que el ciclo asexual se lleva a cabo en las células nucleadas de aves y mamíferos.

Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Dubey, 1993)



1. Ooquiste no esporulado presente en heces del gato
2. Transformación a ooquiste esporulado con 8 esporozoitos
3. Ingestión de ooquistes esporulados presentes en comida, agua o tierra por hospederos intermedios
4. Ingestión de quistes con bradizoitos por el hospedero definitivo
5. Ingestión de quistes con bradizoitos presentes en carne infectada
6. Taquizoitos transmitidos a través de la placenta

Después de la ingestión de los quistes tisulares con bradizoitos por el gato u hospedero definitivo, el parásito invade los enterocitos donde se divide varias veces para diferenciarse y dar lugar a los microgametos y macrogametos (Freyre et al., 1989). Los gametos se funden entonces para formar un cigoto u ooquiste que es liberado en las heces fecales del gato. El ooquiste, en condiciones adecuadas de humedad y temperatura, sufre un proceso de meiosis produciendo un total de 8 esporozoitos con capacidad infecciosa, que son resistentes y pueden persistir por meses en el ambiente adecuado.

De manera similar, después de la ingestión de los esporozoitos o bradizoitos por el hospedero intermediario, éstos se diferencian en taquizoitos en el intestino delgado, que es la forma del parásito que tiene la capacidad de multiplicarse rápidamente y que es responsable de la infección aguda (Carruthers, 2002). Durante esta etapa puede ocurrir la transmisión congénita hacia el feto en desarrollo. Los taquizoitos, a pesar de ser también infecciosos, no son tan resistentes a las secreciones gástricas. Por ello, a diferencia de los bradizoitos y ooquistes, tienen una menor capacidad infectiva cuando son ingeridos (Weiss y Kim, 2000).

En muchos de los hospederos intermediarios, después de la infección aguda, puede desarrollarse la etapa crónica de la enfermedad cuando el taquizoito se transforma en bradizoito, el cual se caracteriza por multiplicarse más lentamente formando quistes tisulares, los cuales permanecen de por vida en el organismo. Generalmente estos quistes son controlados por el sistema inmunológico del hospedero y solamente se reactivan en individuos inmunosuprimidos (Wong y Remington, 1993).

La ingestión de quistes tisulares presentes en carne cruda o mal cocida, puede dar lugar a la infección y a la propagación indefinida del parásito por reproducción asexual en el hospedero intermediario, mientras que en el hospedero definitivo marca el inicio de su ciclo sexual.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.1. CICLO SEXUAL

El ciclo sexual comienza con la ingestión por un felino de quistes con bradizoitos. Estos se encuentran generalmente en tejidos de hospederos intermediarios infectados. También se ha observado que el ciclo sexual puede iniciarse con la ingestión de taquizoitos u ooquistes pero en menor frecuencia.

Una vez que el felino ha ingerido el quiste, enzimas proteolíticas digieren la pared quística a nivel de estómago e intestino delgado. Cuando esto ocurre, los bradizoitos liberados penetran a las células epiteliales del intestino delgado iniciándose el desarrollo de 5 diferentes tipos de *T. gondii* antes de que comience la gametogonia (Dubey, 1993). Estos van del tipo A al E y se les denomina tipos en vez de generaciones debido a que existen diversas generaciones dentro de un mismo tipo de *T. gondii*. A pesar de que aún no ha sido determinado, se piensa que probablemente los merozoitos liberados por los merontes tipos D y E inician la formación de los gametos.

El gameto femenino es subsférico mientras que los gametos masculinos tienen forma elipsoidal u ovoide. Cuando la microgametogénesis se lleva a cabo, el núcleo del gameto masculino se divide para producir de 10 a 21 núcleos (Dubey y Frenkel, 1972). Los microgametos consisten principalmente de material nuclear y cada uno es un organismo biflagelado. La fecundación se realiza cuando los microgametos nadan hacia un macrogameto maduro y lo penetran, produciéndose el cigoto que queda envuelto en una rígida membrana quística dando lugar al ooquiste.

El ooquiste es pequeño y redondo (10-12 μm de diámetro) y se encuentra rodeado por una pared doble que le brinda resistencia. Una vez maduros, los ooquistes son liberados en el lumen intestinal por la ruptura de las células enteras epiteliales y son arrojados en las heces como ooquistes no

esporulados. Cada ooquiste contiene una masa de citoplasma y nucleoplasma denominada esporonte. Después de 2 ó 3 días, con la temperatura y aeración adecuadas, el ooquiste no infeccioso esporula y el esporonte se divide en dos masas redondas llamadas esporoblastos que al elongarse y diferenciarse forman dos esporoquistes. Dentro de cada esporoquiste se desarrollan 4 esporozoitos (Dubey et al., 1998). Es en este momento cuando el ooquiste se torna altamente infeccioso ya que puede permanecer viable en la tierra por varios meses y ser ingerido por un hospedero intermediario. Una vez que el ooquiste es digerido por el hospedero intermediario, los esporozoitos son liberados e infectan el epitelio intestinal del hospedero para dar lugar al ciclo asexual del parásito.

1.2.2. CICLO ASEXUAL

Cuando un hospedero ingiere ooquistes o quistes tisulares, respectivamente los esporozoitos o los bradizoitos invaden las células del hospedero y se diferencian en taquizoitos. Estos a su vez comienzan a dividirse dentro de la célula por endodiogenia, un proceso de reproducción asexual similar a la fisión binaria, donde dos nuevos parásitos se forman en el interior del parásito original (Hu et al., 2002). Al irse incrementando el número de parásitos dentro de la célula, ésta estalla y se liberan nuevos taquizoitos que tienen la capacidad de infectar a células adyacentes. Muchos de estos taquizoitos son eliminados por la respuesta inmunológica. Sin embargo, aproximadamente 7 días después de una infección sistémica por taquizoitos, se desarrollan quistes con bradizoitos en diversos tejidos, principalmente en el sistema nervioso central y en los músculos (Gagne, 2001) donde pueden permanecer de por vida, aunque también pueden desarrollarse en órganos viscerales como pulmones, hígado y riñones.

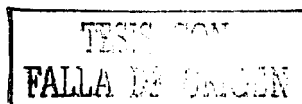
Los bradizoitos miden 7 X 1.5 μm (Mehlhorn and Frenkel, 1980) y tienen forma de media luna. Estos se multiplican lentamente dentro de un

quiste tisular, el cual es un conjunto de bradizoitos rodeados por una pared bien definida que se desarrolla dentro de la célula infectada. La pared del quiste tisular es elástica y delgada (< 0.5 mm) y envuelve a cientos de bradizoitos que son muy similares a los taquizoitos, con la excepción de que los primeros son más delgados, contienen gránulos de carbohidratos y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas (McLeod et al., 1991). La membrana de estos quistes sufre una rápida degradación a un pH ácido en presencia de secreciones gástricas y, en caso de ser ingeridos por otro hospedero intermediario, los bradizoitos se transformarán nuevamente en taquizoitos a nivel del epitelio del intestino delgado.

Se ha observado que los quistes tisulares crecen y permanecen dentro de la célula conforme los bradizoitos que se encuentran en su interior se van dividiendo por endodiogenia (Ferguson & Hutchison, 1987). Los quistes varían de tamaño de acuerdo al número de bradizoitos que contienen. Los quistes jóvenes pueden medir $5 \mu\text{m}$ y contener de 2 a 4 bradizoitos, mientras que los más maduros pueden medir $50\text{-}70 \mu\text{m}$ y contener de 1000 a 2000 microorganismos.

1.3. MECANISMO DE INVASION

Aunque la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con taquizoitos, actualmente se ha determinado que los tres estadios de *T. gondii* tienen la capacidad de invadir activamente las células del hospedero (Tilley et al., 1997; Sasono y Smith, 1998; Kappe et al., 1999). El mecanismo de invasión del parásito fue tema de controversia por mucho tiempo y mientras algunos investigadores creían que *T. gondii* era fagocitado por las células del hospedero, otros pensaban que era el propio parásito quien efectuaba la penetración celular. Recientes datos enfatizan el importante papel que juega el parásito durante la invasión, y más específicamente, los organelos



secretores que se encuentran en su parte apical (Blackman y Bannister, 2001).

La invasión a la célula se realiza en un lapso de 15 a 30 segundos (Morisaki, et al., 1995; Schwartzman y Saffer, 1992). Al momento de penetrar activamente a la célula del hospedero, *T. gondii* da lugar a la formación de una estructura membranosa conocida como vacuola parasitófora que rodea al parásito entrante y dentro de la cual el taquizoito se multiplica rápidamente (Pfefferkorn, 1990), evadiendo así la fusión con los organelos de la cascada endocítica de la célula hospedera (Sinai y Joiner, 1997). Una vez dentro, el parásito modifica el espacio vacuolar recién formado produciendo una red membranosa intravacuolar y secretando diferentes proteínas, asegurando así su permanencia dentro de la célula (Sibley y Krahenbuhl, 1988; Sibley et al., 1986; Achbarou et al., 1991; Leriche y Dubremetz, 1990).

Las evidencias indican que la penetración a la célula del hospedero se facilita gracias a la unión del conoide y al movimiento en espiral que realiza el microorganismo al momento de la invasión, así como a la secreción de factores provenientes de los organelos que se encuentran en su parte anterior entre los que se encuentran las micronemas, las roptrias y los gránulos densos, característicos de los parásitos apicomplejos intracelulares (Sam-Yellowe, 1996). Actualmente se sabe que las secreciones de las micronemas de *T. gondii* son empleadas por el parásito para reconocer y unirse a la célula del hospedero; las de las roptrias para formar la vacuola parasitófora y las de los gránulos densos para convertir a la vacuola en un compartimento metabólicamente activo (Dubremetz et al., 1998).

El mecanismo por el cual se forma la vacuola parasitófora y el origen del material que se incorpora a su membrana aún no están completamente definidos. Las observaciones sugieren que el parásito al momento de penetrar la célula, mediante un proceso de selección poco conocido, va sustrayendo lípidos de la membrana celular del hospedero así como cierto

TEXTO CON
FALLA DE ORIGEN

tipo de proteínas, para formar la nascente membrana de la vacuola parasitófora (Mordue et al., 1999).

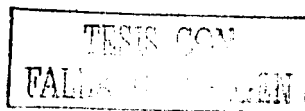
Por otra parte se ha observado que, una vez que el parásito se encuentra dentro de la vacuola parasitófora, tanto las secreciones de las roptrias (Perkins, 1992) como de los gránulos densos (Ossorio, et al., 1994), modifican bioquímicamente el ambiente intravacuolar favoreciendo el desarrollo del microorganismo dentro de la misma. Estudios indican que las roptrias descargan diferentes proteínas durante la invasión y que éstas aparecen asociadas a la membrana de la vacuola parasitófora inmediatamente después de que la penetración se ha llevado a cabo (Saffer et al., 1992).

Dado que la vacuola rodea al parásito durante su estancia en la célula hospedera, se cree que ésta regula el intercambio de nutrientes y metabolitos entre el parásito y la célula del hospedero. Lo anterior se apoya en estudios (Schwab et al., 1994) que han demostrado que la vacuola parasitófora funciona como un filtro que permite la libre difusión bidireccional de pequeñas moléculas cargadas y no cargadas, entre el citoplasma de la célula del hospedero y el espacio vacuolar, mediante poros o canales.

1.4. PROTEINAS DE LAS ROPTRIAS

El análisis del contenido proteico de las roptrias de *T. gondii* indica la existencia de una compleja mezcla de polipéptidos, la mayoría de los cuales han demostrado ser inmunogénicos (Perkins, 1992) .

Dado que diferentes estudios sugieren que las roptrias y su contenido juegan un papel primordial en el mecanismo de invasión de los parásitos apicomplejos, algunos investigadores se han interesado en detectar e identificar, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, las proteínas



contenidas en las roptrias de algunos de ellos (Schwartzman y Krug, 1989). Los resultados indican que el contenido proteico de las roptrias en estos parásitos es muy complejo. Por ejemplo, tanto en *T. gondii* como en *P. falciparum*, se han identificado de 12 a 15 proteínas de importancia que son diferentes entre sí y que son exclusivas para cada género (Perkins, 1992; Leriche y Dubremetz, 1991).

Una de las proteínas de roptrias de *T. gondii* que más se ha estudiado es la proteína de 60 kDa ROP1 o PEF (factor que facilita la penetración) (Schwartzman, 1986), la cual ya ha sido clonada y secuenciada (Ossorio et al., 1992) y que consiste en un polipéptido hidrofílico que tiene la capacidad de unirse a otras moléculas y de asociarse a la membrana de la vacuola parasitófora al momento de la invasión (Saffer, et al., 1992). A pesar de que su estudio ha servido para entender el procesamiento que sufren las proteínas de roptrias para alcanzar su madurez y su localización en estos organelos, su función precisa aún se desconoce (Bradley y Boothroyd, 2001).

Otra proteína que también ha despertado interés, sobre todo a nivel inmunológico, es la proteína ROP2 de 54 kDa de *T. gondii*, la cual es considerada una proteína integral de membrana, tanto a nivel de roptrias en taquizoitos extracelulares, como a nivel de vacuola parasitófora en taquizoitos intracelulares. Los estudios revelan que una vez que es excretada por el parásito y que pasa a formar parte de la membrana de la vacuola parasitófora, ROP2 queda expuesta hacia el citosol de la célula hospedera donde se une a las mitocondrias y retículo endoplásmico de ésta, mediante una secuencia consenso presente en su extremo amino terminal (Sinai y Joiner, 2001). Se deduce que la asociación de ROP2 con estas membranas es muy estable dado que la proteína solamente puede extraerse utilizando un detergente y concentraciones de sales bajas en un medio con pH ácido (Beckers et al., 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Además de las anteriores, se han podido identificar otras proteínas de roptrias en *T. gondii* que han sido menos investigadas. Entre ellas se encuentran la proteína ROP3 de 59 kDa (Sadak et al., 1988); la proteína ROP4 de 60 kDa (Sadak et al., 1988); la proteína ROP5 de 59.5 kDa (Lerliche y Dubremetz, 1991) y la proteína ROP6 de 42 kDa (Dubremetz et al., 1987). Las observaciones indican que probablemente las proteínas ROP2, ROP3 y ROP4 conforman una familia debido a que tienen propiedades físicas similares como su punto isoeléctrico básico y su estado de oligomerización, además de que existen anticuerpos monoclonales que presentan reacción cruzada con las tres (Lerliche y Dubremetz, 1991).

Proteínas de roptrias de <i>Toxoplasma gondii</i>	Masa molecular (kDa)
ROP1	68/60.5
ROP2	66/54
ROP3	66/59
ROP4	60
ROP5	59.5
ROP6	42

Es conocido que numerosas proteínas, tanto en procariones como en eucariotes, tienen que cruzar biomembranas para alcanzar su destino final dentro de la célula. Esto se logra gracias a las secuencias señal presentes en la proteína que son secuencias que contienen la información necesaria y suficiente para guiar una proteína a determinada membrana celular para iniciar su transporte transmembranal (translocación). Algunas de estas secuencias se localizan en el extremo amino terminal de la proteína y son escindidas durante o después del proceso de translocación por peptidasas específicas capaces de reconocer motivos estructurales en la proteína, más que secuencias lineares de aminoácidos (Muller, 1992). Otras de estas secuencias señal sin embargo, también pueden encontrarse en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Tal es el caso por ejemplo de la presencia

de la secuencia YEQL en ROP2 la cual determina que esta proteína sea destinada finalmente a las roptrias del parásito (Hoppe et al., 2000).

Considerando que se ha observado la presencia de secuencias señal en la estructura de todas las proteínas de roptrias estudiadas hasta el momento (Sam- Yellowe, 1996), se presume que éstas, al igual que otras proteínas de secreción en eucariotes, son inicialmente sintetizadas a nivel de los ribosomas para luego insertarse y translocarse en forma post-traducciona en el retículo endoplásmico y ser destinadas al aparato de Golgi, que es el que se piensa da lugar a las roptrias por gemación (Perkins, 1992). A pesar de que aún no se ha encontrado homología o similitud en estas secuencias señal (que pudieran indicar la existencia de un patrón común para estas proteínas) se ha observado que algunas de ellas presentan secuencias repetitivas de aminoácidos o grupos de aminoácidos específicos como C, P, S, G, Y ó K (Sam-Yellowe, 1996).

Por otra parte, se sabe que el paso final en la maduración de muchas proteínas involucra el procesamiento proteolítico de proteínas precursoras, donde diferentes proteasas cortan a los precursores en sitios específicos para producir proteínas biológicamente activas. Esta proteólisis limitada es la mayor modificación post traducciona que sufren muchas proteínas que incluyen, desde prohormonas y neuropéptidos, hasta precursores de proteínas de adhesión, factores de crecimiento, receptores, enzimas proteolíticas, glicoproteínas virales y toxinas bacterianas (Loh et al., 1993).

Todas las proteínas de roptrias estudiadas hasta el momento se sintetizan a partir de precursores de mayor tamaño que se procesan para dar lugar a la forma madura de cada una de ellas (Sadak et al., 1988). En el caso de las proteínas de roptrias de *P. falciparum* se sabe que la proteína de 240 kDa es procesada proteolíticamente a una proteína de 225 kDa (Roger et al., 1988), que la de 110 kDa es procesada a una de 100 kDa (Sam-Yellowe et al., 1988) y que dos proteínas de 80 kDa son procesadas a productos de 66

kDa (Crewther et al., 1990). De manera similar, se ha observado que la proteína ROP2 de 66 kDa de *T. gondii* es procesada proteolíticamente a una proteína de 55 kDa y que la proteína ROP4 de 68 kDa es procesada a un producto de 60 kDa (Sadak et al., 1988). En cada caso, se ha demostrado que el procesamiento ocurre después de la síntesis proteica.

Una de las proteínas que más se ha estudiado en este sentido es la proteína ROP1 de *T. gondii*, la cual es procesada proteolíticamente a nivel de las roptrias nacientes de parásitos en división (Soldati et al., 1998). Además, ha sido posible identificar el sitio de procesamiento de ROP1 por espectrometría de masas, y ha quedado definido que ROP1 es sintetizada como una pre-pro-proteína que sufre un procesamiento proteolítico en el extremo amino terminal, donde es eliminada la secuencia señal (pre-secuencia) así como la pro-secuencia, para dar lugar a la forma madura. El sitio de corte de la pro-secuencia se encontró entre la posición 83 (ácido glutámico) y la posición 84 (alanina) de la secuencia de ROP1 (Bradley y Boothroyd, 1999).

En cuanto a ROP2 actualmente se conoce la secuencia completa del gen que codifica el precursor de la proteína cuyo peso molecular calculado es de 64 kDa (Beckers et al., 1994). El gen codifica para un polipéptido de 561 aminoácidos cuya estructura general está constituida por 25 aminoácidos que conforman la secuencia señal o pre-secuencia, por aminoácidos (que constituyen el cuerpo principal de la proteína) los cuales incluyen una secuencia señal para mitocondrias (Sinai y Joiner, 2001) y una región hidrofóbica, ubicada entre los aminoácidos 466 y 486 (muy probablemente transmembranal) y por un dominio con carga en el extremo carboxilo terminal. Como ya se mencionó, se sabe que la proteína precursora sufre procesamientos post-traduccionales que consisten en la pérdida de la secuencia señal en el extremo amino terminal y en la eliminación de aminoácidos adicionales para producir la proteína madura de 54 kDa (Beckers et al., 1994). Sin embargo, aún no se ha determinado cuáles son

TESIS CON
FALLA DE URGEN

los aminoácidos que corresponden a la pro secuencia de la proteína cuya eliminación da lugar a la forma madura de la proteína. Existe sin embargo el antecedente de que la secuencia del precursor de ROP2, contiene el dipéptido que se ha reportado para la secuencia de ROP1 como el sitio de procesamiento de esta proteína (Bradley y Boothroyd, 1999). En el caso de ROP2, el sitio de procesamiento podría encontrarse en el extremo amino terminal de la secuencia del precursor, entre la posición 87 (ácido glutámico) y la 88 (alanina), lo cual daría una proteína madura de aproximadamente 54 kDa, aunque esto todavía tendría que comprobarse (Figura 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

361 TTT CAGAAGATTC TCGGAGAACTGTGGATGCCCTTGTCACATGTGAACGGTGTGTTTGTGTGTTACACATCTGCAACATGGAAAAC TGT 450
1 M E N C 4
41 CGCTCGGTCAGATCATCGTCTGTCTTATCTGGCTAGCTGCCGATTCTTTGTTTCGGCACTTGGCCACGTACAGCAAGCGCTGGCGTT 540
5 A S V R S S S C L I W L A A A F P V S A L G H V Q O G A G V 34
541 GTCCGGCTCGCCACTGGCAGAACTCGAAAGCCGCTGTAGTGTCCGGCCGGGAGGCGCTGCTCAGACATTTCCACAGCCCAATT 630
35 V R P R H W Q N S E A A V S V R P P G G A S P R H F H S P I 64
631 GAGCCAGTAGCATTTATGTGGGGAGCCAGTGAAGCAAGCATCOAGGCTCATGGCTGGAGCAGGAAGCCGGAGGAAGTGACCCCC 720
6 E P V A F I D G E H V E D K H G G S W L E O R E A A E E V T P 94
721 TTACTGAAACAGCCACAGAGAGCCCGACAGCTGCCCGAGTGTCTTAGAAGGTTACTCAGCGCTTTGCGTTTTCGGCAGCTGGGAGG 810
95 L L N S H T E T P T Q S F S A F R R L L R P L R F W R R G R 124
811 ACAGGCGCATCAGATGGCGGAGGAAACACCGCGAGCGCTGCCCTCCCTACCGACCCGACTGTTTCAGCATTTGGCGGGTGGCGCA 900
125 T G G S D G G G V P P Q T P R P S L P T R L F Q H L R R A A 154
901 GCAGCAATTCGCGCGGCGCATCTAGATCTTTAGGAGATTTCCAGCAGTCCAAGAACCCTGATTTCCCTCCGACGAGTTTCCGGAGGAT 990
155 A A I P A A A S R F R R R R V Q E P V F P P D E F P D 184
991 GTCGACAGCAACCCTATGTATTCGCGGATCAGGATCTGGAGACGTCGTCATTGAGGAGCTGTTCAATCGTATACGGGAAACCAAGCGTA 1080
185 V D T N P M Y F R G T D P G D V V I E E L F N R I P E T S V 214
1081 TGGAAATGAGAACGAAACCGCTCTGTGCAACGCCAACCCACTAGTGTCCACAGCATTTGGCGCTAATGAGCAGAGCTTCCGCGTGGAGTCG 1170
215 W N E N E R V L S N A N H L V S T A L W R N E Q S F R V E S 244
1171 GAGCTGGCGGAGCGTCCAAAGGAGCTAGTCAGAGGGCCGATGCTCCGCGACGACCGCTGATCTGTCTCGAAGCGCACCGACGAGGAG 1260
245 E L G E R P R T L V R G P V L R D D G S Y I C L E A T D Q E 274
1261 ACAGGAGAACCCTTGAGTGCACGTTCCATATTTCCAGGAAACCGCGCTCCCAACCGCATCAAGCAGTTGAGCGAGCAGGTTGGCTGGCG 1350
275 T G E P L E V H V P Y F T E R P P S N A I K O V L S E Q V L R 304
1351 CTACGCTTGCTACGAGGCATCAAAAACAGAGGCAAGCCAAAGCGTATCTCAGATTTATATTTCCCATCGATTTGTGTAAGGACCCAAAG 1440
305 L R L L R G I K N O R O A K A Y L R F I F P I D L V K D P K 334
1441 AAGAGGAAGATGATCCGGGTTCCGCTTAGATGAGAGGATATGTGGGCTCGAGCAGATTTCTTCTGATCCCGGAATCGAGAGTAAGCTT 1530
335 K R K M I R V R L D E R C M A W V L S R F F L Y P R M Q S N L 364
1531 CATATTTGAGAGAGTCTACTGAGTCTTCTCAACACAAAGTCCCTCGTGGACCAAGCTCGGTTGCAAGCTCAGGCTCAGGCTCATA 1620
365 H I L G D V L L S H S S T H K S L V H H A R L Q L T L O L I 394
1621 AGTGTGCGCGAGTCTCCAGCACTATGGCCTTGTCATCGCGATTTTCAAGTCAGGAATCTCCTGTTAGACAGCGGTGGTGGCTGTT 1710
395 R L A A S L O H Y G G L V H A D F Q V R N I L L D Q R G G V F 424
1711 TTGACCGGCTTGAACATCTGGTGGAGAGCGCCAGTGTCCGCTCATTGGTGGAGATTTGGCCCGCGAGACTACAGCGSAA 1800
425 L T G F E H L V R D G A S A V S P I G R G F A P P E T T A E 454
1801 CGAATGCTCCCTACCGCCAGCACCCCAACCGCTGATGACATTTCCGTTTGATACATGGACATTTGGGGTTGGGATCTACTGGATTTGG 1890
455 R M L P Y R Q H H P T L M T F P F D T W T L G L A I Y N I W 484
1891 TGCGCGGATTTGCCCAATACCGAGGACGCGGAGCTAGCGGAAATGAATGGATCTATCGACGCTCAAGAATATCCCAAGCCAGTCCAGA 1980
485 C A D L P N T E D A E L G G I E W I Y R R C K N I P O P V R 514
1981 GCTTTGCTTGAGGATTTTGGGATCTCGAAAGAGGATCGGCTCCCTCCATGCAAGCCATGGAGACTCTGAGTACGAGCACTGGCC 2070
515 A L L E G F L R Y S K E D R L L P L Q A M E T S E Y E O L R 544
2071 ACAGGCTATCAGCGCTTTGGCCCTGTATCAAAGTGTAGGAGAACCGGATGAGAGCTGGTGGCGGCCACCATCGGGAACATCTCAGCCG 2160
545 T E L S A V L P T G T Q T D G E P A 561

Figura 3. Secuencia del precursor de ROP2 (Beckers et al., 1994; Hoppe et al., 2000; Sinal y Joiner, 2001).

Secuencia de ADN y secuencia de aminoácidos pronosticada para el gen de ROP2. Las flechas indican los sitios potenciales de corte de la secuencia de señal. El rectángulo gris oscuro indica el probable sitio de procesamiento de la proteína precursora entre la posición 77 y 88. El rectángulo rayado indica la secuencia señal para mitocondrias. La región que constituye un probable dominio transmembranal está subrayada. El rectángulo cuadrículado indica la secuencia YEQL. La región dentro del rectángulo indica un palindromo de 14 nucleótidos con función desconocida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

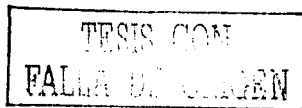
1.5. ESTUDIOS INMUNOLOGICOS

Desde su descubrimiento, *Toxoplasma gondii* ha sido tema de discusión para médicos, veterinarios y científicos. En los últimos 25 años se ha demostrado la importancia de la toxoplasmosis en el humano y particularmente, en embarazadas y en individuos inmunosuprimidos. Para los próximos 25 años se espera que el control de la enfermedad se alcance mediante la prevención de la infección y el buen manejo de los pacientes infectados.

La vacunación, uno de los métodos preventivos más eficaces que se conoce contra las enfermedades infecciosas, debe considerarse como una de las principales opciones para controlar la enfermedad. Sin embargo, para diseñar una vacuna contra *T. gondii*, es necesario primero conocer los mecanismos por los cuales el parásito es reconocido y posteriormente controlado por el sistema inmunológico de un individuo infectado.

Se sabe que la respuesta inmunológica contra *T. gondii* es tanto de tipo humoral como de tipo celular. La respuesta humoral rápida y la recuperación exitosa de la mayoría de los hospederos infectados con *T. gondii* indican que el parásito es altamente inmunogénico (Waldeland y Frenkel, 1983; McLeod et al., 1985). Sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual el organismo logra controlar la infección es aún desconocido.

Diversos experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la respuesta inmunológica celular juega un papel muy importante en la protección contra el parásito (Frenkel, 1967; Nathan et al., 1984; Suzuki y Remington, 1988; Susuki et al., 1988, 1989; Gazzinelli et al., 1991; Saavedra y Heri6n, 1991). Se ha observado por ejemplo, que en pacientes con SIDA que albergan quistes tisulares de *T. gondii*, existe una marcada correlaci6n entre la p6rdida de c6lulas T CD4⁺ y la reactivaci6n de la infecci6n



(Dannemann et al., 1992). Por otra parte, en el modelo murino se ha demostrado que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ son importantes tanto en el control de la infección aguda como en la prevención de la reactivación de la infección crónica, ya que producen interferón-gama que es el mediador principal de resistencia contra el parásito (Gazzinelli et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992; Suzuki et al., 1988, 1989, 1990; Khan et al., 1999).

Una vacuna contra *T. gondii* sería muy valiosa y su desarrollo parece factible en vista de que la primoinfección con este parásito, induce en el hospedero una protección específica y de larga duración contra una reinfección posterior (Remington y Krahenbuhl, 1982). En modelos animales, por ejemplo, se han obtenido resultados alentadores empleando una vacuna atenuada constituida por una cepa mutante termosensible de *T. gondii* (mutante ts-4) (Waldeland y Frenkel, 1983). Sin embargo, dos obstáculos han impedido su uso en la población humana: En primer término, la vacuna representa un cierto nivel de riesgo dado el potencial de reversión y segundo, su conservación es limitada dado que está constituida por taquizoitos, un estadio del parásito con tiempo de vida muy corto en el medio extracelular. Por lo tanto, sería conveniente diseñar una vacuna más segura y más estable, como es el caso de una vacuna subunitaria, que está elaborada a partir de antígenos definidos. Una vacuna de este tipo bien podría contener los antígenos comunes a los diferentes estadios del parásito (Kasper et al., 1984; Kasper, 1989).

Diversos trabajos de tipo inmunológico han permitido la identificación de proteínas de interés para la elaboración de una vacuna contra *T. gondii*. Se ha observado, por ejemplo, que la inmunización de ratones con la proteína de la superficie del taquizoito SAG1(p30) induce una protección de casi 100% contra la infección aguda ocasionada por una cepa virulenta y una protección aparente de 100% contra el desarrollo de quistes intracerebrales (Bulow y Boothroyd, 1991; Khan et al., 1991). También se ha demostrado que después de inmunizar ratones con un plásmido que codifica parte de la

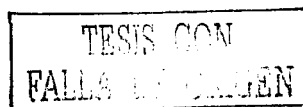
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

secuencia de esta proteína, la cual es expresada por las células del hospedero, se obtiene una protección de 80-100% contra una cepa virulenta del parásito, la cual es mayor que la obtenida si se inmuniza con la forma recombinante de la proteína (Nielsen et al., 1999).

Por otra parte, después de identificar en una biblioteca de ADNc de *T. gondii* una clona de ADNc que codifica para la proteína de roptrias ROP2 (Saavedra et al., 1991; Heri6n et al., 1993) que se encuentra en los tres estadios del parásito, se observ6 que la forma recombinante de la proteína tiene la capacidad de estimular *in vitro* y de manera específica, a una clona de linfocitos T obtenida a partir de un individuo naturalmente infectado e inmune que es productora de altos niveles de IFN-gama e interleucina-2. Adem6s, se encontr6 que el epítotope definido por esta clona T, presente en la proteína de 54 kDa, se encuentra de manera conservada en diferentes cepas de *T. gondii* (tanto virulentas como no virulentas) y es reconocido en el contexto del MHC II DPw4, el cual es un alelo muy com6n en la poblaci6n cauc6sica (Saavedra et al., 1991; S6nchez-P6rez y Shaw, 1986).

Asimismo, mediante algoritmos de predicci6n, ha sido posible identificar otros epítotope en ROP2 para células T, que tienen la capacidad de reestimar células mononucleares de sangre perif6rica en un alto porcentaje de individuos inmunes (Saavedra et al., 1996). Adem6s, empleando diversas formas recombinantes de ROP2, se ha demostrado que la proteína contiene epítotope para células B y que m6s del 85 % de individuos seropositivos presentan anticuerpos contra este antígeno (Van Gelder et al., 1993; Martin et al., 1998; Jacquet et al., 1999).

Dada la efectividad mostrada por las vacunas de ADN contra pat6genos intracelulares como *Leishmania spp.* y *Plasmodium falciparum* (Gurunathan et al., 1997; Schneider et al., 1998), tambi6n se han realizado experimentos de inmunizaci6n gen6tica en ratones, donde la secuencia parcial o completa de la proteína ROP2 se ha incluido en el pl6smido



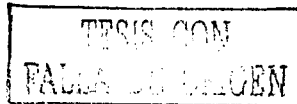
inyectado (Vercammen et al., 2000; Leyva et al., 2001). Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que la respuesta inmunológica que puede inducir la proteína ROP2 expresada de esta manera, puede ser tanto de tipo humoral como celular y de naturaleza parcialmente protectora contra cepas virulentas de *T. gondii*. Asimismo, estos estudios confirman que el tipo e intensidad de la respuesta inmunológica hacia un antígeno codificado en un plásmido, depende de la naturaleza de las secuencias del antígeno y del plásmido, las cuales van a definir la manera en que el antígeno expresado sea procesado y presentado en el organismo (Leyva et al., 2001).

2. PURIFICACION DE PROTEINAS

2.1. Cromatografía de afinidad.

A través de los años se han descrito diversos métodos para llevar a cabo la purificación de proteínas. La gran mayoría aprovechan las características propias de la proteína para llevar a cabo su aislamiento, tales como su tamaño, solubilidad, carga eléctrica, actividad biológica, etc.

Se sabe que las proteínas llevan a cabo sus funciones biológicas a través de mecanismos de acoplamiento o unión no covalente a otras biomoléculas denominadas ligandos, lo cual se lleva a cabo en sitios de unión muy específicos. La interacción entre el sitio de unión de la proteína y el ligando se encuentra determinada por el tamaño y forma del ligando así como por el número y distribución de superficies complementarias. Estas uniones pueden involucrar interacciones polares, electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o una combinación de todas ellas. La actividad de unión de una proteína a un ligando específico, cuando es estereoselectiva y de alta afinidad, puede ser explotada para la purificación de la misma con una técnica comúnmente conocida como cromatografía de afinidad.

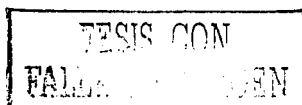


La cromatografía de afinidad es la técnica más poderosa utilizada para purificar proteínas ya que su alta selectividad permite purificar una sola proteína a partir de una mezcla proteica que contenga altas concentraciones de otras proteínas e incluso una concentración muy baja de la proteína de interés. Además, si la afinidad del ligando por la proteína es suficientemente alta, la técnica ofrece la ventaja de poder obtener y concentrar grandes cantidades de la proteína pura, cuando se cuenta con suficiente materia prima (Harris y Angal, 1989).

La cromatografía de afinidad es una metodología que involucra varios pasos como la selección del ligando, la selección de la matriz, la selección de un brazo espaciador, la selección de las condiciones de inmovilización del ligando y la adsorción, lavado y elución de la proteína. Algunos detalles y consideraciones de esta metodología importantes para esta tesis se pueden consultar en el Apéndice I.

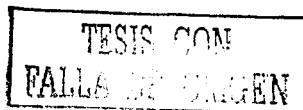
2.2. INMUNOPURIFICACION

La inmunopurificación es uno de los métodos de cromatografía de afinidad más selectivos y poderosos para la purificación de proteínas. Tiene la ventaja de que pueden utilizarse anticuerpos que son capaces de distinguir entre antígenos muy similares entre sí y por lo tanto superan las dificultades de separación presentes en otros métodos de purificación. Tal es el ejemplo de los anticuerpos monoclonales, que además, pueden ser obtenidos al llevar a cabo una inmunización con antígeno relativamente impuro. Esto significa que pueden obtenerse incluso antes de que el método alternativo para la purificación de la proteína haya sido desarrollado. Por otra parte, los anticuerpos son una clase de proteínas particularmente resistentes al ataque proteolítico y pueden ser cortados de manera muy selectiva solamente por un número limitado de enzimas. Además, a pesar de que se requiere algo de



consideración para escoger el eluyente óptimo para desprender el antígeno de interés de la columna, se ha observado que muchos anticuerpos son altamente resistentes a valores de pH extremos y a la fuerza iónica, siendo usualmente la naturaleza del antígeno quien dicta las características del eluyente. Todo esto da a la inmunopurificación ventajas sobre otros métodos de afinidad que emplean proteínas inmovilizadas.

Existiendo la necesidad de realizar más estudios sobre la inmunología de la toxoplasmosis y sobre ROP2, considerando la importancia de esta proteína como candidato a vacuna subunitaria contra la enfermedad de acuerdo a los antecedentes, el propósito del presente trabajo consistió en desarrollar una metodología para lograr la purificación de la proteína nativa de 54 kDa de roptrias de *T. gondii* a partir de una suspensión de taquizoitos.



OBJETIVOS

En base a las cualidades anteriormente descritas sobre la cromatografía de afinidad como técnica para purificar proteínas, se consideró emplear esta técnica para purificar la proteína de interés, con la expectativa de obtener al término del proceso una proteína pura y un alto rendimiento.

Objetivo general.

El objetivo general del presente trabajo consistió en desarrollar una metodología para purificar la proteína nativa de 54 kDa (ROP2) de *Toxoplasma gondii* (Wiktor) mediante cromatografía de afinidad, utilizando como ligando el anticuerpo monoclonal 2D1 que reconoce en forma específica a ROP2.

Objetivos específicos.

Para ello fue necesario plantear los siguientes objetivos específicos:

- a) Purificar el anticuerpo monoclonal 2D1 a partir de líquido ascítico de ratón.
- b) Llevar a cabo el acoplamiento del anticuerpo monoclonal 2D1 a una matriz de agarosa activada.
- c) Preparar el extracto antigénico a partir de una suspensión de taquizoitos de *T. gondii*.
- d) Determinar las condiciones de adsorción del antígeno, así como las condiciones de lavado y de elución en la columna, a partir de ensayos de elución-adsorción en lote.
- e) Llevar a cabo la purificación de la proteína en una columna abierta retomando los puntos anteriores.
- f) Demostrar la pureza de la proteína obtenida.

MATERIAL Y METODOS

Anticuerpo

El anticuerpo monoclonal T5-2D1 que se utilizó en el presente trabajo fue obtenido por Leriche & Dubremetz (Leriche & Dubremetz, 1991) al fusionar células SP2/0 de mieloma con esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con una fracción subcelular enriquecida en roptrias preparada a partir de taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. La producción masiva del Ac se llevó a cabo después de inyectar las células del hibridoma en ratones BALB/c y colectar el líquido ascítico. Al hacer reaccionar el Ac monoclonal T5-2D1 contra la fracción enriquecida en roptrias separada por SDS-PAGE y transferida a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham), se observó que T5-2D1 reconoce específicamente un epítoto presente en la proteína de roptrias ROP2 de 54 kDa de *T. gondii*.

Purificación y acoplamiento del anticuerpo

Dado que en el líquido de ascitis, el Ac monoclonal se encontraba en presencia de varias otras biomoléculas de origen murino como lípidos y proteínas, fue necesario purificarlo antes de acoplarlo a las matrices. Los lípidos y el material insoluble se eliminaron por ultra centrifugación a 100 000 x g, llevándose después a cabo la precipitación fraccionada de las proteínas con una solución saturada de sulfato de amonio. La mezcla proteica obtenida se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa DE52 (Whatman) y después de realizar el lavado, se eluyó con un gradiente de NaCl 20-400 mM tal como se indica en el apéndice II. La densidad óptica de las fracciones obtenidas se midió a 280 nm. La pureza del anticuerpo eluido se comprobó por electroforesis, bajo condiciones no desnaturizantes, en un gel al 7.5 % que posteriormente se tiñó con Coomassie G250. El anticuerpo puro se acopló a la matriz de Affigel 10 (Bio-Rad) y Sefarosa 4B CNBr (Sigma) como se describe en el apéndice.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Preparación del lisado de Toxoplasma

Taquizoitos de la cepa Wiktor (Saavedra et al., 1990) de *T. gondii* se cultivaron *in vivo* en ratones Balb/c, haciendo pases seriados del parásito (cada 2 días) en la cavidad peritoneal de los ratones y después *in vitro* en células VERO, de donde fueron finalmente recolectados. Los taquizoitos se suspendieron en PBS ajustando la concentración a 1000×10^6 taquizoitos/ml PBS pH 7.8 y la suspensión se congeló a -70°C en alícuotas hasta el día de su uso. Para preparar el lisado, a cada alícuota se añadió SDS (Bio-Rad) a una concentración final del 0.1% así como inhibidores de proteasas [Leupeptina 0.01mg/ml y Aprotinina 0.1mg/ml (Boehringer); PMSF 1mM/isopropanol (Sigma); EDTA 2mM (Sigma)]. En algunos ensayos, además de SDS 0.1% se incluyó también CHAPS 0.6% (Sigma) o Tritón X-100 0.6% (Sigma).

Ensayos de adsorción-elución en lote

Los ensayos de adsorción-elución en lote se realizaron a temperatura ambiente en tubos para microfuga (Eppendorf). En cada tubo se pusieron a incubar por dos horas el lisado de Toxoplasma y una alícuota de la resina de afinidad, bajo las condiciones descritas para cada experimento. Después de centrifugar el tubo a 8000 rpm, se tomó una muestra de la fracción no unida (NU). Se lavó la resina con PBS-SDS 0.1% y se resuspendió el gel de afinidad con el eluyente por 5 minutos. Después de centrifugar a 8000 rpm, se tomó una muestra de la fracción eluida (E). Ambas muestras fueron preparadas para electroforesis y se analizaron luego por SDS-PAGE por el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970), en un gel separador al 10% y un gel concentrador al 3%. Una vez realizada la electrotransferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, la inmunodetección de las muestras se hizo con el Ac T5 2D1 y un conjugado anti-inmunoglobulina de ratón, producido en cabra y marcado con fosfatasa alcalina (Sigma). Como sustrato cromogénico se empleó azul de nitro tetrazolio (Sigma) y BCIP

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Sigma). Los marcadores de peso molecular incluidos en el gel y que fueron transferidos a la membrana de nitrocelulosa, se tiñeron con Rojo Ponceau.

Purificación de ROP2

Una vez que la columna fue equilibrada, el lisado de *Toxoplasma* se aplicó a la matriz de Sefarosa 4B CNBr T5 2D1 y después de realizar los lavados correspondientes, se eluyó con dietilamina 100 mM-SDS 0.1% pH 11.5. La densidad óptica de las fracciones obtenidas se midió a 280 nm. La pureza de la proteína eluida se comprobó, bajo condiciones no reductoras, por SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección con el Ac T5 2D1 o suero de ratón y un conjugado anti-inmunoglobulina de ratón, producido en cabra y marcado con fosfatasa alcalina (Sigma). Posteriormente se hizo un corrimiento electroforético de la proteína eluida en un gel que se tiñó después con Coomassie G250.

Para mayor detalle de los procedimientos ver la sección de resultados y el apéndice II.

RESULTADOS

1. Purificación del anticuerpo monoclonal T5-2D1 a partir de líquido ascítico.

PERFIL DE ELUCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 2D1 PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

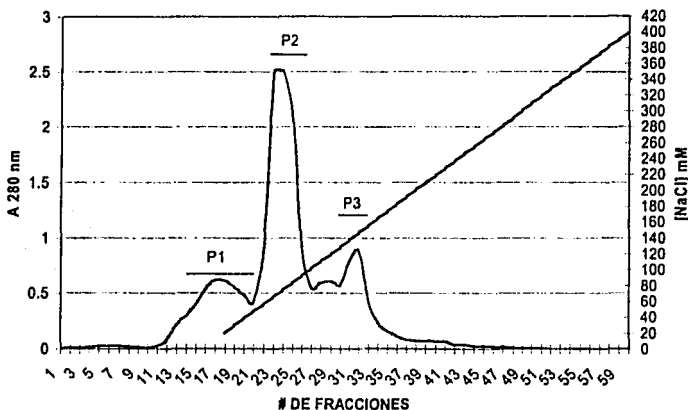


Figura 4. Perfil de elución de la purificación del anticuerpo monoclonal T5-2D1 por cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-Celulosa.

10 mg de proteína de ascitis disueltos en Tris HCl 20 mM + NaCl 10 mM pH 7.8, se aplicaron a una columna de 10 ml (0.9 cm de diámetro X 16 cm de altura) de DEAE-celulosa equilibrada con Tris HCl 20 mM + NaCl 20 mM pH 7.8. Después de lavar con 20 ml de Tris HCl 20 mM + NaCl 20 mM pH 7.8, se eluyó el Ac con 100 ml de un gradiente de NaCl 20-400 mM elaborado a partir de una solución de 50 ml de Tris HCl 20 mM + NaCl 20 mM pH 7.8 y una solución de 50 ml de Tris 20 mM + NaCl 400 mM pH 7.8. El flujo fue de 10 ml/hora y se colectaron fracciones de 2 ml. La absorbancia de cada una de las fracciones se midió a 280 nm

Como muestra la gráfica, se observaron tres picos definidos por: las fracciones 13-20 (P1), las fracciones 22-26 (P2) y las fracciones 30-33 (P3), donde P2 incluyó las fracciones que presentaron mayor absorbancia. Las fracciones 13-20 correspondientes al primer pico se juntaron en una sola fracción denominada P1, las fracciones 22-26 correspondientes al segundo pico se juntaron en una fracción denominada P2, y las fracciones 30-33 correspondientes al tercer pico se juntaron en una última fracción denominada P3. Se determinó que P1 contenía un total de 5.7 mg de proteína, P2 un total de 26 mg de proteína y P3 un total de 4.3 mg de proteína (Tabla 1).

Tabla 1. Purificación del Ac T5-2D1 a partir de líquido de ascitis

Fracción	Volumen	mg de proteína/ml	mg proteína total
Pp. con (NH ₄) ₂ SO ₄	4 ml	22.5	89.8 (mg totales obtenidos)
Pp. con (NH ₄) ₂ SO ₄	2.2 ml	22.5	50 (mg empleados en la columna DEAE)
P1	17 ml	0.33	5.7
P2	11 ml	2.4	26.0
P3	9 ml	0.47	4.3

Con el fin de identificar la fracción que contenía el anticuerpo monoclonal, una muestra de las fracciones P1, P2 y P3, así como del precipitado con sulfato de amonio, fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y no desnaturalizantes. El gel se tiñó posteriormente con azul de Coomassie (Figura 5).

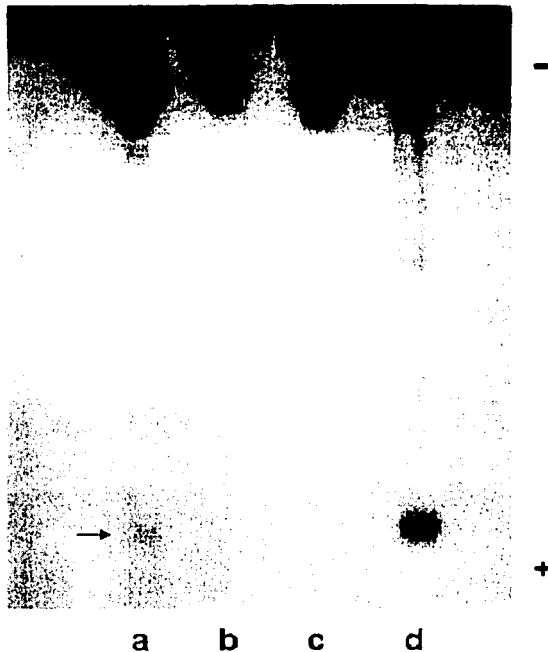


Figura 5. Determinación de la pureza, por tinción con azul de Coomassie en un gel no desnaturalizante y no reductor, del anticuerpo monoclonal T5-2D1 purificado por cromatografía de intercambio iónico. a) 10 μ g de proteína precipitada con sulfato de amonio. b) 10 μ g de la fracción P1 c) 10 μ g de la fracción P2 d) 10 μ g de la fracción P3.

Los resultados indican que la banda observada en el carril con P2 corresponde al Ac T5-2D1 ya que su patrón de migración en el gel coincide con el de la proteína mayoritaria presente en el precipitado con sulfato de amonio. Además, la concentración de NaCl a la que eluye la proteína contenida en P2 (40-80 mM) concuerda con la concentración de NaCl a la que eluyen la mayoría de los Acs monoclonales según reportes. También se observa que el Ac contenido en P2 se encuentra puro ya que en el gel no se detectan bandas de otras proteínas. Por otra parte, en el carril con P1 también logra distinguirse una única banda correspondiente a una proteína que bien podría ser el Ac T5-2D1. Sin embargo, se observa que su movilidad

es diferente a la de la proteína mayoritaria presente en el precipitado con sulfato de amonio. Cabe mencionar que P1 fue obtenido antes de aplicar el gradiente de NaCl lo que hace suponer que P1 contiene, o una microforma del Ac T5-2D1 con diferente grado de glicosilación, o un anticuerpo diferente al Ac T5-2D1, o incluso otro tipo de proteína con un patrón de migración similar al del Ac T5-2D1. Finalmente, en el carril con P3 se observa una banda que también puede detectarse en la muestra control aunque en menor intensidad. De acuerdo a su patrón de migración en el gel, esta banda corresponde a una proteína diferente a una inmunoglobulina que bien puede ser la albúmina presente en el líquido de ascitis.

En vista de los resultados obtenidos, se determinó utilizar el Ac purificado contenido en la fracción P2 (T5-2D1) para elaborar las matrices de afinidad con Affigel 10 y Sefarosa 4B-CNBr.

2. Acoplamiento del anticuerpo monoclonal T5-2D1 al gel de afinidad (Affigel 10 o Sefarosa 4B-CNBr)

Bajo la metodología indicada en el apéndice, se elaboró una columna con el gel de afinidad Affigel 10 y el anticuerpo monoclonal T5-2D1 puro. La cantidad de Ac acoplado al gel fue de 6.2 mg Ac/ml de gel. Por otra parte también se preparó una columna de afinidad de Sefarosa 4B-CNBr con el mismo Ac. A esta columna se acoplaron 4.2 mg Ac/ml de gel.

3. Preparación del lisado de *Toxoplasma*

Los antecedentes indican que ROP2 es una proteína que se encuentra fuertemente asociada a membranas localizadas en las roptrias y en la vacuola parasitófora (Beckers et al., 1994). Por esta razón, para preparar el lisado de *Toxoplasma*, se determinó emplear un detergente que en primera instancia tuviera la capacidad de solubilizar y extraer a ROP2 de los

taquizoitos de manera óptima, y que en segundo término no presentara interferencia en nuestro método de cuantificación de proteínas totales (método de Bradford).

En vista de que se contaba con el antecedente de que el detergente zwitteriónico CHAPS es recomendado para solubilizar proteínas de membrana y que no constituye una interferencia en la determinación de proteínas por el método de Bradford, se decidió investigar su capacidad para extraer y solubilizar la proteína ROP2. Los experimentos mostraron que a pesar de que contaba con la capacidad para solubilizar y extraer la proteína de las membranas de roprías, no permitía que ROP2 fuera reconocida por el anticuerpo monoclonal acoplado a la matriz (resultados no mostrados). Una explicación a lo anterior es que el arreglo conformacional adquirido por la proteína en presencia de CHAPS, mantuviera inaccesible el epítoto que es reconocido en forma específica por el Ac.

4. Unión de ROP2 al Ac T5-2D1 acoplado a Affigel 10, en presencia de SDS, CHAPS y Tritón.

Ahora bien, dado que se tenía el antecedente de que el Ac monoclonal T3-4A7, específico para las proteínas ROP2, ROP3, y ROP4 de *T. gondii*, era capaz de reconocer en ensayos de inmunoprecipitación a ROP2 en presencia del detergente SDS al 0.5% (Sadak et al., 1988), y que se había observado en ensayos de inmunodetección que el Ac monoclonal T5-2D1 era capaz de reconocer en una membrana de nitrocelulosa a ROP2 en estado desnaturalizado (debido a la presencia de SDS al 0.1% en el gel y en la solución amortiguadora de electroforesis), se decidió utilizar este detergente para la elaboración de un nuevo lisado. Para ello, se prepararon tres lisados con SDS al 0.1%. En dos de estos lisados se incluyó además del SDS, CHAPS al 0.6% o Tritón X-100 al 0.6% con el objetivo de desplazar el SDS unido a ROP2 y observar el efecto en el reconocimiento de la proteína por el Ac. Los resultados se observan en la figura 6.

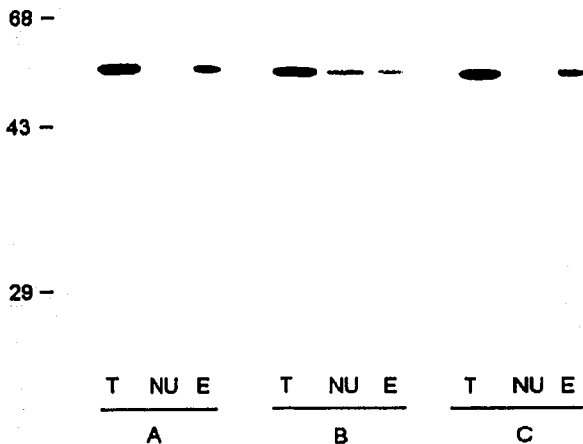


Figura 6. Unión de ROP2 al Ac T5-2D1 acoplado a Affigel 10, en presencia de SDS 0.1%, SDS 0.1%-CHAPS 0.6% y SDS 0.1%-Tritón X-100 0.6%.

3 diferentes lisados de igual concentración (80×10^6 laquizoitos/ml PBS) se prepararon con SDS 0.1%, SDS 0.1%-CHAPS 0.6% y SDS 0.1%-Tritón X-100 0.6% respectivamente. En tubos para microfuga se pusieron a incubar 5 μ l del gel y 50 μ l de los lisados por 2 horas a temperatura ambiente. Después de una centrifugación se tomó una alícuota de la fracción no unida (NU) y se lavó el gel varias veces con PBS-SDS 0.1% pH 7.8. La elución de ROP2 se llevó a cabo al incubar por 5 min el gel con 40 μ l de la solución amortiguadora SDS 2.5%-urea 8 M pH 6.8 a 100 °C en baño María. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, electrotransferencia, e inmunodetección con el Ac T5-2D1. Las masas de los marcadores de peso molecular incluidos en el gel se indican en la figura. A: lisado preparado con SDS 0.1%. B: lisado preparado con SDS 0.1%-CHAPS 0.6%. C: lisado preparado con SDS 0.1%-Tritón X-100 0.6%. T: 12.5 μ l del lisado total. NU: 12.5 μ l de la fracción no unida. E: 10 μ l de la fracción eluida.

Los resultados muestran que la proteína ROP2 presente en los lisados preparados con SDS 0.1% y SDS 0.1%-Tritón X-100 0.6% se une totalmente a la matriz de afinidad y que una gran parte de la proteína unida es eluida. En cambio, se observa que solamente una fracción (alrededor del 50%) de la proteína ROP2 presente en el lisado preparado con SDS 0.1%-CHAPS 0.6% se une a la matriz de afinidad y es eluida.

Respecto a lo anterior se puede pensar que tal vez el epítipo presente en ROP2 solamente es reconocido por el Ac monoclonal cuando la proteína se encuentra en estado desnaturalizado, lo cual es factible si ROP2 se encuentra en presencia de SDS que es un detergente iónico con propiedades desnaturalizantes sobre las proteínas. El hecho de que, en presencia de CHAPS-SDS, solamente una fracción de la proteína presente se una al gel de afinidad se explica si consideramos sólo sobre una parte del número total de moléculas de ROP2 presentes, un posible desplazamiento de las moléculas de SDS que rodean a ROP2, por moléculas de CHAPS con efecto no desnaturalizante. De manera similar pueden interpretarse los resultados obtenidos con Tritón X-100 que muestran que su presencia en el lisado junto con SDS, no impide que ROP2 sea reconocida por el Ac. En este caso tal vez las moléculas de Tritón X-100 no tienen la capacidad de desplazar a las moléculas de SDS que rodean a la proteína, o tal vez en caso de que sí lo hagan, a pesar de ser un detergente no iónico, el Tritón X-100 tiene la capacidad de desnaturalizar a ROP2 de una manera similar a la del SDS haciendo accesible el epítipo al Ac.

Tomando en consideración los resultados anteriores, se determinó utilizar SDS al 0.1% en la preparación del lisado de *Toxoplasma* a pesar de que esto representó un impedimento para medir la cantidad de proteína total en el extracto por el método de Bradford.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Determinación de la capacidad de las matrices de Affigel 10 y Sefarosa 4B-CNBr empleando el lisado de *Toxoplasma* -SDS 0.1%.

Por otra parte, con el fin de determinar la capacidad de cada matriz, es decir la cantidad mínima de gel de afinidad necesaria para unir toda la proteína ROP2 presente en un volumen determinado de lisado de *Toxoplasma*, se incubaron cantidades crecientes del Ac T5-2D1 acoplado a Affigel 10 o Sefarosa 4B-CNBr con una cantidad constante de lisado preparado con SDS 0.1% (Figuras 7 y 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se observa en la figura 7, a medida que va aumentando el volumen de gel de afinidad agregado, la cantidad de ROP2 presente en la fracción no unida (NU) va disminuyendo y la cantidad de ROP2 presente en la fracción eluida (E) va aumentando.

Los resultados muestran que en el caso del gel con 6.2 mg de Ac/ml de Affigel, se requieren aproximadamente un mínimo de 5 μ l de gel para capturar por completo la proteína ROP2 contenida en 50 μ l del lisado (4 millones de taquizoitos). Lo anterior se deduce del hecho de que ROP2 ya no sea detectada en la fracción no unida (NU) al emplear dicha cantidad de gel.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

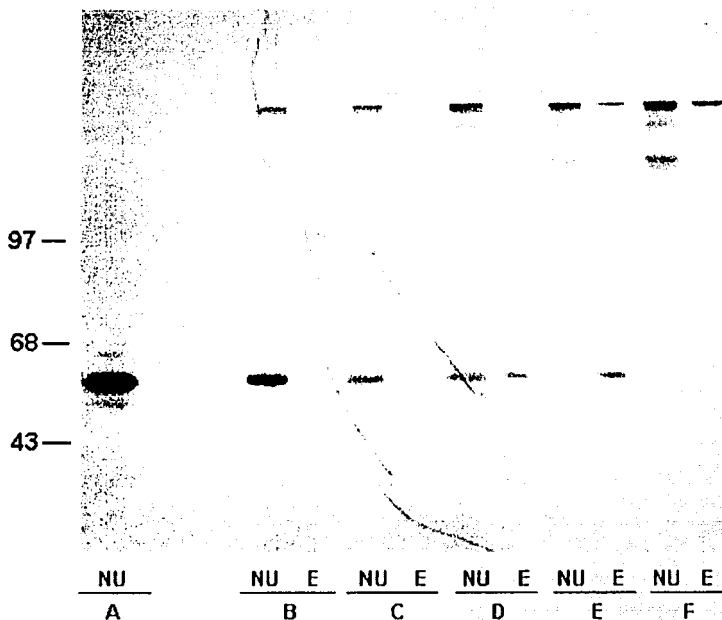


Figura 8. Determinación de la capacidad de la matriz Sefarosa 4B-CNBr-T5-2D1.

En tubos para microfuga se pusieron a incubarse diferentes cantidades de gel de afinidad con 50 μ l del lisado de *Toxoplasma* preparado con SDS 0.1% (80×10^4 taquizoitos/ml PBS-SDS 0.1%). Después de una centrifugación, se tomó una alícuota de cada fracción no unida (NU) y se lavó el gel varias veces. La elución de la proteína se llevó a cabo al incubarse por 5 min a 100°C en baño María, el gel de afinidad con 40 μ l de la solución amortiguadora Tris-HCl 62mM, 10% glicerol, 2.5% SDS, urea 8 M, pH 6.8, y se tomó una alícuota de la fracción eluida (E). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, electrotransferencia, e inmunodetección con el Ac T5-2D1. Las masas de los marcadores de peso molecular incluidos en el gel se indican en la figura. A: 0 μ l de gel. B: 0.8 μ l de gel. C: 1.6 μ l de gel. D: 3.5 μ l de gel. E: 7 μ l de gel. F: 14 μ l de gel. NU: 12.5 μ l de la fracción no unida. E: 10 μ l de la fracción eluida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otra parte en la figura 8 se observa que, a medida que va aumentando la cantidad de gel, la cantidad de ROP2 (54 kDa) presente en la fracción no unida (NU) va disminuyendo y la cantidad de ROP2 presente en la fracción eluida (E) va aumentando.

Los resultados muestran que en el caso de la matriz con 4.2 mg de Ac/ml de Sefarosa 4B-CNBr, se requieren aproximadamente entre 7 μ l y 14 μ l de gel para capturar casi toda la proteína ROP2 contenida en 50 μ l del lisado que equivale a 4 millones de taquizoitos. Lo anterior se deduce de dos hechos: ROP2 casi no se detecta en la fracción NU al emplear 7 μ l de gel y ya no es detectable en la misma cuando se utilizan 14 μ l. También se observa que al utilizar 7 μ l de gel, la proteína ROP2 puede detectarse en la fracción E pero no cuando se utilizan 14 μ l. Posiblemente en 14 μ l de gel hay un exceso de Ac en relación a la cantidad de ROP2 presente en 50 μ l del lisado, que interfiere con el desprendimiento de ROP2 al momento de la elución. Esto explicaría el hecho por el cual ROP2 no logra detectarse en la fracción eluida.

Por otra parte, las bandas de alto peso molecular (arriba de 97 kDa) observadas en la membrana de inmunotransferencia probablemente corresponden a Ac acoplado que se desprendió de la matriz de Sefarosa 4B-CNBr durante el proceso de incubación del gel con el lisado de *Toxoplasma*, y durante la elución de ROP2 de la matriz.

En general, los resultados anteriores muestran que las matrices de Ac T5-2D1 acoplado a Affigel 10 y a Sefarosa 4B-CNBr tienen capacidades similares entre sí ya que para capturar la totalidad de ROP2 presente en el lisado de 4 millones de taquizoitos se requieren 5 μ l de la primera y aproximadamente 7 μ l de la segunda. Esto concuerda con las cantidades de Ac acoplados (6.2 mg de Ac/ml de Affigel 10 y 4.2 mg de Ac /ml de Sefarosa 4B-CNBr).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Determinación de las condiciones de elución.

Una vez que se determinaron las condiciones de incubación del gel de afinidad con el lisado de *Toxoplasma* así como las capacidades de las matrices de Affigel 10 y Sefarosa 4B-CNBr, se buscó determinar las condiciones óptimas de elución de ROP2. Para esto se hicieron ensayos de adsorción-elución en lote utilizando diferentes eluyentes (Figura 9).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

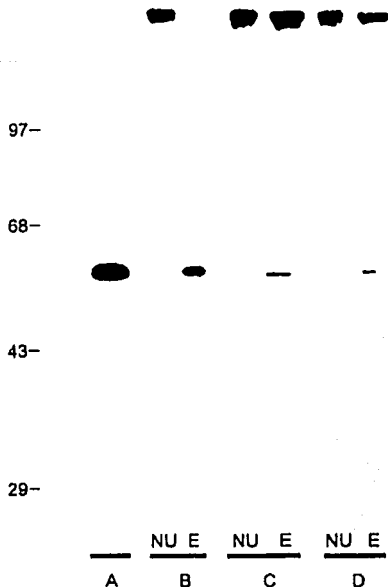


Figura 9. Elución de la proteína ROP2 del Ac T5-2D1 acoplado a Affigel 10 con diferentes eluyentes

En tubos para microfuga se pusieron a incubar 10 μ l de gel con 50 μ l de lisado preparado con SDS 0.1% (80 X 10⁶ taquizoitos/ml PBS-SDS 0.1%). Después de colectar la fracción no unida (NU) y lavar el gel varias veces, la elución se llevó a cabo incubando el gel con 40 μ l del eluyente correspondiente por 5 min. Todas las eluciones se realizaron a temperatura ambiente excepto la que se hizo con la solución amortiguadora SDS 2.5%-urea 8 M pH 6.8 que se realizó a 100°C en baño María por 5 min. De cada tubo se tomó una alícuota de 12.5 μ l de la fracción no unida (NU) y una alícuota de 10 μ l de la fracción eluida (E). Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, electrotransferencia, e inmunodetección con el Ac T5-2D1. Las masas de los marcadores de peso molecular incluidos en el gel se indican en la figura. A:12.5 μ l del lisado total. B:Elución con la solución amortiguadora SDS 2.5%-urea 8 M pH 6.8 a 100°C. C:Elución con dietilamina 100 mM pH 11.5. D:Elución con dietilamina 100 mM-dioxano 10% pH 11.5.

Como muestran los resultados, tres eluyentes tuvieron la capacidad de eluir la proteína aunque la recuperación no fuera total: la solución amortiguadora SDS 2.5%-urea 8 M pH 6.8 a 100°C, la dietilamina 100 mM pH 11.5 y la dietilamina 100 mM-dioxano 10% pH 11.5. Puede observarse que la mayor cantidad de proteína eluida se obtuvo al emplear como eluyente

la solución amortiguadora SDS 2.5%-urea 8 M pH 6.8 a 100°C. En este caso, buscando garantizar el desprendimiento de ROP2, el complejo Ag-Ac fue sometido al efecto de un detergente desnaturante de proteínas como lo es el SDS, a una elevada concentración de urea que es un potente agente caotrópico (reduce interacciones hidrofóbicas por ejemplo), así como a una alta temperatura. En vista de que estas condiciones de elución eran muy drásticas e impedían que el gel de afinidad pudiera ser reutilizado para purificaciones posteriores, se pensó en buscar otro tipo de eluyentes que permitieran el desprendimiento de ROP2 de la matriz y la reutilización de la última. Entre los eluyentes probados se encontró que la dietilamina 100 mM a un pH de 11.5 es eficiente para eluir la proteína de la matriz así como una mezcla de la misma con dioxano 10% que es un agente caotrópico. En los resultados también se observó la presencia de Ac (bandas de alto peso molecular) en todas las fracciones NU, e incluso también en las fracciones E obtenidas al emplear dietilamina 100 mM pH 11.5 y dietilamina 100 mM-dioxano 10% pH 11.5 como eluyentes. Este Ac aparentemente se desprendió de la matriz durante la incubación del gel, primero con el lisado y después con el eluyente.

7. Purificación de la proteína ROP2 por cromatografía de afinidad en una columna de Ac T5-2D1 acoplado a Sefarosa 4B-CNBr.

Una vez que se determinaron la capacidad del gel y las condiciones de elución a pequeña escala, se emplearon estos datos para llevar a cabo la purificación de la proteína en una columna abierta y de mayor volumen. Para el ensayo se utilizó la matriz Sefarosa 4B-CNBr-T5-2D1 en vista de que el gel de afinidad preparado con Affigel 10 se había agotado y a que la matriz Sefarosa 4B-CNBr-T5-2D1 había mostrado un comportamiento similar en los ensayos preliminares. En las figuras 10 y 11 se muestran respectivamente, el cromatograma de la purificación y el análisis por SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección con el Ac monoclonal T5-2D1 de la mayoría de las fracciones obtenidas.

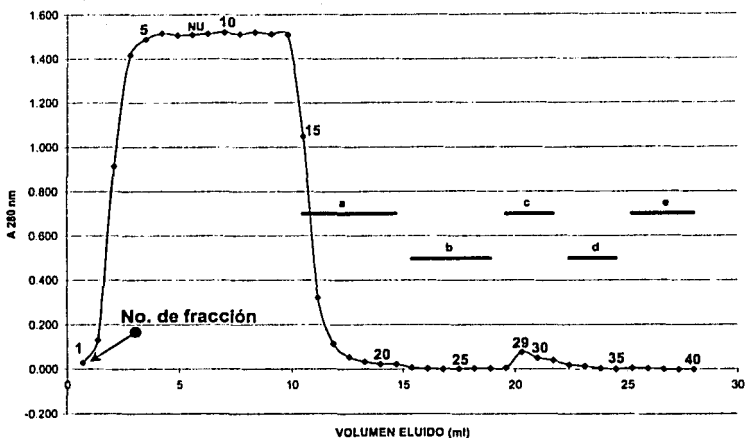


Figura 10. Cromatograma de la purificación de la proteína ROP2 de *Toxoplasma gondii* por cromatografía de afinidad con la matriz Sefarosa 4B-CNBr-T5-2D1.

Una columna (1 cm de diámetro X 1 cm de altura) con 0.700 ml de gel de afinidad (4.2 mg Ac/ml gel) se equilibró sucesivamente con 5 ml de NaCl 0.5M-SDS 0.1%, 5 ml de dietilamina 100 mM-SDS 0.1% pH 11.5, 5 ml de Tris 50mM -SDS 0.1% pH 8 y 10 ml de PBS-SDS 0.1% con un flujo de 10 volúmenes de columna por hora. Posteriormente, a temperatura ambiente y con un flujo de 5 volúmenes de columna por hora, se aplicaron 10 ml del lisado (70×10^6 taquizoitos/ml PBS-SDS 0.1%) a la matriz y se recolectaron fracciones de 0.700 ml de la fracción no unida (NU). Se lavó la matriz sucesivamente con un flujo de 10 volúmenes de columna por hora, con 5 ml de PBS -SDS 0.1% (a) y 5 ml de NaCl 0.5M-SDS 0.1% (b) colectándose fracciones de 0.700 ml, y se llevó a cabo la elución de ROP2 con 3.5 ml de dietilamina 100 mM-SDS 0.1% pH 11.5 (c) empleando el mismo flujo, colectándose fracciones de 700 μ l en tubos que contenían 100 μ l de Tris 1M pH 6.8 cada uno. Posteriormente, con un flujo de 10 volúmenes de columna por hora se lavó sucesivamente la matriz con 3.5 ml de Tris 50mM pH 8 (d) y 3.5 ml de PBS pH 7.8 + azida de sodio 0.1% (e) colectándose fracciones de 700 μ l. La absorbancia de cada una de las 40 fracciones colectadas se midió a 280 nm.

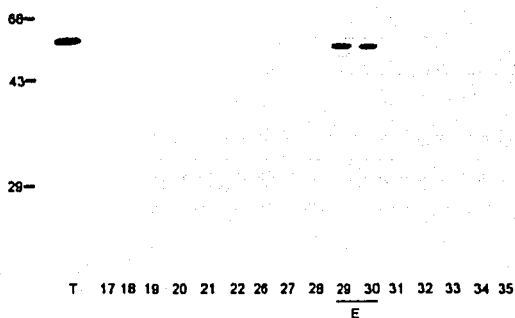
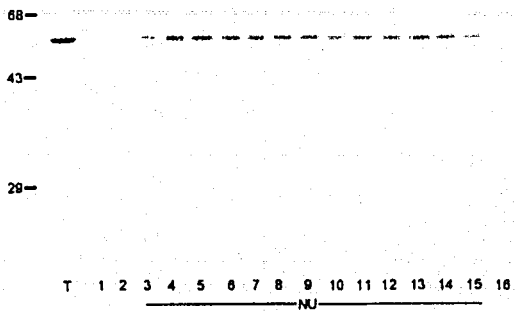


Figura 11. Análisis por inmunotransferencia de las fracciones obtenidas durante la purificación de ROP2 por cromatografía de afinidad con la matriz Sefarosa 4B-CNBr-T5-2D1.

A excepción de las fracciones 23-25 y 36-40 que mostraron entre algunas otras, una absorbancia a 280 nm igual a cero, cada una de las fracciones obtenidas durante la purificación de ROP2 de acuerdo al cromatograma de la figura 10 fue analizada posteriormente por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, electrotransferencia, e inmunodetección con el Ac T5-2D1. Las masas de los marcadores de peso molecular se indican en ambas figuras. Los números (1-35) indican el número de fracción correspondiente de acuerdo a la figura 10. NU indica las fracciones que contienen la proteína ROP2 que no fue capaz de unirse a la matriz (fracción no unida). E indica las fracciones que contienen la ROP2 eluida (fracción eluida). T:30 µl del lisado total. 1-35: 30µl del número de fracción correspondiente de acuerdo a la figura 10.

TESIS CON
FALLA DE CIEGEN

Como muestran los resultados en la figura 11, la proteína ROP2 se detectó como una única banda en las fracciones 29 y 30 del eluido al realizar el análisis por inmunotransferencia. Estas fracciones corresponden a los volúmenes de 20.3ml y 21ml respectivamente de acuerdo al cromatograma de la purificación mostrado en la figura 10. Cabe mencionar que tres purificaciones posteriores fueron realizadas reutilizando la misma matriz obteniéndose resultados similares (resultados no mostrados).

8. Determinación del rendimiento de la purificación.

Ahora bien, con el fin de determinar de manera semi-cuantitativa el rendimiento de la purificación, es decir la cantidad final de proteína ROP2 purificada en relación a la cantidad inicial de ROP2 presente en el lisado, se llevó a cabo el análisis de las imágenes de las 2 membranas de inmunotransferencia obtenidas a partir de la primera purificación realizada (Figura 11), empleando un scanner y un programa computarizado (NIH) que permite medir y transformar, para cada banda, las unidades de intensidad en píxeles en unidades de densidad óptica, donde los valores de densidad óptica son directamente proporcionales a la cantidad de ROP2 presente. En cada membrana se empleó como referencia el lisado de *Toxoplasma* (T) de concentración de taquizoitos conocida.

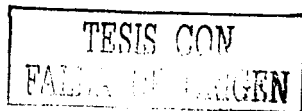
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Membrana de Inmunotransferencia 1 (Figura 11).

Muestra (30µl)	Unidades DO	No. equivalente de taquizoitos presentes en 30µl	No. equivalente de taquizoitos en la fracción
Lisado de Toxoplasma (T)	y = 10703	2.1×10^6	700×10^6
Fracción 3	2062	0.405×10^6	$x_1 = 9.439 \times 10^6$
" 4	4979	$0.977 \times "$	$x_2 = 22.791 \times 10^6$
" 5	4583	$0.899 \times "$	$x_3 = 20.979 \times 10^6$
" 6	4400	$0.863 \times "$	$x_4 = 20.141 \times 10^6$
" 7	4530	$0.889 \times "$	$x_5 = 20.736 \times 10^6$
" 8	4136	$0.812 \times "$	$x_6 = 18.933 \times 10^6$
" 9	4182	$0.821 \times "$	$x_7 = 19.143 \times 10^6$
" 10	3816	$0.749 \times "$	$x_8 = 17.468 \times 10^6$
" 11	4105	$0.805 \times "$	$x_9 = 18.790 \times 10^6$
" 12	3723	$0.730 \times "$	$x_{10} = 17.042 \times 10^6$
" 13	4679	$0.918 \times "$	$x_{11} = 21.418 \times 10^6$
" 14	3963	$0.778 \times "$	$x_{12} = 18.141 \times 10^6$
" 15	2060	$0.404 \times "$	$x_{13} = 9.430 \times 10^6$

donde:

$X_1 + X_2 + \dots + X_{13} = 234$ millones de taquizoitos correspondientes a la fracción no unida a la matriz (NU).



Membrana de inmunotransferencia 2 (Figura 11).

Muestra (30µl)	Unidades DO	No. equivalente de taquizoitos presentes en 30µl	No. equivalente de taquizoitos en la fracción
Lisado de <i>Toxoplasma</i> (T)	y' = 8685	2.1 X 10 ⁶	700 X 10 ⁶
Fracción 29	6112	1.478 X 10 ⁶	x ₁ ' = 39.400 X 10 ⁶
30	4442	1.074 X 10 ⁶	x ₂ ' = 28.634 X 10 ⁶

donde:

X₁' + X₂' = 68 millones de taquizoitos correspondientes a la fracción eluida (E)

RESUMEN

Fracción	No. equivalente de taquizoitos	%
T	700 X 10 ⁶	100
NU	234 X 10 ⁶	33.4
E	68 X 10 ⁶	9.7

Por lo que el rendimiento de la purificación es:

$$\eta = \frac{68 \text{ millones}}{700 \text{ millones}} \times 100 = 9.7 \% \text{ Rendimiento}$$

9. Determinación de la pureza antigénica de la ROP2 purificada.

Posteriormente, para comprobar la pureza antigénica de la proteína ROP2 eluida a partir de la matriz de afinidad elaborada, una muestra del eluido total que contenía la proteína (fracciones 25, 26 y 27), obtenido a partir de la tercera purificación realizada con la matriz, fue analizada por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, electrotransferencia, e inmunodetección con un Ac policlonal obtenido a partir de un ratón infectado con *Toxoplasma gondii* (Figura 12).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

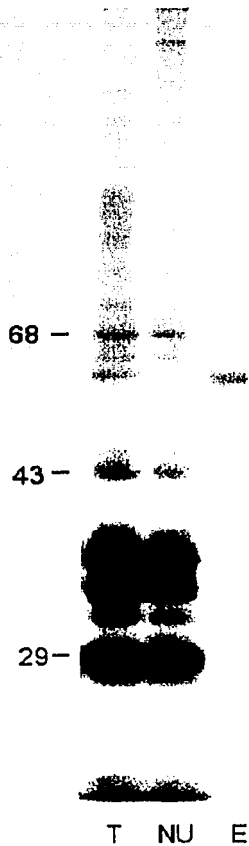


Figura 12. Comprobación de la pureza antigénica de la proteína ROP2 purificada por cromatografía de afinidad. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, electrotransferencia, e inmunodetección, empleando un Ac policlonal obtenido a partir de un ratón infectado con *Toxoplasma gondii*. Las masas de los marcadores de peso molecular incluidos en el gel se indican en la figura. T:30 μ l de lisado total (70×10^4 taquizoitos/ml). NU:30 μ l de la fracción no unida. E:12 μ l del eluido obtenido con dietilamina 100 mM-SDS 0.1% pH 11.5 (fracciones 25, 26 y 27).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados muestran que la proteína ROP2 eluida se encuentra aislada de las otras proteínas de *T. gondii* ya que una única banda de 54 kDa aparece en el carril donde se cargó el eluido. En los carriles correspondientes al lisado total y a la fracción NU pueden observarse diversas y múltiples bandas que corresponden a los diferentes antígenos de *T. gondii* reconocidos por el suero policlonal.

10. Determinación de la pureza de la ROP2 purificada por tinción con azul de Coomassie.

Por otra parte, también se demostró la pureza de la proteína ROP2 eluida, al incluir una muestra del eluido (fracciones 25, 26 y 27) en un gel de poliacrilamida que posteriormente se tiñó con azul de Coomassie (Figura 13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

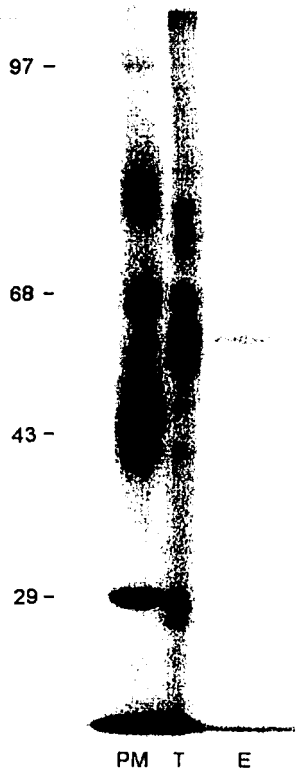


Figura 13. Comprobación de la pureza de la proteína ROP2 purificada por cromatografía de afinidad con el Ac T5-2D1 acoplado a Sefarosa 4B-CNBr.

El análisis se llevó a cabo por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie. La masa de los marcadores de peso molecular incluidos en el gel se indica en la figura. PM: Marcadores de peso molecular T: 30 μ l de lisado total (70×10^8 taquizoitos/ml) E: 75 μ l del eluido obtenido con dietilamina 100 mM-SDS 0.1% pH 11.5 (fracciones 25, 26 y 27).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados muestran una banda única de 54 kDa en el carril que contiene el eluido obtenido con dietilamina 100mM-SDS 0.1% pH 11.5, lo que demuestra que la proteína ROP2 se encuentra pura. En el carril correspondiente al lisado total se observan diversas bandas que corresponden a las diferentes proteínas presentes en el lisado.

DISCUSION

ROP2, junto con otras proteínas de roptrias, juega un papel fundamental en el proceso de invasión de la célula huésped por *Toxoplasma gondii* y facilita la estancia del parásito dentro de la célula infectada, una vez que ha sido secretada, al formar parte de la membrana de la vacuola parasitófora y permitir, como se presume, que exista un intercambio metabólico entre la célula hospedero y el parásito (Beckers et al., 1994).

Estudios previos han demostrado que la proteína ROP2 de *T. gondii* es una molécula altamente inmunogénica que se encuentra presente en los tres diferentes estadios del parásito, y que es capaz de estimular tanto la respuesta inmunológica celular como la humoral, lo cual ha dado lugar a que sea considerada como un candidato a vacuna contra la toxoplasmosis (Jacquet et al., 1999).

En los últimos años se han realizado diversos experimentos y pruebas con la intención de evaluar la inmunogenicidad de ROP2 y comprobar si realmente es capaz de conferir protección contra el parásito en animales inmunizados (Vercammen et al., 2000). Sin embargo, comprobar lo anterior no ha sido fácil. Por principio, con el objetivo de realizar algunos de estos estudios, varios intentos se han hecho por expresar a la proteína en sistemas heterólogos pero hasta el momento se ha obtenido un bajo nivel de expresión y un producto insoluble y susceptible a la degradación (Van Gelder et al., 1993).

Por otra parte, a pesar de conocerse la secuencia del precursor de la proteína y de haberla introducido en un plásmido para llevar a cabo pruebas de inmunización de ratones, no ha sido posible lograr una protección

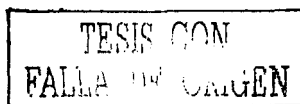
completa contra cepas virulentas del parásito (Leyva et al., 2001). Todo lo anterior nos lleva a considerar la necesidad de estudiar de manera más profunda y desde diferentes perspectivas a ROP2.

En el presente trabajo se reporta por primera vez la purificación de la forma nativa y madura de la proteína ROP2 de 54kDa de *Toxoplasma gondii* por la técnica de cromatografía de afinidad, empleando el anticuerpo monoclonal T5 2D1 acoplado a una columna de Sefarosa, el cual reconoce específicamente a la proteína (Leriche y Dubremetz, 1991).

La técnica de purificación escogida fue la cromatografía de afinidad debido a que se contaba con un anticuerpo monoclonal específico para ROP2 y a que, respecto a otras técnicas de purificación para proteínas, ésta ofrecía la ventaja de realizarse en un solo paso. Este hecho ampliaba la posibilidad de obtener un alto rendimiento en la purificación, lo cual es un punto importante si se considera que la cantidad de ROP2 presente en forma natural en los taquizoitos es mínima.

Por principio, los resultados presentados en este trabajo demostraron la inmunodetección en membrana de una banda de 54 kDa reconocida por el anticuerpo monoclonal T5-2D1 que es específico para ROP2, lo cual confirmó la presencia de la proteína madura en el lisado de taquizoitos de *T. gondii* empleado.

Posteriormente, se procedió a la extracción de ROP2 a partir de una suspensión de taquizoitos. Dado que se tenía el antecedente de que ROP2 es una proteína de membrana, su extracción se realizó empleando el detergente CHAPS al 0.6%, el cual es recomendado para solubilizar este tipo de proteínas por presentar propiedades no desnaturizantes que favorecen que la conformación natural de la proteína se mantenga. Además, este detergente ofrecía la ventaja de no interferir en la determinación de proteínas por el método de Bradford (Liscia et al., 1982). Los resultados obtenidos



mostraron que efectivamente ROP2 fue extraída en su totalidad de las membranas de los taquizoitos al ser solubilizada por el detergente mencionado (resultados no mostrados).

Sin embargo, una vez que el Ac T5 2D1 ya había sido purificado y acoplado a la columna, se pudo observar en los primeros experimentos realizados para determinar la capacidad del gel de afinidad, que la presencia de CHAPS en el lisado de taquizoitos impedía que ROP2 fuera reconocida por el Ac monoclonal. Esto se debe a que muy probablemente la conformación tridimensional adquirida por ROP2 en presencia de CHAPS 0.6% mantiene oculto el epítoto que el Ac monoclonal reconoce en la proteína. Lo anterior pudo confirmarse cuando se observó que la presencia simultánea de SDS 0.1% en el lisado, probablemente al desplazar las moléculas de CHAPS en la proteína, favorecía el reconocimiento de ROP2 por el Ac. Esto parece probable si consideramos que el SDS es un detergente desnaturante que tiene la capacidad de desdoblar a la proteína y permitir que el epítoto en ROP2 sea accesible al Ac.

El que se haya obtenido un Ac monoclonal como T5 2D1, con capacidad de reconocer un epítoto poco accesible en la proteína, puede deberse a que la fracción subcelular de *T. gondii* que se empleó para inmunizar a los ratones para producir el monoclonal, haya contenido proteínas desnaturadas y entre ellas a ROP2.

En vista de que a partir de ese momento se empleó SDS en la preparación del antígeno, no hubo posibilidad de realizar la determinación de proteínas por el método de Bradford, por tratarse de un detergente que interfiere en este tipo de medición.

Más adelante, se determinó la capacidad de la matriz elaborada con Affigel 10 y con Sepharosa 4B-CNBr, las cuales resultaron ser muy similares entre sí. La cantidad de ROP2 contenida en 4 millones de taquizoitos fue

totalmente capturada por 5 μ l de Affigel 10 con 6.2mg de Ac/ml y la misma cantidad de ROP2 fue totalmente capturada por 7 μ l de Sefarosa 4B-CNBr con 4.2 mg de Ac/ml. En otras palabras, para la matriz de Affigel 10, 0.031 mg de Ac lograron capturar la proteína contenida en 4 millones de taquizoitos y para la de Sefarosa, 0.029 mg de Ac capturaron la misma cantidad.

Posteriormente, con alícuotas del gel de afinidad se realizaron experimentos para encontrar el eluyente adecuado con el cual purificar a ROP2. Cabe mencionar que a pesar de que las condiciones de elución empleadas en algunos de estos experimentos fueron muy drásticas por el hecho de realizarse con agentes desnaturalizantes y temperatura elevada, no se detectó una alta degradación de la proteína. Lo anterior puede ser indicativo de la estabilidad de la proteína nativa madura. El eluyente con el que fue posible obtener la máxima cantidad de proteína sin afectar la integridad de la columna de afinidad fue dietilamina 100mM pH 11.5. Este se eligió entonces como el eluyente óptimo para realizar la purificación.

Finalmente, se procedió a purificar a ROP2 por cromatografía en una columna de afinidad, donde la presencia de la proteína en el eluido fue demostrada por inmunodetección al emplear el Ac monoclonal T5 2D1 el cual reconoce a la proteína ROP2 de manera específica. Posteriormente se calculó el rendimiento de la purificación el cual resultó ser aproximadamente del 9.7%. Contrariamente a lo esperado, el rendimiento obtenido resultó ser muy bajo considerando que justamente se recomienda emplear la técnica de cromatografía de afinidad cuando se desea obtener un alto rendimiento en la purificación de una proteína. Llama la atención que, a pesar de haberse empleado un exceso de antígeno con la finalidad de promover su interacción con el Ac acoplado a la matriz, y de que se demostró que aproximadamente cerca del 66% de la proteína presente en el lisado inicial se estaba uniendo a la columna, el rendimiento haya sido tan bajo. Además, cabe mencionar que ROP2 tampoco pudo ser detectada en los lavados que se realizaron a la columna antes de la elución.

Durante el desarrollo del presente trabajo, en repetidas ocasiones también se observó un bajo rendimiento en los ensayos de adsorción-elución en lote realizados con el gel de afinidad (datos no mostrados). Los autores que han reportado resultados similares para las columnas de sefarosa (Tercero et al., 1988), han concluido que tanto la matriz como el ligando están involucrados en la formación de uniones inespecíficas, las cuales pueden disminuir al emplear altas concentraciones de pequeñas aminas primarias en los lavados realizados a las columnas después de la reacción de acoplamiento. En base a esta información, existe la posibilidad de que ROP2 se esté uniendo al Ac y tal vez de una manera inespecífica e irreversible, también al gel de afinidad. Esto explicaría la dificultad que se tuvo para eluir el resto de la proteína en muchos de los ensayos. En nuestro caso, cada vez que se reutilizaba la columna para realizar una nueva purificación, había que bloquear nuevamente el gel de afinidad con etanolamina 100 mM pH 9.5 por 72 horas para no tener problemas al momento de eluir la proteína.

Por otra parte también se considera la posibilidad de que la causa por la cual ROP2 se pudiera estar adhiriendo irreversiblemente a la columna de afinidad esté relacionada con la naturaleza propia de la proteína y no sólo con el procedimiento de la técnica de purificación. Existe la posibilidad, por ejemplo, de que los dominios hidrofóbicos expuestos en la proteína desnaturalizada, pudieran estar favoreciendo su adherencia al Ac o matriz de manera inespecífica e irreversible.

Finalmente, también se demostró la pureza antigénica de ROP2 al encontrarse una única banda por inmunotransferencia en el eluido obtenido. Esta banda fue detectada por un suero policlonal proveniente de un ratón infectado con la cepa no virulenta de *T. gondii* K76. Ninguna otra proteína del parásito se detectó en la fracción eluida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Asimismo se demostró la pureza de ROP2 al incluir parte del eluido en un gel y realizar una tinción para proteínas con azul de Coomassie. Aquí también solamente se identificó una única banda la cual también corresponde a ROP2. Otras maneras de comprobar su pureza podrían haber incluido métodos más sofisticados como el análisis de aminoácidos y análisis por espectrometría de masas, entre otros.

Como conclusión, podemos afirmar que la purificación de la proteína ROP2 nativa resulta importante, ya que ofrece la oportunidad de realizar más pruebas que permitan caracterizar desde otra perspectiva la inmunología de ROP2 y por lo tanto de *Toxoplasma gondii*.

PERSPECTIVAS

En vista de que se ha comprobado que el tipo y fuerza de la respuesta inmune depende en gran medida de la naturaleza misma del antígeno (Milich et al., 1997), podrían realizarse experimentos de inmunización con ROP2 que consideraran la secuencia de la forma madura de la proteína que es como se encuentra en forma natural en las roptrias del parásito.

Se ha mencionado que la secuencia completa del precursor (64 kDa) de ROP2 es conocida, a pesar de que no ha sido posible identificar la secuencia de la forma madura de la proteína (54 kDa), la cual carece de la secuencia señal y de 70 a 80 aminoácidos adicionales. Aún se desconoce si la pérdida de estos aminoácidos adicionales se lleva a cabo en el extremo amino o carboxilo terminal, o en ambos extremos de la secuencia del precursor. En primera instancia, la secuenciación del extremo amino terminal de la proteína nativa pura por el método de Edman podría brindar parte de esta información. En caso de que el extremo amino terminal de la proteína estuviera bloqueado, tal vez lo más conveniente sería analizarla por espectrometría de masas.

Una vez conocida su secuencia, la proteína madura probablemente podría expresarse en *E. coli* como una proteína recombinante estable (a diferencia de su precursor) que presentara las mismas propiedades inmunológicas de carácter protector que se presume tiene la proteína nativa y las cuales aún faltan también por determinarse. De esta manera, tanto la proteína nativa pura y la proteína madura recombinante podrían emplearse, entre otros ensayos, para realizar una evaluación de la respuesta inmunológica generada hacia ambos antígenos por individuos infectados con *T. gondii*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otra parte, en el caso de la inmunización genética en ratones, sería interesante evaluar el tipo de respuesta que la secuencia de la proteína madura es capaz de inducir al estar incluida en un plásmido.

En cualquiera de los casos, la purificación de la proteína madura resulta necesaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APENDICE I

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

1. Selección del Ligando.

Al seleccionar un ligando deben considerarse los siguientes puntos:

- a) Idealmente el ligando debe reconocer solamente a la proteína que se pretende purificar. Incluso es mejor considerar un ligando de alta especificidad como es el caso de un anticuerpo monoclonal que reconoce solamente a un epítipo en particular, presente en la proteína.
- b) El ligando debe formar un complejo reversible con la proteína de interés, de tal manera que el complejo sea resistente a los procesos de lavado con soluciones amortiguadoras que se lleven a cabo durante la purificación. Asimismo el complejo debe ser fácilmente dissociable al aplicar una condición fisicoquímica particular o exceso de ligando libre, con el fin de no recurrir a condiciones desnaturizantes para lograr la elución de la proteína.
- c) El ligando debe ser estable bajo las condiciones a las que se pretende inmovilizar y utilizar. Esto quiere decir que debe ser resistente a la proteólisis y a la desnaturización causada por eluyentes y agentes limpiadores.
- d) El ligando debe ser de preferencia grande para que contenga un número suficiente de grupos que puedan interactuar con la proteína, obteniéndose así la estereoselectividad y afinidad adecuadas. Además el ligando debe poseer un grupo funcional que le permita ser inmovilizado sin afectar su unión a la proteína. En caso de que el ligando sea tan pequeño que la matriz interfiera en su acceso a las proteínas, es recomendable interponer una molécula espaciadora o brazo espaciador entre el ligando y la matriz, que permita que el ligando quede expuesto a la proteína. Por otra parte, si el ligando es muy grande, puede ser

susceptible a la desnaturalización o degradación, y dar lugar a interacciones inespecíficas uniéndose a otros sitios de la proteína o bien a otras proteínas.

2. Selección de la matriz

Un ligando de afinidad se inmoviliza en un soporte o matriz por medio de uno o más enlaces covalentes. La eficiencia del ligando inmovilizado en un proceso de purificación, dependerá en gran parte de la estructura de la matriz. Es importante por lo tanto considerar los siguientes puntos:

- a) La matriz debe tener un alto grado de porosidad de tal manera que las proteínas grandes puedan tener acceso al ligando inmovilizado en las porciones interiores del soporte.
- b) La matriz debe ser químicamente estable bajo las condiciones utilizadas para la activación y acoplamiento del ligando y bajo aquéllas empleadas durante su operación y regeneración. Al haber estabilidad química la estructura de la matriz se mantendrá íntegra y se minimizarán los problemas de contaminación de la mezcla proteica.
- c) La matriz debe tener una alta estabilidad mecánica para que sea posible maximizar el flujo de las soluciones que pasan a través de ella y resista casi cualquier tipo de movimiento sin desintegrarse.
- d) La matriz debe ser capaz de soportar el rango de pH y temperatura empleados durante la activación y acoplamiento del ligando y durante su operación y regeneración.
- e) La matriz debe ser fácilmente activable para acoplar ligandos a una alta densidad y ser inerte a uniones no específicas de proteínas.
- f) Las propiedades particulares de la matriz no deben alterarse durante su funcionamiento.
- g) La matriz debe tener una estructura uniforme, para que las moléculas de ligando queden homogéneamente distribuidas.

Estudios comparativos de diferentes soportes demuestran que generalmente las proteínas son purificadas con éxito en matrices de agarosa. La agarosa es un polisacárido obtenido a partir del agar el cual es un componente presente en las algas. Está constituida de cadenas poliméricas del disacárido agarobiosa (D-galactosa y 3,6-anhidro-1-galactosa) y forma estructuras o geles hidrofílicos muy porosos. Una ventaja de este tipo de matriz es que presenta una mínima adsorción no específica. Actualmente existen matrices preactivadas que pueden conseguirse comercialmente (Figura 14).

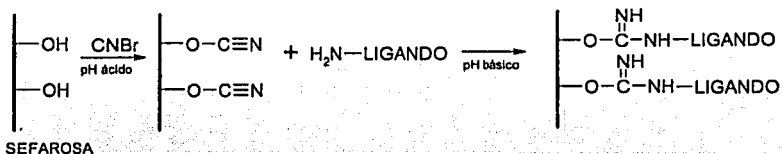


Figura 14. Estructura química de la Sefarosa 4B-CNBr.

3. Brazo Espaciador

Como ya se ha mencionado, el brazo espaciador puede ser de utilidad para distanciar el ligando de la matriz cuando el ligando sea tan pequeño que resulte inaccesible a las moléculas de proteína que se encuentran en solución. Una molécula espaciadora también puede ser de utilidad en casos donde el ligando sea inmovilizado a través de un sitio cercano a su sitio de unión, de tal manera que su interacción con la proteína se vea impedida.

La longitud del brazo espaciador es crucial y debe ser determinada empíricamente. El número recomendable de grupos metileno que deben conformar el brazo espaciador son entre 6 y 8. La molécula espaciadora

debe ser hidrofílica y no unir por sí misma proteínas, ya sea por su hidrofobicidad o por sus grupos cargados.

Actualmente se aprovecha la ventaja de que existen reacciones químicas de activación que automáticamente insertan un brazo espaciador entre la matriz y el ligando. También existen matrices comerciales que ya cuentan con brazo espaciador (Figura 15).

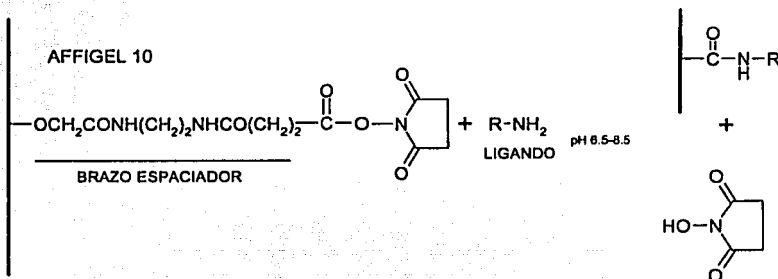


Figura 15. Estructura química del Affigel 10.

4. Inmovilización del ligando

Previamente a la inmovilización del ligando, la matriz inerte debe activarse mediante el uso de agentes químicos que generen grupos reactivos en su superficie, los cuales tengan la capacidad de unirse covalentemente al ligando sin afectar su naturaleza y funcionalidad. Entre los agentes químicos de mayor uso se encuentran el bromuro de cianógeno, los bis oxiranos, el carbonil diimidazol, los haluros de sulfonilo y la triazina, los cuales reaccionan con los grupos hidroxilo de los polisacáridos formando derivados estables capaces de reaccionar con los grupos químicos del ligando.

La reacción de acoplamiento con el ligando es particular para cada caso y va a depender principalmente del tipo de grupos químicos que se hayan generado en la matriz y de los que presente el ligando. Tanto para la reacción de activación de la matriz como para la reacción de acoplamiento del ligando, deberán seleccionarse agentes limpiadores y soluciones amortiguadoras con valores de pH que favorezcan las reacciones deseadas. Asimismo, después de haber acoplado el ligando, deberán bloquearse los grupos activos remanentes en la matriz añadiendo compuestos de bajo peso molecular. El agente bloqueador más utilizado es la etanolamina 1M ajustada a un pH de 8 e incubada con la matriz a temperatura ambiente por una hora.

5. Determinación de las condiciones de adsorción

La solución amortiguadora escogida para realizar la adsorción de una proteína a una columna de afinidad debe permitir la formación estable del complejo ligando-proteína. En algunos casos la adición de iones metálicos divalentes o factores específicos, puede favorecer la conformación de la proteína y ayudar a reforzar la interacción existente entre ésta y el ligando. Otra manera de mejorar la afinidad del ligando por la proteína es incrementar la cantidad de ligando inmovilizado, lo cual se logra aumentando la cantidad y concentración de ligando durante la etapa de acoplamiento. También otra alternativa es aumentar el tiempo de incubación en la reacción de acoplamiento.

6. Determinación de las condiciones de lavado

En caso de que el complejo ligando-proteína sea de alta afinidad, éste se mantendrá probablemente estable bajo las condiciones de lavado cuya función es eliminar las proteínas unidas inespecíficamente a la columna. Las soluciones amortiguadoras utilizadas en el lavado deben poseer propiedades intermedias en cuanto a molaridad, pH, etc., que se encuentren entre las de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la solución con la que se alcanza una adsorción óptima y las de la solución utilizada para eluir la proteína. De esta manera, dentro de este rango se podrán descubrir condiciones óptimas de lavado para purificar la proteína de interés.

7. Determinación de las condiciones de elución

La elución de una proteína unida a un ligando en una columna, se efectúa cambiando con un eluyente las condiciones del medio en las que se encuentra el complejo, de tal manera que la afinidad del ligando por la proteína disminuya. En caso de que se requiera de la proteína activa, este tratamiento no debe causar la desnaturalización irreversible de la misma, ni la del ligando en caso de que se pretenda reutilizar la columna. La alteración de las fuerzas (hidrofóbicas, iónicas, etc.) que mantienen unido al complejo puede conseguirse de diferentes maneras: por variación de la fuerza iónica; por variación del pH; por la presencia de agentes caotrópicos (tiocianato de potasio 3M, yoduro de potasio 2M o cloruro de magnesio 4M); por la adición de agentes desnaturalizantes (urea 8M y guanidina-HCl 6M), en caso de que no se requiera de la proteína activa ni de la reutilización de la columna como se mencionó anteriormente; y entre otros, por la presencia de agentes reductores de la polaridad (dioxano y etilenglicol).

APENDICE II

PROCEDIMIENTOS

1. Purificación de anticuerpos monoclonales de ratón a partir de líquido ascítico

1.1. Soluciones y resina

- Solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS pH 7.8): NaCl 150mM + $\text{NaH}_2(\text{PO})_4$ 10mM pH 7.8
- Solución amortiguadora A: Tris HCl 20 mM + NaCl 40 mM pH 7.8
- Solución amortiguadora B: Tris HCl 20 mM + NaCl 20 mM pH 7.8
- Solución amortiguadora C: Tris HCl 20 mM + NaCl 400 mM pH 7.8
- Solución amortiguadora D: Tris HCl 20 mM pH 7.8
- Solución saturada de sulfato de amonio.
- DEAE-Celulosa (DE52 microgranular, preswollen, Whatman). Se suspendió la resina en la solución amortiguadora B y se decantó eliminando las partículas finas. Se repitió varias veces el proceso y se conservó a temperatura ambiente en una suspensión aproximadamente al 25%, adicionando azida de sodio al 0.1% final.

1.2. Precipitación del anticuerpo

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C (en hielo).

- A 4 ml de líquido de ascitis se agregaron 12 ml de PBS pH 7.8 (dilución 1/4). Esto fue centrifugado 30 min a 100,000 x g en un tubo de nitrocelulosa.
- Por medio de una aguja insertada en la parte lateral del tubo, se recuperó la fase acuosa, descartando el botón inferior y la fase lipídica superior.
- A la fase acuosa se agregó, lentamente y con agitación, un volumen igual de la solución de sulfato de amonio saturada y se dejó sobre el hielo una hora.
- Posteriormente se centrifugó a 12,500 x g por 15 min a 4°C en un tubo COREX.

-Se descartó el sobrenadante y se redisolvió el botón en aproximadamente 4 ml de la solución amortiguadora A.

-Se transfirió a una bolsa de diálisis previamente hervida en agua bidestilada y se dializó contra 100 volúmenes de la solución B sin agitación a 4°C. Se cambió la solución de diálisis 2-4 horas después y se continuó la diálisis durante una noche a 4°C.

-Se centrifugó a 12,500 x g a 4°C durante 15 min en un tubo COREX y se transfirió el sobrenadante a una probeta. Se midió el volumen y se hizo una dilución 1/20 de una alícuota para medir la densidad óptica a 280 nm. (unidades de Abs a 280 / 1.25 = mg de proteínas).

1.3. Purificación del anticuerpo por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa DE52

-Se montó la columna a temperatura ambiente considerando 1 ml de resina por cada 5 mg de proteína (2.5 ml de resina por cada ml de ascitis) bajo una presión hidrostática de 40 cm empleando la solución B. Se equilibró primero con 5 volúmenes de solución B con azida de sodio al 0.1% y después a 4°C.

-Se conectó la columna a la bomba peristáltica.

-Se diluyó la muestra con un volumen igual de solución D y se aplicó a la columna con un flujo de 1 volumen de columna por hora.

-Se colectaron fracciones cada 12 minutos.

-Se lavó la columna con 2 volúmenes de solución B.

-Se eluyó con un gradiente de soluciones B y C empleando un volumen total de gradiente de 10 volúmenes de columna.

-Se midió la densidad óptica a 280 nm de las fracciones. Se juntaron las fracciones del pico y se llevó la concentración de NaCl a 150 mM. Se midió la densidad óptica a 280 nm del conjunto de fracciones del pico (unidades de Abs a 280nm/ 1.4 = mg de inmunoglobulinas).

2. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida no desnaturalizante

2.1. Soluciones

- A: Acrilamida 30 % + Metilbis-acrilamida 0.8 %
- B: Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 + Temed 0.23 %
- C: Persulfato de amonio 0.14 %
- D: Tris-HCl 0.05 M + Glicina 0.384 M pH 8.3.
- solución para la muestra: Se mezclaron 2 ml de solución B, 6 ml de glicerol al 10% y 20 μ l de azul de bromofenol al 1%.
- solución de electrodos: Se diluyó 1:2 la solución D al volumen necesario.
- solución para teñir gel: Se disolvió azul de Coomassie G250 al 0.04% (p/v) en HClO₄ al 3.5%. La solución se agitó 1 hora a temperatura ambiente y fue filtrada después. Se conservó a temperatura ambiente.

2.2. Procedimiento

Se mezclaron 10 ml de la solución A y 10 ml de la solución B, se desgasificó con vacío y se agregaron 20 ml de la solución C recién preparada. Se vació la mezcla entre las dos placas de vidrio de la cámara de 12 X 15 cm c/u. Se colocó el peine y se dejó polimerizar. El gel quedó a una concentración final de 7.5% de acrilamida y 0.2% de bis-acrilamida. Posteriormente, se colocaron las placas de vidrio con el gel dentro de la cámara de electroforesis y ésta se llenó con la solución de electrodos. Se aplicaron en diferentes carriles del gel las muestras problema y el líquido de ascitis diluidos 1:4 en la solución para muestras, y se corrió el gel a un voltaje constante de 200 volts. Una vez terminada la electroforesis, se tiñó el gel con Coomassie G250 al 0.04% por 3 horas y se destiñó después con ácido acético al 10%.

3. Acoplamiento del anticuerpo monoclonal al gel de afinidad

3.1. Acoplamiento del anticuerpo monoclonal a Affigel 10

Tal como recomienda el proveedor, se lavó 1 ml de Affigel 10 con una solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM pH 4.5 a 4°C sin dejar secar la resina. Posteriormente, se agregaron al Affigel 10 mg del anticuerpo monoclonal purificado disuelto en 3.2 ml de una solución amortiguadora de NaHCO₃ 0.1M pH 8 y se llevó a cabo la reacción de acoplamiento durante 4 horas a 4°C con agitación. Se centrifugó la suspensión a 500 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280nm, cuidando antes ajustar el pH a 2 para evitar que la hidrosuccinimida liberada durante la reacción interfiriera en la medición. Una vez determinada la cantidad de Ac presente en el sobrenadante, se calculó por diferencia el rendimiento del acoplamiento. Después, el gel acoplado fue bloqueado en agitación con etanolamina 100 mM pH 8 por 1 hora a 4°C y transferido a una columna. La columna fue lavada con PBS pH 7.8 y guardada a 4°C en PBS pH 7.8 + azida de sodio 0.1 % para su uso posterior.

3.2. Acoplamiento del anticuerpo monoclonal a Sefarosa-4B activada con CNBr

De acuerdo a las indicaciones del proveedor, se incubaron 0.4 g de Sefarosa-4B-CNBr con 40 ml de HCl 0.1M por 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, se recuperó el gel (1.4 ml) por filtración y éste se equilibró con una solución amortiguadora de NaHCO₃ 0.1M-NaCl 1M pH 8, y se puso inmediatamente en contacto con 6.8 mg de anticuerpo monoclonal disuelto en 3 ml de una solución amortiguadora de NaHCO₃ 0.1M-NaCl 1M pH 8 en una relación de 4.85 mg de Ac/ml de gel. La reacción de acoplamiento se realizó a 4°C por 4 horas en agitación

continua. La suspensión obtenida se centrifugó a 500 rpm y al sobrenadante se le midió la absorbancia a 280nm. Una vez determinada la cantidad de Ac presente en el sobrenadante, se calculó por diferencia el rendimiento de la matriz. Por otra parte, el gel ya acoplado fue bloqueado con etanolamina 100 mM pH 9.5 por 72 horas a 4°C y ligera agitación. Este fue transferido posteriormente a una columna y se lavó con PBS pH 7.8. Se guardó a 4°C en PBS pH 7.8 + azida de sodio 0.1% para su uso posterior.

4. Obtención del lisado de *Toxoplasma*

4.1. Cultivo de parásitos

Como fuente de proteína para realizar la purificación de la forma madura de ROP2, se utilizaron taquizoitos de la cepa Wiktor (Saavedra et al., 1990) de *Toxoplasma gondii*. Inicialmente, los taquizoitos se cultivaron *in vivo* en ratones Balb/c, haciendo pases seriados del parásito (cada 2 días) en la cavidad peritoneal de los ratones. Posteriormente estos taquizoitos fueron utilizados para infectar monocapas de células VERO *in vitro*. Después de la lisis espontánea de las células hospedero, los taquizoitos extracelulares fueron recolectados y lavados varias veces con PBS por resuspensión y centrifugación. Finalmente, los taquizoitos fueron suspendidos en PBS ajustando la concentración a 1000×10^6 taquizoitos/ml PBS pH 7.8. La suspensión se congeló a -70°C en alícuotas de 100 μ l hasta el día de su uso.

4.2. Preparación del lisado de *Toxoplasma*

A la suspensión de taquizoitos preparada en PBS pH 7.8 se agregó SDS al 10% (p/v) hasta obtener una concentración final del 1.25%. Después, la suspensión se incubó en baño María por 10 min en ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, ésta se diluyó con PBS pH 7.8 para llevar la concentración final de SDS al 0.1%. Simultáneamente, se agregaron a la suspensión inhibidores de proteasas (Leupeptina 0.01mg/ml, Aprotinina 0.1mg/ml, PMSF 1mM/isopropanol, EDTA 2mM). En seguida, la mezcla fue centrifugada por 30 min a 10 000 x g y a temperatura ambiente

para eliminar el material insoluble. El sobrenadante obtenido constituyó el lisado de *Toxoplasma*.

Para algunos ensayos preliminares se incluyó en el lisado, además de SDS al 0.1%, otros detergentes como CHAPS al 0.6% o Tritón X-100 al 0.6%. Salvo estas modificaciones, el método a seguir fue el mismo.

Por otra parte, en algunos experimentos se utilizó como lisado de *Toxoplasma* un sonicado de taquizoitos. Este sonicado se obtuvo al aplicar a una suspensión de taquizoitos (ajustada a 200×10^6 taquizoitos/ml PBS), a 4°C y en presencia de PMSF 100mM y CHAPS al 0.6%, 10 pulsos de 50 Watts de 30 seg cada uno. El sonicado, con un volumen total de 2.5 ml, fue posteriormente centrifugado a 150 000 x g por 30 min a 4°C, y se tomó una muestra del sobrenadante y otra del botón de material insoluble después de ser resuspendido en 2.5 ml de PBS pH 7.8.

5. Método de adsorción-elución en lote.

Procedimiento general

Se colocó en un tubo de polipropileno de 1.5 ml con fondo cónico para microfuga, una alícuota del gel activado con el Ac T5-2D1 (Affigel 10 ó Sefarosa-4B CNBr). La matriz o gel se lavó y equilibró varias veces por resuspensión y centrifugación con PBS-SDS 0.1% y se incubó con una alícuota del lisado de *Toxoplasma* por 2 horas en agitación. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 8000 rpm (3917.5 x g) por 4 min y se tomó una alícuota del sobrenadante o fracción no unida (NU). La alícuota se preparó después para electroforesis al hervirse por 5 min en baño María con la solución amortiguadora para muestras SIN MERCAPTOETANOL (62 mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2.5% SDS, 0.005% azul de bromofenol, pH 6.8). Por otra parte, el gel contenido en el tubo se lavó varias veces por resuspensión

en PBS-SDS 0.1% y centrifugación, y fue finalmente resuspendido en el eluyente correspondiente. Después de una incubación de 5 min con agitación, el tubo se centrifugó a 8000 rpm (3917.5 x g) por 4 min y se tomó una alícuota del sobrenadante o fracción eluida (E). Esta alícuota se preparó después para electroforesis al hervirse por 5 min en baño María con la solución amortiguadora para muestras SIN MERCAPTOETANOL. Cabe mencionar que todos los procesos de lavado, de incubación con el lisado de *Toxoplasma* y de elución, se llevaron a cabo a temperatura ambiente salvo en los casos en que se especifique lo contrario. En la mayor parte de los ensayos, las muestras se prepararon con la solución amortiguadora SIN MERCAPTOETANOL antes de incluirse en el gel de corrida. Sin embargo, hubo ensayos iniciales en los que las muestras se prepararon con la solución amortiguadora para muestras CON MERCAPTOETANOL (62 mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2.5% SDS, 5% mercaptoetanol, 0.005% azul de bromofenol, pH 6.8). La solución amortiguadora empleada se indica en cada caso.

6. Purificación de la proteína ROP2 de *Toxoplasma gondii* por cromatografía de afinidad en una columna de Sefarosa-4B CNBr

-La columna (1 cm de diámetro X 2 cm de altura) de 1.4 ml de gel (anticuerpo T5-2D1 acoplado a Sefarosa-4B-CNBr) se montó a temperatura ambiente bajo una presión hidrostática de 40 cm.

-Se lavó sucesivamente con 7 volúmenes de NaCl 0.5M, 7 volúmenes de dietilamina 100 mM pH 11.5-SDS 0.1%, 7 volúmenes de Tris 50 mM pH 8 y finalmente con 14 volúmenes de PBS-SDS 0.1%, con un flujo de 10 volúmenes de columna por hora.

-El lisado de *Toxoplasma* contenido en 20 ml de PBS-SDS 0.1% (70×10^6 taquizoitos/ml), se aplicó a la columna con un flujo de 5 volúmenes de columna por hora y se colectaron fracciones cada 12 minutos a temperatura ambiente.

-Se lavó la matriz sucesivamente con 7 volúmenes de NaCl 0.5M -SDS 0.1% y 7 volúmenes de Tris 10mM-SDS 0.1% pH 8, con un flujo de 10 volúmenes de columna por hora y se colectaron fracciones cada 6 minutos.

-La elución se llevó a cabo con 5 volúmenes de dietilamina 100mM -SDS 0.1% -leupeptina 0.01mg/ml -aprotinina 0.1mg/ml -PMSF1mM/isopropanol - EDTA 2mM pH 11.5 con un flujo de 10 volúmenes de columna por hora. Se colectaron fracciones cada 6 minutos y en los tubos donde se recibió cada una, previamente se colocaron 100 µl de Tris 1M pH 6.8 para neutralizar el pH.

-La matriz se lavó con 5 volúmenes de Tris 50 mM pH 8 con un flujo de 10 volúmenes de columna por hora colectando fracciones cada 6 minutos y finalmente se equilibró en PBS pH 7.8 + azida de sodio 0.1 % para su conservación a 4°C.

Cabe mencionar que siempre antes de reutilizar la matriz para una siguiente purificación, ésta se rebloqueó con etanolamina 100 mM pH 9.5 por 72 horas a 4°C (Tercero y Díaz Mauriño,1988).

7. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se llevó a cabo por el sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli,1970). Cada corrida incluyó la preparación de un gel separador de poliacrilamida al 10% y un gel concentrador al 3%. Como marcadores de peso molecular se utilizaron: cadena H de miosina [200 kDa], fosforilasa b [97.4 kDa], albúmina sérica bovina (BSA) [68 kDa], ovalbúmina [43 kDa], anhidrasa carbónica [29 kDa], beta-lactoglobulina [18.4 kDa] y lisozima [14.3 kDa]. Salvo que se indique lo contrario, todas las muestras se cargaron en el gel después de ser hervidas por 5 min en baño María, junto con la solución amortiguadora para muestras

SIN MERCAPTOETANOL (62mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2.5% SDS, 0.005% azul de bromofenol, pH 6.8)

8. Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con azul de Coomassie

-Una vez concluida la electroforesis, se colocó el gel de poliacrilamida en un recipiente con tapa y se lavó con 100 ml de solución fijadora (ácido acético 5% -metanol 10%) por 15 min a 55°C agitando ligeramente.

-Se retiró la solución y se agregaron 100 ml de solución fijadora nueva y 10 ml de solución al 1% de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R250). Se incubó a 55°C por 20 min con ligera agitación.

-Se retiró la solución y se agregaron 100 ml de solución de enjuague (ácido acético 7%). Se incubó a 55°C con agitación y se cambió periódicamente esta solución por solución de enjuague nueva, hasta que el gel quedara desteñido y se distinguieran las bandas de interés.

9. Transferencia electroforética.

La transferencia electroforética se realizó como a continuación se describe:

-Una vez terminada la electroforesis el gel se lavó 2 veces brevemente con agua bidestilada y 3 veces por 15 min con la solución amortiguadora de lavado (Tris 25 mM - Glicina 192mM pH 8.3).

-Se mojaron las fibras y la membrana para transferencia en una charola con suficiente solución amortiguadora de transferencia desgasificada (Tris 25mM - Glicina 192mM - Metanol 20% pH 8.3) a temperatura ambiente.

-Se llenó la cámara de transferencia (Bio-Rad) con solución amortiguadora de transferencia desgasificada y equilibrada a 4°C y se colocó un agitador magnético dentro de la cámara. Se conectó el refrigerante a la fuente de agua fría.

-En otra charola con solución amortiguadora de transferencia, se colocó sucesivamente y evitando la formación de burbujas lo siguiente:

- 1) rejilla plástica
- 2) fibra
- 3) el papel para blot
- 4) membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham) previamente equilibrada en solución amortiguadora de transferencia.
- 5) gel
- 6) papel Whatman, previamente equilibrado en solución amortiguadora de transferencia.
- 7) fibra
- 8) rejilla plástica

Se transfirió rápidamente el paquete a la cámara de transferencia de manera que la membrana de nitrocelulosa quedara del lado del ánodo. Cuando fue necesario, se llenó la cámara con más solución amortiguadora de transferencia hasta cubrir el cassette y los electrodos. Se conectó la unidad cuidando de poner los electrodos en posición correcta. Se transfirió a 90 volts por 2 horas (Nota: la solución amortiguadora de transferencia puede ser reutilizada 2-3 veces si se guarda a 4°C.).

10. Tinción de proteínas con Rojo Ponceau

La tira de nitrocelulosa correspondiente al carril con marcadores de peso molecular, se cortó y se tiñó con Rojo Ponceau 0.3% en ácido tricloroacético al 3% por 30 min. Se enjuagó con ácido acético al 10%.

11. Inmunodetección de antígenos transferidos a nitrocelulosa.

La membrana fue bloqueada por incubación con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en solución amortiguadora de lavado TNT (NaCl 150mM + Tris-HCl 10mM + Tween 20 0.05% pH 8) por 2 horas a temperatura ambiente. Después, la membrana se puso en contacto con el anticuerpo monoclonal T5-2D1 contenido en líquido de ascitis, el cual se diluyó 1:100,000 en TNT-BSA 1% y se incubó con la membrana por 2 horas a temperatura ambiente o una noche a 4°C con agitación. Una vez realizados los lavados con TNT, el anticuerpo unido fue revelado con un segundo anticuerpo anti-Ig de ratón, producido en cabra y marcado con fosfatasa alcalina. Este fue diluido 1:10,000 en TNT-BSA 1% y la incubación se realizó por 2 horas a temperatura ambiente, con agitación y en la oscuridad. Después de lavar varias veces la membrana con TNT también en la oscuridad, se agregó el sustrato cromogénico azul de nitro tetrazolio (NBT) al 0.033% y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) al 0.016% en una solución amortiguadora para sustrato (Tris 100mM -NaCl 100mM -MgCl₂ 5mM pH 9.5), y se detuvo la reacción a los 10 min lavando la membrana con EDTA 5mM y posteriormente con agua bidestilada.

En algunos experimentos, en vez de utilizar el Ac T5-2D1 contenido en el líquido de ascitis para realizar la inmunodetección de la proteína ROP2 en la membrana de nitrocelulosa, se empleó el suero de un ratón infectado con la cepa no virulenta K76 de *T. gondii*, el cual se diluyó 1:5000 en TNT-BSA 1% y se incubó con la membrana por 2 horas a temperatura ambiente y con agitación.

BIBLIOGRAFIA

- Achbarou, A., Mercerau-Puljalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D. and Dubremetz, J. F. 1991. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **103**:321-329.
- Ajioka, JM., Fitzpatrick, JM., and Reitter, CP. 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Exp. Rev. Mol. Med.* January 6, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002204h.htm>
- Beckers, J. M., Dubremetz, J. F., Mercereau Pujalon, O., and Joiner, K. A. 1994. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell. Biol.* **127**:947-961.
- Blackman, M.J. and Bannister, L.H. 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **117**:11-25.
- Bradley, P.J. and Boothroyd, J.C. 1999. Identification of the pro-mature processing site of *Toxoplasma* ROP1 by mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* **100**: 103-109.
- Bradley, P. J. and Boothroyd, J.C. 2001. The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry- targeting signal. *Int. J. Parasitol.* **31**:1177-1186.
- Bulow, R. and Boothroyd, J. C.1991. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J. Immunol.***147**:3496-3500.
- Carruthers, V.B. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica* **81**:111-122.
- Crewther, P. E., Culvenor, J. G., Silva, A., Cooper, J. A., and Anders, R. F. 1990. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp. Parasitol.* **70**:193-206.
- Dannemann, B., McCutchan, J. A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., and Chiu, J. 1992. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial

comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann. Intern. Med.* **116**:33-43.

-Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V. and Capron, A. 1988. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **10**:553-567.

-Debrabant, A., Maes, P., Delplace, P., Dubremetz, J. F., Tartar, A., and Camus, D. 1992. Intramolecular mapping of *Plasmodium falciparum* P126 proteolytic fragments by N-terminal amino acid sequencing. *Mol. and Biochem. Parasitology.* **53**:89-96.

-Dubremetz, J. F., Sadak, A., Taghy, Z. and Fortier, B. 1987. Characterization of a 42 kDa rhoptry antigen of *Toxoplasma gondii*. In: *Host-parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections*, (Chang, K. P. and Snary, D. eds), pp.365-369, Springer Verlag, Berlin.

-Dubremetz, J.F., García-Reguet, N., Conseil, V., and Fourmaux, M.N. 1998. Apical organelles and host invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* **28**:1007-1013.

-Dubey, J.P. 1993. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: *Parasitic Protozoa*, ed. Kreier JP, 2nd ed, vol 6, Academic Press, San Diego. pp. 5-57.

-Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:267-299.

-Dubey, J.P., and Frenkel, J.K. 1972. Cyst – induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* **19**:155-177.

-Ferguson, D. J., and Hutchison, W. M. 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* **73**:483-491.

-Frenkel, J. K. 1967. Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* **98**:1309-1319.

- Freyre, A., Dubey, J.P., Smith, D.D., and Frenkel, J.K. 1989. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J. Parasitol.* **75**: 750-755.
- Gagne, S.S. 2001. Toxoplasmosis. *Prim. Care Update Ob. Gyns.* **8**:122-126.
- Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M. and Sher, A. 1991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* **146**:286-292.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L. and Sher, A. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma activated macrophages. *J. Immunol.* **148**:1792-1796.
- Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. 1992. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **149**:175-180.
- Gurunathan, S., Sacks, D.L., Brown, D.R., Reiner, S.L., Charest, H., Glaichenhaus, N., and Seder, R.A. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **186**:1137-1147.
- Harris, E.L.V. and Angal, S. 1989. Protein Purification Methods, series "A Practical Approach", IRL press at Oxford University Press, Oxford.
- Herion, P., Hernández Pando, R., Dubremetz, J. F., and Saavedra, R. 1993. Subcellular localization of the 54 kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **79**:216-222.
- Hoppe, H.C., Ngo, H. M., Yang, M., and Joiner, K. A. 2000. Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat. Cell Biol.* **2**:449-456.
- Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C. J., Roos, D. S., and Murray, J. M. 2002. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* **13**:593-606.
- Jacquet, A., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Chaudoir, S., Bollen, A., and Biemans, R. 1999. Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. *Protein Expr. Purif.* **17**:392-400.

- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioaka, H., Nussenzweig, V., and Menard, R. 1999. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J. Cell Biol.* **147**:937-944.
- Kasper, L. H., Bradley, M. S. and Pfefferkorn, E. R. 1984. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**:443-449.
- Kasper, L. H. 1989. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **57**:668-672.
- Khan, I. A., Ely, K. K. and Kasper, L. H. 1991. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T-cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* **147**:3501-3506.
- Khan, I.A., Green, W.R., Kasper, L.H., Green, K.A., Schwartzman, J.D. 1999. Immune CD8+ T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the immunocompromised host. *Infect. Immun.* **67**:5869-5876.
- Koskiniemi, M., Lappalainen, M., and Hedman, K. 1989. Toxoplasmosis needs evaluation: an overview and proposals. *Am. J. Dis. Child* **143**:724-728.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Leriche, M. A., and J. F. Dubremetz. 1990. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol. Res.* **76**:559-562.
- Leriche, M. A., and J. F. Dubremetz. 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**:249-259.
- Leyva, R., Herion, P., and Saavedra, R. 2001. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* **87**: 70-79.
- Liscia, D.S., Alhadi, T., and Vonderhaar, B.K. 1982. Solubilization of active prolactin receptors by a nondenaturing zwitterionic detergent. *J. Biol. Chem.* **257**: 9401-9405.

- Loh, Y. P., Beinfeld, M. C., and Birch, N. P. 1993. Proteolytic processing of prohormones and proneuropeptides. In: Mechanisms of intracellular trafficking and processing of pro-proteins. (Loh, Y.P., Ed) pp 179-224, CRC Press, Florida.
- Martin, V., Arcavi, M., Santillan, G., Amendoeira, M.R.R., De Souza Neves, E., Griemberg, G., Guarnera, E., Garberi, J.C., and Angel, S.O. 1998. Detection of human *Toxoplasma* - specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 protein. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **5**: 627-631.
- McCabe, R. and Remington, J. S. 1988. Toxoplasmosis: the time has come. N. Engl. J. Med. **318**:313-315.
- McLeod, R., Beem, M. O., and Estes, R. G. 1985. Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with toxoplasmosis. J. Clin. Lab. Immunol. **17**:149-153.
- McLeod, R., Mack, D., and Brown, C.1991. *Toxoplasma gondii*: New advances in cellular and molecular biology. Exp. Parasitol. **72**:109-121.
- Mehlhorn, H. and Frenkel, J.K. 1980. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. J. Parasitol. **66**:59-67.
- Melo, E.J., Attias, M., and De Souza, W. 2000. The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. J. Struct. Biol. **130**:27-33
- Milich, D.R., Schödel, F., Hughes, J.L., Jones, J.E., and Peterson, D.L. 1997. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. J. Virol. **71**:2192-2201.
- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., and Sibley, L. D. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. J. Exp. Med. **190**:1783-1792
- Morisaki, J. H., Heuser, J. E., and Sibley, L. D. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. J. Cell Sci. **108**:2457-2464.

- Muller, M. 1992. Proteolysis in protein import and export: Signal peptide processing in eu- and prokaryotes. *Experientia* **48**:118-129.
- Nathan, C. F., Prendergast, F. J., Wiebe, M. E., Stanley, E. R., Platzer, E., Remold, H. G., Welte, K., Rubin, B. Y. and Murray, H. W. 1984. Activation of human macrophages: comparison of other cytokines with interferon-gamma. *J. Exp. Med.* **160**:600-605.
- Nielsen, H. V., Lauemoller, S. L., Christiansen, L., Buus, S., Fomsgaard, A., Petersen, E. 1999. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect. Immunol.* **67**: 6358-6363.
- Ossorio, P. N., Schwartzman, J. D. and Boothroyd, J. C. 1992. A *Toxoplasma gondii* rhostry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**:1-16.
- Ossorio, P. N., J. F. Dubremetz, and K. A. Joiner. 1994. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J. Biol. Chem.* **269**:15350-15357.
- Perkins, M. E. 1992. Rhostry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol. Today.* **8**:28-32.
- Pfefferkorn, E. R. 1990. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In: *Modern Parasite Biology. Cellular, Immunological and Molecular Aspects*. D. J. Wyler, editor. W. H. Freeman and Company, New York. pp. 26-50.
- Remington, J. S., Efron, B., Cavanaugh, E., Simon, H. J., and Trejos, A. 1970. Studies on toxoplasmosis in El Salvador. Prevalence and incidence of toxoplasmosis as measured by the Sabin-Feldman dye test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**:252-267.
- Remington, J. S. and Krahenbuhl, J. L. 1982. Immunology of *Toxoplasma gondii*. In: Nahmias A. J., O Reilly, R. J. (eds) *Immunology of human infection*, part 2. Plenum, New York, pp 327-371.
- Roger, N., Dubremetz, J. F., Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G. and Vernes, A. 1988. Characterization of a 225 kDa rhostry protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**:135-142.

- Saavedra, R., De Meuter, F. and Herion, P. 1990. Monoclonal antibodies identify new *Toxoplasma gondii* soluble antigens. *Hybridoma* **9**:453-463
- Saavedra, R. and Herion, P. 1991. Human T cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of interferon-gamma, interleukin-2, and strain cross-reactivity. *Parasitol. Res.* **77**:379-385.
- Saavedra, R., De Meuter, F., Decourt, F.L. and Herion, P. 1991. Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J.Immunol.* **147**:1975-1982.
- Saavedra, R., Becerril, M.A., Dubeaux, C., Lippens, R., De Vos, M.J., Herion, P., and Bollen, A. 1996. Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **64**: 3858-3862.
- Sadak, A., Z. Taghy, B. Fortier, and J. F. Dubremetz. 1988. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**:203-211.
- Saffer, L., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J. F. and Schwartzman, J. D. 1992. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* **39**:526-530.
- Sam-Yellowe, T. Y., Shio, H. and Perkins, M. E. 1988. Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. *J. Cell Biol.* **106**:1507-1513.
- Sam-Yellowe, T. Y., 1996. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol.Today* **12**:308-315.
- Sánchez-Pérez, M. and Shaw, S. 1986. HLA-DP: current status. In *HLA Class II Antigens*. Solheim, B. G., Moller, E., and Ferrone, S. eds. Springer Verlag, Berlin. p.83.
- Sasono, P.M., Smith, J.E. 1998. *Toxoplasma gondii*: an ultrastructural study of host-cell invasion by the bradyzoite stage. *Parasitol. Res.* **84**:640-645.
- Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K.J., Hannan, C.M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G.L., and Hill, A.V.S. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective

efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus. Ankara. Nat. Med. **4**:397-402.

-Schwab, J. C., Beckers, C. J. M. and Joiner, K. A. 1994. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**:509-513.

-Schwartzman, J. D., 1986. Inhibition of a penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. Infect. Immun. **51**:760-764.

-Schwartzman, J. D. and Krug, E. C. 1989. *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. Exp. Parasitol. **68**:74-82.

- Schwartzman, J. D. and Saffer, L. D. 1992. How *Toxoplasma gondii* gets in and out of host cells. Subcell. Biochem. **18**:333-364.

-Sibley, L. D., Krahenbuhl J. L., Adams, G. M. W. and Weidner, E. 1986. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. J. Cell. Biol. **103**:867-874.

-Sibley, L. D. and Krahenbuhl, J. L. 1988. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. Eur. J. Cell. Biol. **47**:81-87.

-Sinai, A. P. and Joiner, K. A. 1997. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. Annu. Rev. Microbiol. **51**:415-462.

-Sinai, A. P. and Joiner, K. A. 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. J. Cell. Biol. **154**:95-108.

-Soldati, D., Lassen, A., Dubremetz, J.F. and Boothroyd, J.C. 1998. Processing of *Toxoplasma* ROP1 protein in nascent rhoptries. Mol. Biochem. Parasitol. **96**:37-48.

-Suzuki, Y., and Remington, J. S. 1988. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2⁺ and Lyt-1⁺, L3T4⁺ T cells in mice. J. Immunol. **140**:3943-3946.

- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. and Remington, J. S. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* **240**:516-518.
- Suzuki, Y., Conley, F. K. and Remington, J. S. 1989. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J. Immunol.* **143**:2045-2050.
- Suzuki, Y., Conley, F.K., and Remington, J.S. 1990. Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. *Infect. Immun.* **58**:3050-3055.
- Tercero, J.C. y Díaz –Mauriño, T.1988. Affinity chromatography of fibrinogen on *Lens culinaris* agglutinin immobilized on CNBr-activated sepharose: Study of the active groups involved in nonspecific adsorption. *Anal. Biochem.* **174**: 128-136.
- Tilley, M., Fichera, M.E., Jerome, M.E., Roos, D.S., and White, M.W. 1997. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense granule proteins. *Infect Immun.* **65**:4598-4605.
- Van Gelder, P., Bosman, F., De Meuter, F., Van Heuverswyn, H., and Héron, P. 1993. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton antigen expressed in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **31**:9-15.
- Velasco-Castrejón, O., Salvatierra-Izaba B., Valdespino, JL., Sedano-Lara, AM., Galindo-Virgen, S., Magos, C., Llausas, A., Tapia-Conyer, R., Gutiérrez, G., Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. *Sal. Pública Mex.* **34**:222-229.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., and Verschueren, H. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* **68**: 38-45.
- Waldeland, H. and Frenkel, J. K. 1983. Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. *J. Parasitol.* **69**:60-65.

-Weiss, L.M. and Kim, K. 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front. Biosci.* 5:D391-405.

-Wolf, A. and Cowen, D. 1937. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). *Bull. Neurol. Inst. N.Y.*, 6:306-371.

-Wong, S.Y. and Remington, J.S. 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. *Aids* 7:299-316.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN