

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MIC10 RECOMBINANTE DE *Toxoplasma gondii* PARA DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TOXOPLASMOSIS

Josué Young¹, Aracelis Miranda², José Calzada², Azael Saldaña²

¹Universidad San Martín de Panamá

²Instituto Conmemorativo Gorgas para Estudios de la Salud

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado causante de la toxoplasmosis. Esta enfermedad afecta mayormente a personas inmunocomprometidas, como pacientes que padecen de SIDA donde puede producir infecciones graves como encefalitis toxoplásmica. También afecta a mujeres embarazadas en donde la infección aguda puede producir aborto espontáneo, muerte del feto o retraso mental del recién nacido. El diagnóstico tradicional se realiza serológicamente empleando antígenos crudos para la detección de anticuerpos específicos contra *T. gondii*. Sin embargo, estas pruebas dan con frecuencia resultados inconsistentes, como falsos positivos. Esto ha hecho que el diagnóstico de esta infección, principalmente la infección aguda, sea impreciso. El uso de antígeno recombinante podría subsanar esta deficiencia.

Las proteínas del micronema (MICs) de *T. gondii* son liberadas activamente del parásito y juegan un papel importante en la adhesión y la penetración a la célula huésped. La proteína de micronema MIC10 carece tanto de dominios de adhesión así como de dominios transmembrana a diferencia de las demás, debido a ello es posible que MIC10 pueda diseminarse del sitio de infección y volverse accesible como un antígeno circulante. El presente trabajo de investigación buscó determinar si esta proteína MIC10 podría ser utilizado como antígeno recombinante para el diagnóstico de la infección por *T. gondii*.

MÉTODOS

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) con el plásmido recombinante pGEX-MIC10 (plásmido generado por la inserción de MIC10 en el plásmido pGEX-6p2) mediante “choque térmico”; y las bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina (**Figura 1**). La producción de la proteína recombinante MIC10-GST fue inducida con IPTG (1 mM por 3 horas). La proteína recombinante se purificó empleando Glutathione-Sephadex 4B (Amersham-Pharmacia, Sweden) y su concentración se cuantificó mediante un kit comercial (Bicinchoninic Acid Kit, Sigma).

Se inmunizaron ratones con antígeno crudo de *T. gondii* y con la proteína recombinante MIC10-GST purificada (**Figura 2**) de los cuales se extrajo sangre para separar el suero a los 24 días de la inmunización. A los ratones inmunizados con el antígeno crudo se les extrajo sangre cada 10 días hasta los 30 días, y se separó el suero.

Se realizó un ensayo tipo Western Blot para observar la producción de los anticuerpos contra el antígeno crudo de *T. gondii*, así como para los anticuerpos anti-MIC10-GST (**Figura 3**).

Se estandarizó un ensayo tipo ELISA «casero» utilizando como antígeno de recubrimiento la proteína recombinante MIC10-GST y se ensayaron los sueros de ratón mencionados así como sueros de pacientes humanos tanto positivos como negativos (**Figura 4**).

RESULTADOS

Se logró purificar la proteína recombinante MIC10-GST (**Figura 2**). Esta tiene un tamaño de 44 kDa (26 la proteína de fusión GST y 18 la proteína recombinante MIC10).

Mediante Western Blot se observó la producción de anticuerpos IgG en ratones contra las proteínas de superficie de *T. gondii*, en especial las de 45 kDa y 30 kDa (**Figura 3**).

En el ELISA «casero» utilizando la proteína MIC10-GST como antígeno se obtuvo una reacción positiva de los sueros de ratones inmunizados con dicha proteína (**Figura 4**).

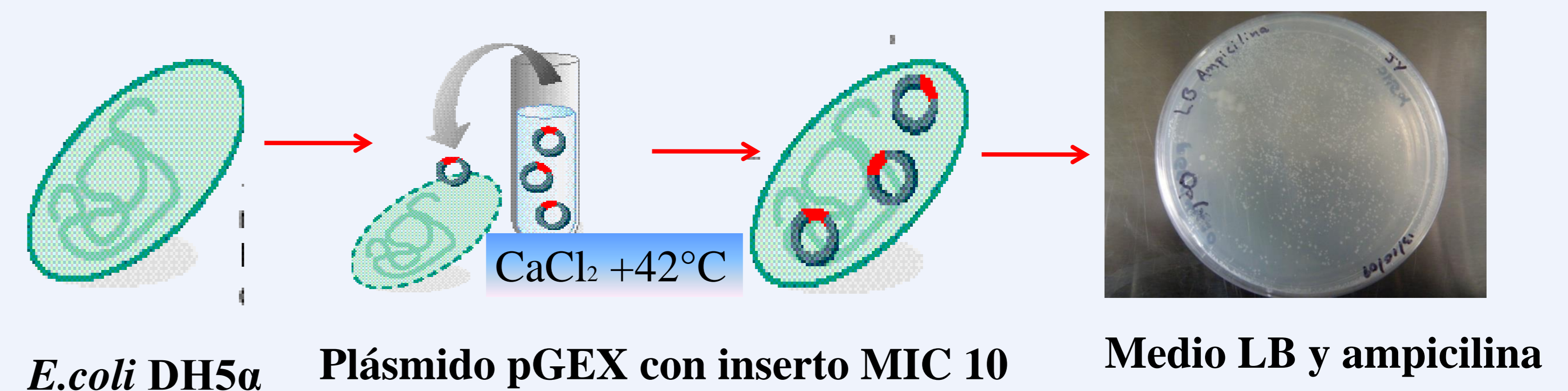
Al utilizar el ELISA «casero» con la proteína MIC10-GST como antígeno en 100 sueros humanos, no se pudo diferenciar claramente entre aquellos sueros positivos de los negativos.

DISCUSIÓN

Se logró expresar en bacterias la proteína recombinante MIC10 principalmente en forma soluble y su inoculación en ratones generó anticuerpos específicos contra ella. Sin embargo, los ensayos preliminares al analizar sueros controles humanos no permiten diferenciar de forma clara sueros positivos de los negativos. Esto puede deberse a similitudes entre la secuencia de aminoácidos que la componen con otras proteínas de distinto origen que interactúan con el sistema inmune humano. Por ello, se hacen necesarios estudios más profundos para determinar la utilidad de la proteína MIC10 en otras áreas biomédicas.

Figura 1

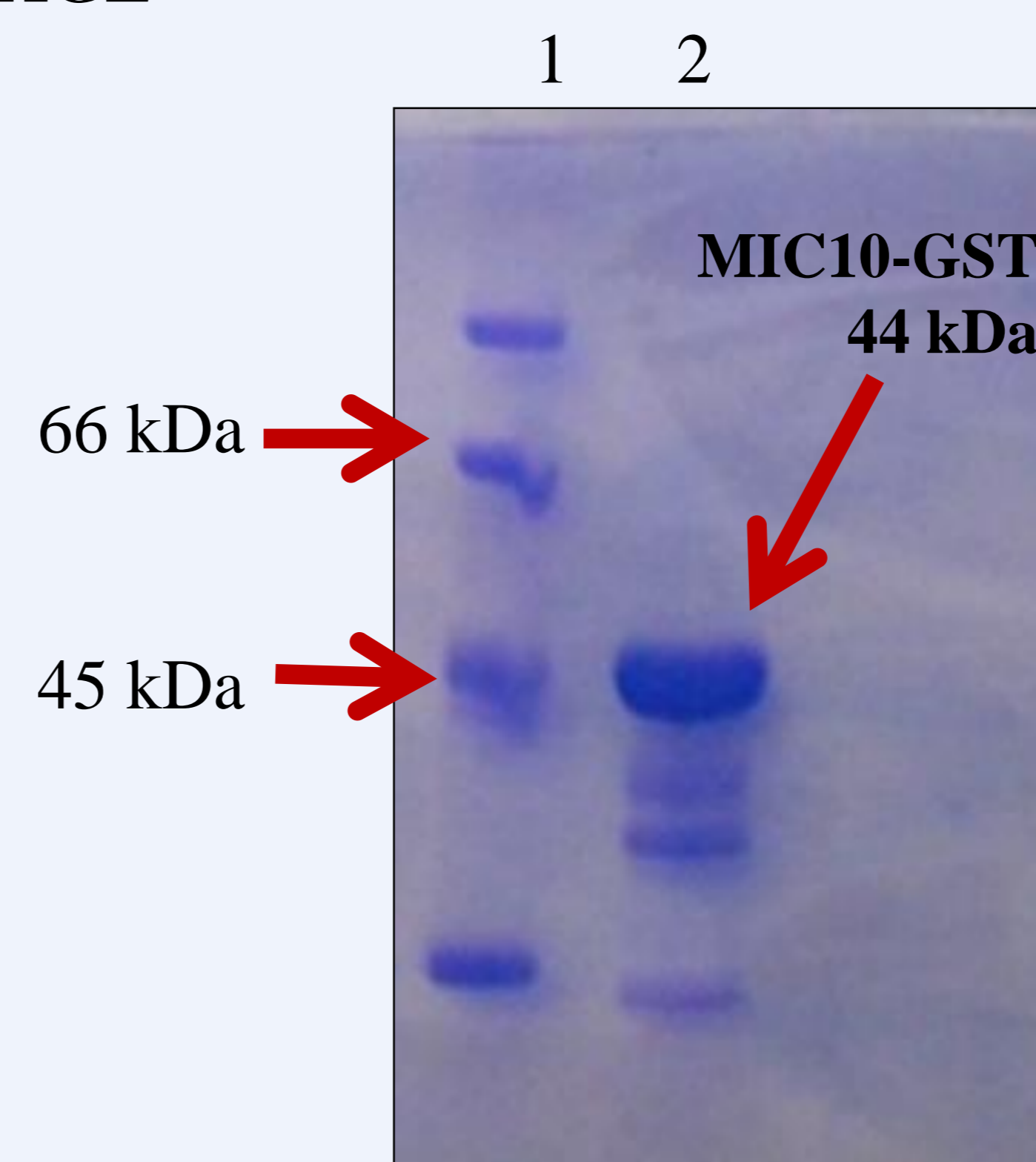
Transformación células *E. coli* (DH5 α) con plásmido pGEX-MIC10



El tratamiento de células competentes con CaCl₂ y choque térmico permiten el ingreso del plásmido a la célula. Sólo las bacterias que tengan el plásmido podrán crecer en el medio con ampicilina.

Figura 2

Análisis de purificación de proteína recombinante MIC10-GST en SDS-PAGE



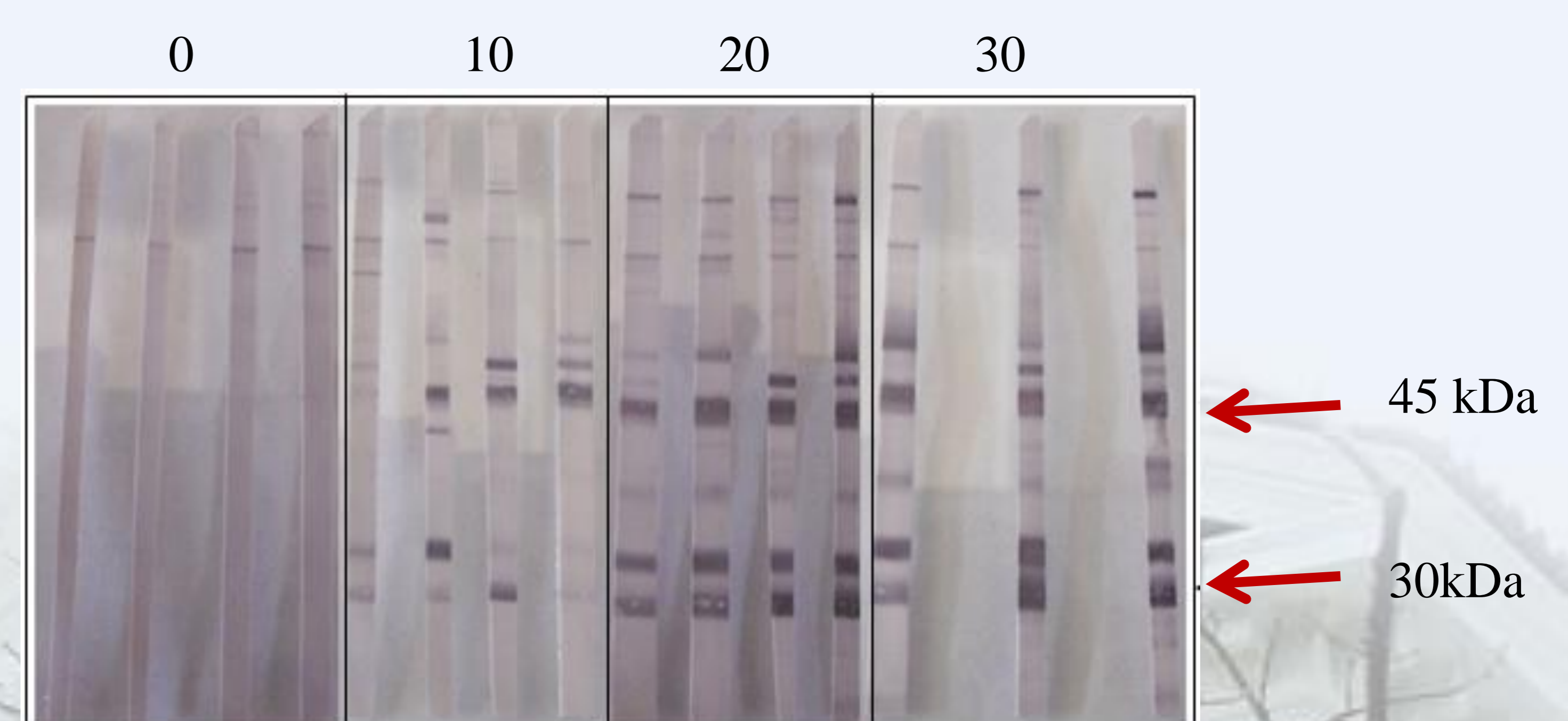
1- Marcador de tamaño de Proteínas.
2- Proteína MIC10-GST purificada.



Luego de la purificación de la proteína recombinante MIC10-GST se inmunizaron ratones con la misma.

Figura 3

Western Blot con sueros de ratón inmunizados con antígeno crudo de *Toxoplasma gondii*



La membrana del Western Blot contenía antígeno crudo de *T. gondii*. Se usaron sueros de 4 ratones a los 0, 10, 20 y 30 días de la inmunización con antígeno crudo de *T. gondii*. Las flechas corresponden a las proteínas de superficie de *T. gondii*.

Figura 4

ELISA MIC10-GST con sueros de ratón inmunizados con proteína recombinante



Se utilizaron 4 sueros de ratón antes de inocularles la proteína recombinante (negativos) y 4 sueros de los mismos ratones después de 24 días de la inmunización (positivos). Plato izquierdo: ratón 1, A y B; ratón 2, C y D. Plato derecho: ratón 3, A y B; ratón 4, C y D. Sueros negativos: A y C; sueros positivos: B y D.