



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Obtención y purificación de proteína MIC3 de *Toxoplasma gondii*.

Almeida Mena, Stefany Alexandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Torres Arias, Marbel Ph. D

7 de marzo del 2023

Resultados del Software Compilatio Magister



CERTIFICADO DE ANÁLISIS
magister

Almeida_Stefany_Revisión_copyleaks

< 1%

Similitudes



0% Texto entre comillas
0% similitudes entre comillas
< 1% Idioma no reconocido

Nombre del documento: Almeida_Stefany_Revisión_copyleaks.docx
ID del documento: 8dd5f346c37f3a20dd40e5f29caff7d6e9b9fc6
Tamaño del documento original: 5,6 Mo

Depositante: MARBEL TORRES ARIAS
Fecha de depósito: 6/3/2023
Tipo de carga: interface
fecha de fin de análisis: 6/3/2023

Número de palabras: 11.702
Número de caracteres: 73.928

Ubicación de las similitudes en el documento:

Fuentes con similitudes fortuitas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 Documento de otro usuario #7a855b  El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (10 palabras)
2	 repositorio.espe.edu.ec Determinación de la actividad proliferativa de nanovesicul... http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/21217/5/T-ESPE-039901.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (14 palabras)
3	 repositorio.espe.edu.ec https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/29684/1/T-ESPE-052360.pdf	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (12 palabras)

Fuente mencionada (sin similitudes detectadas) Estas fuentes han sido citadas en el documento sin encontrar similitudes.

1  <https://www.snapgene.com/resources/plasmid>

Firma

Torres Arias, Marbel Ph D.

C.C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo Integración curricular, “**Obtención y purificación de proteína MIC3 de *Toxoplasma gondii***”, fue realizado por la señorita **Almeida Mena, Stefany Alexandra**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 7 de marzo 2023

Firma

Torres Arias, Marbel Ph. D

C.C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Almeida Mena, Stefany Alexandra**, con cédula de ciudadanía N° 1727472480, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Obtención y purificación de proteína MIC3 de *Toxoplasma gondii***", es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 7 de marzo 2023

Firma

Almeida Mena, Stefany Alexandra

C.C: 1727472480



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Almeida Mena, Stefany Alexandra**, con cédula de ciudadanía N° 1727472480, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de Integración curricular: "**Obtención y purificación de proteína MIC3 de *Toxoplasma gondii***", en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 7 de marzo 2023

Firma

Almeida Mena, Stefany Alexandra

C.C: 1727472480

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo a mi madre Elizabeth Mena, quién no ha escatimado esfuerzos ni sacrificios para sacarme adelante, gracias a sus cuidados e incondicional apoyo he podido crecer como persona y desarrollarme en el ámbito profesional.

Stefany Alexandra Almeida Mena

Agradecimientos

Gracias a mi madre Elizabeth y Guido su esposo, por brindarme su amor, paciencia y comprensión en cada etapa de mi vida, por ser mi pilar en los momentos difíciles y ayudarme a seguir pese a las adversidades.

A ti madre, por ser mi ejemplo a seguir y cada día luchar para que no me falte nada, eres mi más grande motivación, mi mejor amiga y todo mi esfuerzo y logros son plenamente para llenarte de orgullo.

A Michael, que es como mi hermano, por cada aventura, risas y momentos compartidos, y Cecilia, por ser una abuelita excepcional, por permitirme formar parte de su familia y acogerme con su inmensurable cariño.

A Damián, quien ha estado conmigo en buenos y malos momentos, por esos incontables días de estudio y esfuerzo, por ser mi confidente, consejero y hacer mis días mejores.

A mis amigos, Gaby, Nico y Alex, por su apoyo incondicional tanto en el aspecto emocional y educativo, por su ayuda, por las risas, aventuras y viajes, por ser las grandiosas personas que han marcado una huella en mi vida y en mi corazón.

A la Dra. Marbel Torres, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia y guía en el desarrollo del presente trabajo, por permitirme formar parte de sus días, por su calidez, y la sensación otorgada de pertenecer a un equipo.

A Andrea Aluisa, por ser mi guía en el laboratorio, por su arduo trabajo en la enseñanza, por estar cada día recargada de paciencia y buenas vibras, por las risas y momentos compartidos.

A Fernanda Toscano, por sus consejos y guía en el laboratorio, por su paciencia e increíble buen humor, por enseñarme la importancia del trabajo en equipo y las aventuras compartidas.

Stefany Alexandra Almeida Mena

Índice de Contenidos

Resultados del Software Compilatio Magister	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Listado de Abreviaturas	16
Resumen	18
Abstract	19
Capítulo I Introducción	20
Formulación del Problema	20
Justificación	22
Objetivos Generales y Específicos	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
Hipótesis	23
Capítulo II Revisión Bibliográfica	24
<i>Toxoplasma gondii</i>	24
Morfología y Formas Infecciosas	24
Taquizoítos	24

	10
Bradizoítos y Quistes Tisulares.....	25
Esporozoítos.....	25
Ciclo de vida.....	26
Rol Central de las MICs.....	28
Proceso de Invasión.....	29
MIC3.....	29
Características Moleculares de MIC3.....	29
Formación de Complejos.....	30
Proteínas Recombinantes.....	31
Producción de Proteínas Recombinantes.....	32
Proceso a Nivel de ADN.....	36
Sistema pET.....	36
Elección de Plataformas de Producción.....	38
Huéspedes.....	38
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	41
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	41
Separación de Células y Recolección de Productos a partir de E. coli BL21.....	42
Purificación de Proteínas.....	44
Identificación y Visualización de Proteínas.....	46

Capítulo III Materiales y Métodos.....	48
Localización Geográfica	48
Purificación del Plásmido <i>E. coli</i> JM109 Recombinante.....	48
Verificación de <i>E. coli</i> JM109 Recombinante.....	49
Aislamiento y Clonación de <i>E. coli</i> BL21	49
Colony PCR para Verificación de <i>E. coli</i> BL21 Recombinante.....	50
Expresión Génica.....	51
Ensayos Variando la Concentración de (IPTG)	51
Obtención del Pellet de Expresión Génica de <i>E. coli</i> BL21 recombinante y SDS-PAGE	52
Lisis Celular de <i>E. coli</i> BL21 recombinante.....	52
Comprobación de la Presencia de MIC3 Mediante Western Blot	53
Purificación <i>E. coli</i> BL21 Recombinante por Cromatografía.....	54
Purificación por Cromatografía de Afinidad	54
Purificación por Cromatografía de Intercambio Iónico.....	56
Concentración de la Proteína MIC3 Mediante Unidades de Filtración Centrifuga.....	58
Verificación de la Presencia de la Proteína MIC3 por SDS-PAGE	58
Capítulo IV Resultados.....	59
Expresión de Proteína MIC3 en <i>E. coli</i> JM109 Recombinante.....	59
Purificación del Plásmido.....	59
Verificación con Enzima de Restricción EcoRV.....	60

Clonación en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS Competent Cells.....	63
Verificación con Colony PCR de <i>E. coli</i> BL21 Recombinante	64
Estandarización de la concentración de (IPTG) en <i>E. coli</i> BL21 Recombinante	64
Lisis Celular de MIC3/BL21	66
Purificación de MIC3/BL21 Mediante Cromatografía de Afinidad en Columna de Níquel HisTrap™ HP de 1mL	67
Cromatografía de Intercambio Iónico en Columna DEAE Sefarosa Fast Flow.....	68
Verificación de la presencia de MIC3/BL21 mediante Western Blot	69
Concentración de Fracciones Positivas Obtenidas Mediante Cromatografía de Afinidad Usando Unidades de Filtración Centrífuga Ultra-4 Amicon®.	70
Capítulo V Discusión	72
Capítulo VI Conclusiones	77
Capítulo VII Recomendaciones	78
Bibliografía	79

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Principales PTM de proteínas en bacterias</i>	34
Tabla 2 <i>Características del Vector pET-22b (+)</i>	37
Tabla 3 <i>Ventajas y Desventajas de los Sistemas de Expresión</i>	39
Tabla 4 <i>Estrategias Utilizadas en la Producción de Proteínas Recombinante en E. coli</i>	42
Tabla 5 <i>Características de los Tipos de Cromatografía</i>	45
Tabla 6 <i>Ventajas y Desventajas de los Tipos de Electroforesis en Gel</i>	47
Tabla 7 <i>Corte con Enzima de Restricción EcoRV</i>	49
Tabla 8 <i>Colony PCR para E.coli BL21 Recombinante</i>	50
Tabla 9 <i>Parámetros usados en ensayos de inducción por IPTG</i>	51
Tabla 10 <i>Variantes Preparadas del Tampón de Elución</i>	55
Tabla 11 <i>Soluciones Usadas en la Purificación en Columna DEAE</i>	56
Tabla 12 <i>Preparación de la Muestra para la Columna DEAE</i>	57
Tabla 13 <i>Concentraciones Obtenidas en el Nanodrop para E. coli JM109 a partir de cDNA</i>	59
Tabla 14 <i>Sitios de Corte de la Enzima de Restricción EcoRV en el Plásmido Recombinante</i> <i>E.coli JM109</i>	60
Tabla 15 <i>Medición de Concentración de los Ensayos de Lisis Celular de MIC3/BLI21 en</i> <i>Nanodrop</i>	66

Índice de figuras

Figura 1	<i>Etapas infecciosas de Toxoplasma gondii</i>	25
Figura 2	<i>Ciclo de Vida de Toxoplasma gondii</i>	27
Figura 3	<i>Reconstrucción 3D de un taquizoito extracelular</i>	28
Figura 4	<i>Dibujo esquemático de las construcciones de MIC3</i>	30
Figura 5	<i>Tecnología de ADN Recombinante</i>	31
Figura 6	<i>Estructura de un vector de expresión</i>	33
Figura 7	<i>Vector Bacteriano pET-22b (+)</i>	38
Figura 8	<i>Protocolo de Cromatografía de Afinidad de Intercambio Iónico</i>	57
Figura 9	<i>Electroforesis en Gel Agarosa de la Purificación del Plásmido en E.coli JM109</i>	60
Figura 10	<i>Cortes en Plásmido pET-22b (+) Usando Enzima de Restricción EcoRV</i>	61
Figura 11	<i>Comprobación con Enzima de Restricción EcoRV en Gel de Agarosa</i>	62
Figura 12	<i>Clonación en E. coli BL21 (DE3)</i>	63
Figura 13	<i>Colony PCR para E. coli BL21 (DE3)</i>	64
Figura 14	<i>Estandarización de las concentraciones de (IPTG) para la Proteína MIC3</i>	65
Figura 15	<i>Gel de poliacrilamida de la Estandarización de las concentraciones de (IPTG) para la Proteína MIC3 en (t4)</i>	65
Figura 16	<i>Lisis Celular MIC3/BL21</i>	67
Figura 17	<i>Fracciones Positivas Resultantes de la Purificación de MIC3/BL21 por Cromatografía de Afinidad de Níquel</i>	68
Figura 18	<i>Fracciones Positivas Obtenidas para cada uno de los Tampones de elución Usados en Cromatografía de Intercambio Iónico</i>	68
Figura 19	<i>Comprobación mediante Western Blot de la presencia de proteína MIC3/BL21</i>	70

Figura 20 (SDS-PAGE) de la proteína MIC3 Usando Unidades de Filtración Ultra-4 Amicon® 71

Listado de Abreviaturas

MIC: Proteína micronema

MIC3: Proteína micronema 3

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

ROP: Proteínas de roptría

GRA: Antígenos de gránulos densos

PTM: Modificaciones Postraduccionales

kDa; Kilodalton

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

RE: Retículo Endoplasmático

MCS: Sitio de Clonación Múltiple

cAMP: Monofosfato de Adenosina Cíclico

LB: Medio Luria Bertani

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNP T7: ARN polimerasa del Bacteriófago T7

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

IMAC: Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados

CIEC: Cromatografía de Intercambio Catiónico

AIEC: Cromatografía de Intercambio Aniónico

VC: volúmenes de columna

DEAE: dietilaminoetilo

T.A.: Temperatura ambiente

min: Minutos

s: Segundos

h: Horas

Resumen

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria zoonótica, que tiene prevalencia a nivel mundial e importancia médica y veterinaria. Es causada por el parásito protozoario obligado *Toxoplasma gondii* y afecta en su mayoría a los animales de sangre caliente, incluido a los humanos. Su fácil contagio, radica en la ingesta de alimentos contaminados o poco cocidos que contengan quistes tisulares viables u ooquistes. También afecta a pacientes inmunodeprimidos, y puede resultar en encefalitis y retinocoroiditis. Sin embargo, raramente se transmite de manera congénita. En particular, *T. gondii*, requiere de orgánulos que ayuden en su motilidad, como la proteína micronema 3 (MIC3), que actúa como una especie de puente entre el parásito y las células huésped, por lo que, su obtención mediante sistema de expresión procariota es de importancia en el presente estudio. El gen de interés MIC3 de 1080 pb fue capaz de expresarse en la cepa de *E. coli* B121 mediante el sistema pET22-b (+). Así también, los ensayos de lisis realizados resultaron coincidir con el tamaño de la proteína MIC3 cuando no forma dímeros (38 kDa). Además, se realizaron ensayos de purificación tanto de cromatografía de afinidad, como de intercambio iónico, que resultaron en la obtención de fracciones positivas respecto a la proteína de interés que luego se verificaron mediante ensayo de Western Blot y electroforesis (SDS-PAGE).

Palabras clave: proteínas recombinantes, cromatografía, sistema de expresión, procariotas.

Abstract

Toxoplasmosis is a zoonotic parasitic disease with worldwide prevalence and medical and veterinary importance. It is caused by the obligate protozoan parasite *Toxoplasma gondii* and affects mostly warm-blooded animals, including humans. Its easy contagion lies in the intake of contaminated or undercooked foods that contain viable tissue cysts or oocysts. It also affects immunocompromised patients, and can result in encephalitis and retinochoroiditis. However, it is rarely transmitted congenitally. In particular, *T. gondii* requires organelles that help in its motility, such as the micronema 3 (MIC3) protein, which acts as a kind of bridge between the parasite and the host cells, therefore, obtaining it through the expression system prokaryote is of importance in the present study. The 1080 bp MIC3 gene of interest was able to be expressed in the *E. coli* BI21 strain using the pET22-b (+) system. Likewise, the lysis assays carried out coincided with the size of the MIC3 protein when it does not form dimers (38 kDa). In addition, both affinity chromatography and ion exchange purification assays were performed, which resulted in the obtaining of positive fractions with respect to the protein of interest that were later verified by Western Blot assay and electrophoresis (SDS-PAGE).

Key words: recombinant proteins, chromatography, expression system, prokaryotes.

Capítulo I

Introducción

Formulación del Problema

Nicolle & Manceaux, (1908) encontraron en los tejidos del roedor (*Ctenodactylus gundi*) un protozooario que en un inicio se pensó era un piroplasma, más tarde, lo identificaron erróneamente con *Leishmania* al igual que Splendore, (1908), quién encontró al mismo parásito en un conejo en Brasil, sin embargo, al final se determinó que se trataba del descubrimiento de un nuevo organismo al que denominaron *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (Dubey, 2020).

En 1970 se descubrió el ciclo de vida de *T. gondii* y con ello su mecanismo de transmisión. Es responsable de la enfermedad parasitaria toxoplasmosis, en una amplia variedad de animales de sangre caliente, afectando comúnmente a ovejas cabras y roedores (Dubey, 2008; Montazeri et al., 2020). En humanos, destaca como una de las infecciones más comunes a nivel mundial, con un estimado de más de mil millones de personas infectadas (Frenkel, 2000; Montazeri et al., 2020).

En pacientes inmunodeprimidos, la infección puede resultar en encefalitis, retinocoroiditis, e inclusive, en transmisión congénita con fetopatía si una mujer seronegativa se infecta (Dubey, 2020). *T. gondii* raramente se transmite de manera congénita, por lo que la infección generalizada se explica por carnivorismo en el gato y por vía fecal-oral (ooquistes) en otros huéspedes (McLeod et al., 2020). La presencia de por vida del parásito en los tejidos de personas infectadas suele considerarse asintomático (Flegr et al., 2014), aunque, en la

actualidad las infecciones latentes están asociadas con cambios en el comportamiento del paciente (Flegr, 2007).

En general, la prevalencia de *T. gondii*, está relacionada con prácticas sanitarias y hábitos de comer/beber, así también, las condiciones climáticas influyen en la supervivencia prolongada de los ooquistes del parásito (Dubey, 1988; Pappas et al., 2009). Según Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), la toxoplasmosis es la segunda causa de muerte por enfermedades transmitidas por alimentos, con un estimado de 327 muertes en los EE.UU. (Montazeri et al., 2020). Además, en Sudamérica, continua siendo un importante problema de salud pública, donde la prevalencia más alta recae en Brasil (77,5%) y Colombia (63,5%) (dos Anjos Pinheiro Bogoevich Morais et al., 2020; Pappas et al., 2009). Aun así, en Ecuador no se ha estudiado a fondo la infección ni tampoco existen datos actualizados de incidencia que permitan contemplar la situación epidemiológica de la toxoplasmosis en el país (Velásquez Serra et al., 2020).

Particularmente, todas las formas de toxoplasmosis representan una carga socioeconómica grave, por lo que, se ha enfatizado su estudio epidemiológico (Flegr, 2013). Hoy en día, *T. gondii* es un organismo modelo, útil para comprender la respuesta inmunitaria a un patógeno intracelular (Dubey, 2020). Su limitada capacidad de sobrevivir fuera de una célula, hace que requiera de orgánulos que ayuden en su motilidad. Las proteínas micronemas (MIC), contribuyen en la unión del parásito al huésped, e inducen la señalización (Lebrun et al., 2020). En particular la proteína micronema 3 (MIC3), actúa como una especie de puente entre el parásito y las células huésped (Wang & Yin, 2015), por lo que, obtenerla mediante sistema de expresión procariota es de importancia para futuras aplicaciones.

Hasta el momento, la FDA ha aprobado más de 130 proteínas recombinantes para uso clínico, aun así, más de 170 proteínas recombinantes se producen y utilizan actualmente en medicina en todo el mundo (Pham, 2018). Al representar aproximadamente el 30% de los productos biofarmacéuticos presentes en el mercado, la producción de proteínas recombinantes ha marcado un auge de crecimiento en los últimos años y son un foco de interés para grandes y pequeñas compañías (Overton, 2014).

Justificación

T. gondii, es capaz de formar un sistema complejo que le permite complementar las proteínas para la regulación inmunitaria, además no presenta el mismo patrón de invasión de las células huésped de otros patógenos intracelulares (Wang & Yin, 2015). El sistema utilizado por *T. gondii*, consiste en un proceso de invasión activo basado en energía y motilidad, e involucra distintos orgánulos que incluyen las proteínas micronemas (MIC), las proteínas de ropría (ROP) y los antígenos de gránulos densos (GRA) (Carruthers & Sibley, 1997).

En una etapa temprana de invasión, las MIC secretadas desde los taquizoítos facilitan el reconocimiento y adhesión de las células huésped por parte de los parásitos (Dowse & Soldati, 2004). En particular, MIC3 tiene relevancia por expresarse en cada una de las etapas del ciclo de vida de *T. gondii* (taquizoíto, bradizoíto y esporozoíto), repercute a nivel inmunitario y está relacionado con la virulencia (Garcia-Réguet et al., 2000). A su vez, al permitir su fácil propagación y cuantificación en laboratorio viene a ser una potencial molécula candidata para la producción de vacunas y pruebas de diagnóstico, lo que generaría un gran aporte a los estudios epidemiológicos de toxoplasmosis en Ecuador (Lebrun et al., 2020).

Por ello, la importancia y especial atención en el estudio de MIC3, dado que actúa como una adhesina, además, tiene una fuerte inmunogenicidad lo que estimula la producción de la inmunidad humoral y celular en el cuerpo (Wang & Yin, 2015). Es clave poder obtener y purificar MIC3 como una proteína recombinante en el sistema de expresión procariota a partir de *Escherichia coli* en la cepa BL21, para así priorizar su estudio individual, conocer su función biológica y brindar información pertinente que ayude en posteriores estudios con aplicaciones tecnológicas.

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo General

Obtener y purificar la proteína MIC3 de *Toxoplasma gondii*.

Objetivos Específicos

Expresar la proteína recombinante MIC3 de *Toxoplasma gondii* en *Escherichia coli* BL21, mediante el uso del sistema pET por inducción de IPTG para el control de su producción.

Purificar la proteína recombinante MIC3 de *Toxoplasma gondii* mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel con el fin de concentrar y estabilizar el producto conservando su potencia y actividad.

Aplicar la técnica de electroforesis SDS-PAGE a fin de verificar la presencia de la proteína recombinante MIC3 producida por *Escherichia coli* BL21

Hipótesis

El sistema procariota de *Escherichia coli* BL21 permite obtener proteína recombinante MIC3 y posteriormente purificar mediante cromatografía de afinidad.

Capítulo II

Revisión Bibliográfica

Toxoplasma gondii

Morfología y Formas Infecciosas

El parásito protozooario intracelular obligado, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), consta como un coccidio intestinal perteneciente al Filo Apicomplexa, que puede causar una enfermedad parasitaria zoonótica denominada toxoplasmosis, misma que prevalece a nivel mundial, tanto en humanos como en animales (Paredes-Santos et al., 2012).

Las especies afines a Felidae terminan por ser los hospederos definitivos para *T. gondii*, donde, en particular el gato (*Felis catus*), juega un papel primordial en la transmisión al ser humano debido a su estrecha relación como animal de compañía (Grandía G. et al., 2013). Otras vías comunes de infección en huéspedes intermedarios, son, la ingesta de alimentos contaminados con ooquistes, ingesta de carne cruda o poco cocida, puede existir transmisión congénita o darse por transfusiones de sangre y trasplante de órganos (Attias et al., 2020).

T. gondii, presenta tres formas infecciosas, los taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos, como se puede observar en la Figura 1, todas estas tienen básicamente la misma organización primaria que consiste en una forma alargada y un complejo apical que contiene a MIC y ROP, sus orgánulos secretores (Attias et al., 2020).

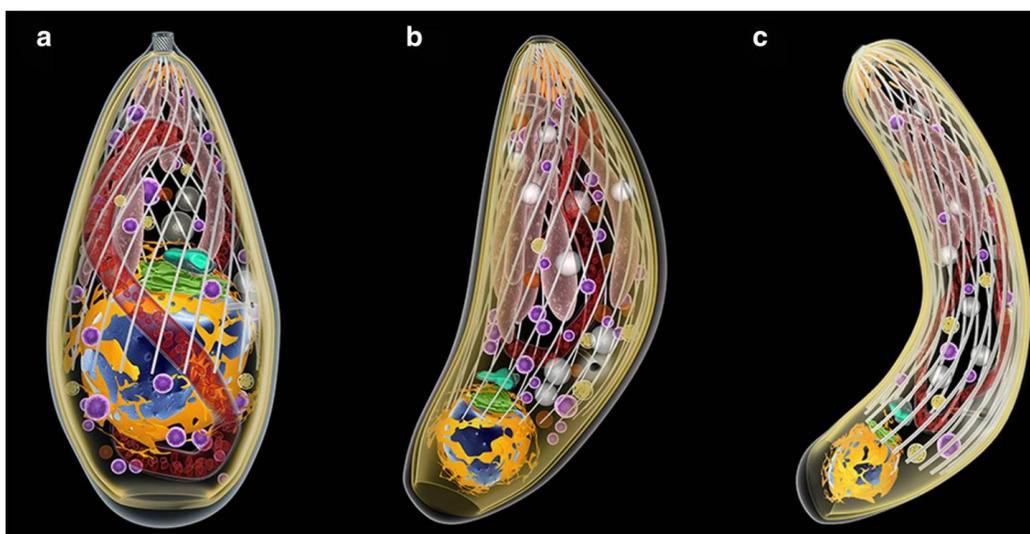
Taquizoítos. El taquizoíto, es el estadio en el que fue descubierto el parásito *T. gondii*, la forma descrita por Frenkel, (1973) es semilunar, a su vez, ha sido denominado como trofozoíto, se divide por endodiogenia y puede infectar a prácticamente cualquier célula del cuerpo (Dubey, 2008).

Bradizoítos y Quistes Tisulares. La forma enquistada de los bradizoítos fue propuesta igualmente por Frenkel, (1973), pero para evitar confusiones con los ooquistes, Dubey (1988), propuso la denominación de quistes tisulares. A su vez, los bradizoítos son resistentes a la digestión por jugos gástricos (pepsina-HCl), a diferencia de los taquizoítos, que son destruidos de inmediato (Jacobs et al., 1960).

Esporozoítos. Únicamente son producidos en el huésped definitivo durante la reproducción sexual y son liberados en los ooquistes a través de las heces de los felinos (Attias et al., 2020).

Figura 1

Etapas infecciosas de Toxoplasma gondii



Nota. Las tres etapas infecciosas de *Toxoplasma gondii*. Taquizoíto (a), bradizoíto (b) y esporozoíto (c). Tomado de *The life-cycle of Toxoplasma gondii reviewed using animations* (p.3), por Attias et al., 2020, *Parasit Vectors* 13:588 (2020).

Ciclo de vida

Los taquizoítos constan como la forma rápida de multiplicación en *T. gondii* e influyen en gran parte de la citopatología y destrucción tisular (Frenkel, 2000), en cambio, los bradizoítos se reproducen lentamente y en su forma enquistada suelen ser considerados estadios de reposo hasta ser ingeridos por otro huésped (Dubey, 2008).

Al ingerir ooquistes, tejidos musculares y/o cerebrales de un hospedador intermedio, los gatos adquieren la infección (Frenkel, 2000). Una vez disuelta la pared del quiste, en el estómago se liberan los bradizoítos (quistes tisulares) o esporozoítos (ooquiste), comienzan su multiplicación e invaden en primera instancia las células epiteliales intestinales. Luego, estos se convierten en esquizontes, dando inicio a la fase de reproducción asexual (Attias et al., 2020).

Después de varias rondas de división nuclear, comienza la individualización del merozoíto, a su vez, se da la aparición del complejo apical, incluido MIC y ROP, que se distribuyen alrededor de cada núcleo de las células hijas dentro de la célula huésped (Attias et al., 2020). Algunos merozoítos se convierten en la forma sexual denominada gametocitos para formar los ooquistes que contienen los esporozoítos infecciosos (Despommier et al., 1995).

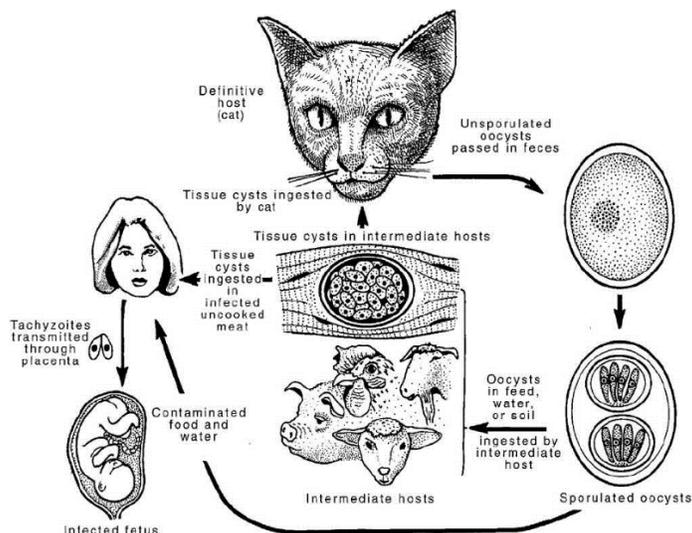
Los ooquistes formados se liberan en las heces de los gatos y el ambiente promueve su esporulación, lo que los hace altamente resistentes incluso en agua y en condiciones secas durante meses (Dubey et al., 1998).

En un huésped intermediario al igual que en el definitivo, las paredes de los quistes se rompen por la acción de enzimas digestivas lo que libera a los taquizoítos. (Dubey et al., 1998). Sin embargo, van a depender de las MIC para la motilidad, además del deslizamiento y adhesión inicial a la superficie de la célula huésped (Attias et al., 2020).

Seguido, MIC y ROP actúan en secuencia para inducir el proceso de internalización, luego ROP inicia los procesos de señalización, provocando alteraciones en el comportamiento de la célula huésped, lo que permite crear un ambiente idóneo donde el parásito sobreviva y se multiplique (Attias et al., 2020). Entonces, los taquizoítos intracelulares se someten a consecutivas rondas de división asexual (Dubey et al., 1998), algunos incluso cambian gradualmente su metabolismo, lo que ralentiza la tasa de división y permite su conversión en bradizoítos (Attias et al., 2020). Finalmente, los bradizoítos son almacenados en un pseudoquiste hasta que las defensas del huésped se desactiven (Dubey et al., 1998). La Figura 2, abarca de forma concisa el ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* para su huésped definitivo y los intermediarios.

Figura 2

Ciclo de Vida de *Toxoplasma gondii*



Nota. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Tomado de *Toxoplasma gondii. The model Apicomplexan-Perspectives and Methods* (p.2), por Dubey, 2020, Elsevier.

Rol Central de las MICs

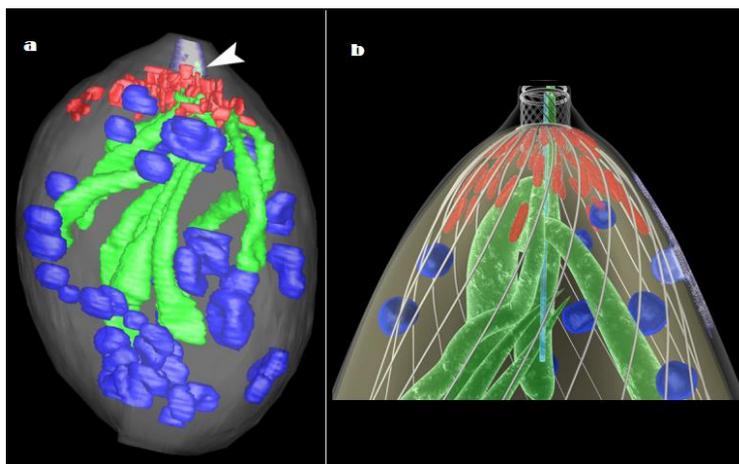
Las MICs, se encuentran unidas a la membrana en el RE, son pequeñas con forma de bastón, permanecen en gran cantidad en la porción apical de la célula y son sintetizadas en los ribosomas (Soldati et al., 2001).

T. gondii carece de cilios o flagelos, pero puede moverse a lo largo de la superficie de una célula huésped gracias a la motilidad deslizante que le otorgan las MICs, al ser liberadas por exocitosis, proceso que, a su vez, se ve desencadenado por un aumento en el calcio intracelular (Lebrun et al., 2020).

En la Figura 3(a), se puede apreciar la localización de los micronemas dentro de un taquizoíto, en un modelo renderizado.

Figura 3

Reconstrucción 3D de un taquizoito extracelular



Nota. Modelo renderizado. Esquema general (a), acercamiento y descarga de micronemas del conoide (b). Membrana plasmática (transparente), rotries (verde), micronemas (rojo), conoide (flecha). Adaptado de *Dynamics and 3D organization of secretory organelles of Toxoplasma*

gondii (p.5, 10), por Paredes-Santos et al., 2012, *Journal of Structural Biology* 177 (2012) (p.420-430).

Proceso de Invasión. Una vez que *T. gondii* invade las células huésped, el parásito empuja el conoide fuera del cuerpo como se puede observar en la Figura 3(b) y posteriormente los micronemas descargan una gran cantidad de MIC a través de este (Wang & Yin, 2015). Luego, estas MICs interactúan con los receptores correspondientes en la membrana de la célula huésped y se distribuyen en la superficie del parásito. En este caso, el extremo frontal que interactúa con las células forma la unión móvil, se provoca el movimiento y finalmente, gracias a la fuerza producida por el sistema actina-miosina, se hidrolizan (Matthiesen et al., 2003).

MIC3

MIC3, desempeña un papel importante en el reconocimiento y adhesión, además, al tener la capacidad de unirse a una variedad de células huésped, está relacionado con la invasión y virulencia de la infección. También es de importancia dado que, puede expresarse en cada estadio del ciclo de vida de *T. gondii*, lo que facilita su estudio (Lebrun et al., 2020; Wang & Yin, 2015).

Características Moleculares de MIC3

La longitud de la secuencia del gen *mic3* es de 1.080 pb, tiene una sola copia, no posee intrones ni tampoco una secuencia promotora TATA o CCAAT en la región no codificante del extremo 5'. Adicional, la secuencia codifica 359 aminoácidos y una proteína con peso molecular de 38 kDa (Wang & Yin, 2015).

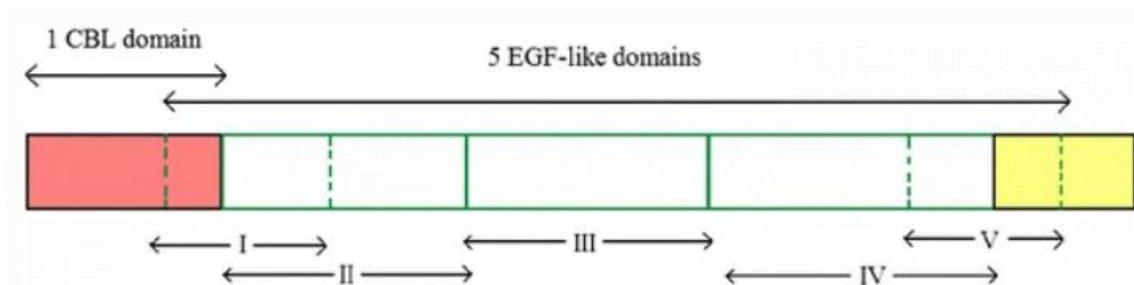
Según Céréde et al., (2002), MIC3 presente en los taquizoítos, es un producto final de 38 kDa (monómero), proveniente de la digestión proteolítica de un precursor de 40 kDa, que

posteriormente se pliega en un dímero de 90 kDa, mismo que es necesario para la función de adhesión.

En cuanto a su estructura, MIC3 contiene cinco dominios similares a EGF, tres de ellos forman una repetición en tándem, y los dos sobrantes se encuentran superpuestos a estos. Los dominios EGF, están presentes en diversas proteínas y se distribuyen en la región extracelular, sin embargo, no influyen en la adhesión entre MIC3 y las células (Wang & Yin, 2015). Así también, posee un dominio CBL, que brinda una fuerte afinidad por las células huésped, es importante para la virulencia y es necesario para promover las características de adhesión (Cérède et al., 2002), como se puede observar en la Figura 4.

Figura 4

Dibujo esquemático de las construcciones de MIC3.



Nota. Los dominios II, III y IV de EGF se repiten en tándem, I y V se superponen con otros dominios. Tomado de *Research advances in microneme protein 3 of Toxoplasma gondii* (p.6), por Wang & Yin, 2015, *Parasites & Vectors* 384 (2015).

Formación de Complejos

Durante el proceso de secreción, transporte y liberación, se forman complejos que ayudan a mejorar el reconocimiento y facilitan la entrada celular de MIC3. Estos, a su vez, presentan al menos una proteína que contiene un dominio transmembrana, además, de una

cola citoplasmática que posee una señal de clasificación. Esta señal, es necesaria para transportar el complejo desde el retículo endoplasmático (RE), hacia las ubicaciones relevantes de los micronemas (Wang & Yin, 2015). Para MIC3, la proteína de membrana escolta ideal es MIC8, formando el complejo MIC3/8. Juntos forman una fusión estable que permite su descarga fuera de los parásitos durante el proceso de invasión (Cérède et al., 2005).

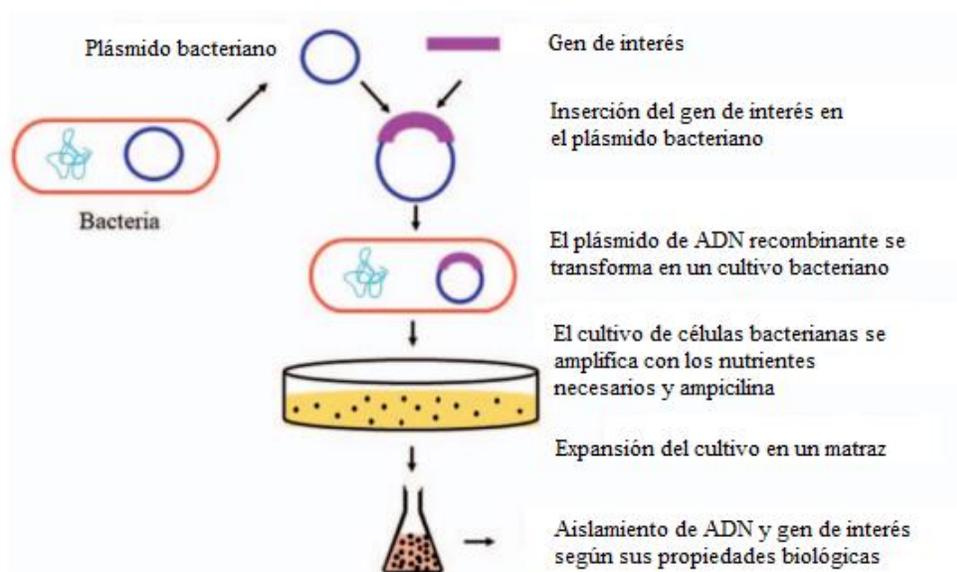
Proteínas Recombinantes

Las proteínas recombinantes han revolucionado el campo de la Biotecnología, debido a su uso como herramientas para el estudio de procesos biológicos (Rosano & Ceccarelli, 2014). En su mayoría se utilizan proteínas y glicoproteínas complejas que son difíciles de producir, para así, mejorar y promover su desarrollo en una amplia gama de plataformas de producción (Merlin et al., 2014).

Para su generación se requiere la selección de un sistema de expresión apropiado que permita obtener los rendimientos y calidad deseados (Frenkel, 2000). Entre los factores que se consideran están; la masa de la proteína, número de enlaces disulfuro, tipo de modificaciones postraduccionales y el destino de la proteína obtenida. Además, se debe considerar una posterior aplicación una vez purificada la proteína, ya sea para estudios estructurales, ensayos de actividad *in vitro*, *in vivo* o la generación de anticuerpos (Brondyk, 2009). En la Figura 5, consta un esquema respecto a la tecnología de ADN recombinante. (Abinaya & Viswanathan, 2021).

Figura 5

Tecnología de ADN Recombinante



Nota. Inserción del gen de interés en un plásmido bacteriano con la ayuda de enzimas (enzima de restricción para el corte y enzima ligasa para la unión). Adaptado de *Translational Biotechnology* (p.45), por Abinaya & Viswanathan, 2021, *Academic Press, ScienceDirect* (2021).

Producción de Proteínas Recombinantes

Actualmente la producción de proteínas recombinantes se encuentra relacionada con el desarrollo de nuevos fármacos y dianas farmacológicas, pero, ya que, las proteínas son moléculas complejas, estas no se pueden sintetizar químicamente (Overton, 2014). La forma idónea de fabricación, es valiéndose de procesos biológicos que generalmente suceden dentro de células huésped de una especie diferente de su origen (Demain & Vaishnav, 2009; Jia & Jeon, 2016).

Entonces, la primera decisión que se debe tomar es la elección del sistema huésped, para lo cual, se realiza un estudio a profundidad de las propiedades químicas de la proteína deseada (Overton, 2014). En general, las bacterias son ideales si se requiere la formación de

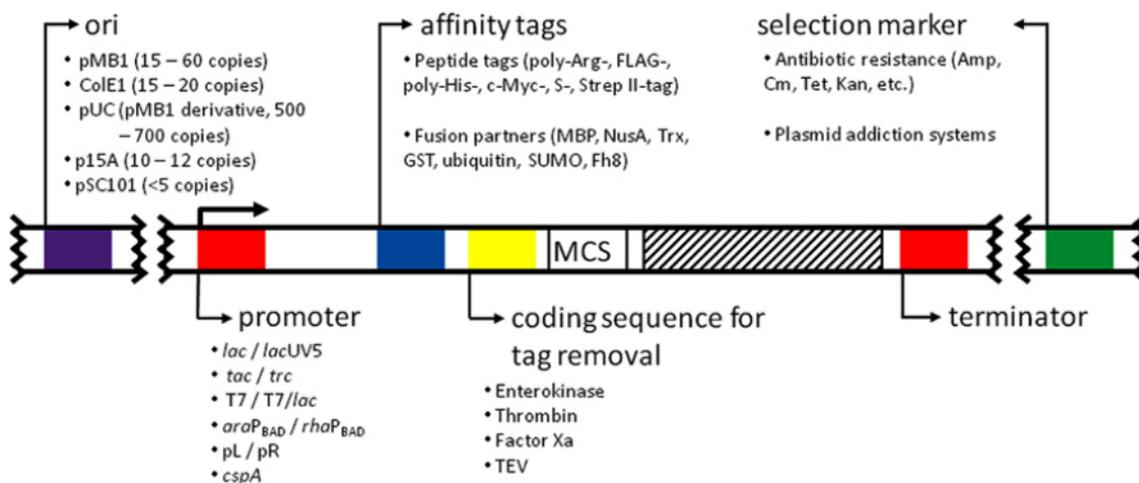
enlaces disulfuro (DSB), pero no son convenientes al momento de sintetizar proteínas en su forma glicosilada o con modificaciones postraduccionales (Brondyk, 2009; Rosano et al., 2019)

Siguiendo con el proceso, el gen que codifica la proteína de interés es clonado en el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector de expresión que contiene al menos un promotor, una región de iniciación de la traducción para dirigir la expresión de la secuencia codificante, un marcador, y elementos de replicación. Inclusive, el vector puede presentar elementos adicionales que faciliten la purificación de la proteína, como etiquetas de afinidad (Jia & Jeon, 2016; Rosano et al., 2019; Overton, 2014). En la Figura 6, se puede apreciar cada uno de los elementos mencionados que componen un vector de expresión.

A continuación, el vector se transforma en una cepa de *Escherichia coli*, y sus transformantes se cultivan en medio líquido. Pasado un tiempo de crecimiento, se activará el promotor en el vector de expresión gracias a la adición de un inductor químico, en consecuencia, el gen recombinante se expresa y la cadena polipeptídica recombinante se pliega en la proteína de interés, dando paso a su posterior liberación, captura y purificación (Jia & Jeon, 2016; Rosano & Ceccarelli, 2014; Rosano et al., 2019; Overton, 2014).

Figura 6

Estructura de un vector de expresión



Nota. Anatomía de un vector de expresión. Sitio de clonación múltiple (MCS), secuencia codificante para la proteína deseada (patrón a rayas). Tomado de *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges* (p.2), por Rosano & Ceccarelli, 2014, *Frontiers in microbiology*, 5(172).

Adicional, se debe considerar la variedad de modificaciones postraduccionales (PTM) de proteínas que se han detectado en bacterias, dado que intervienen en varios procesos celulares, como la síntesis de proteínas, metabolismo del nitrógeno, la persistencia y la virulencia (Macek et al., 2019). En la Tabla 1, constan las principales PTM de proteínas en bacterias.

Tabla 1

Principales PTM de proteínas en bacterias

Modificación	Detección	Características
Fosforilación	His, Asp, Arg, Ser, Thr, Tyr.	Fosforilación es catalizada por quinasas.

Modificación	Detección	Características
		Reacción inversa, la desfosforilación, es catalizada por fosfatasas.
Acetilación	Lys, proteínas amino terminales.	La acetilación neutraliza la carga positiva en la cadena lateral de Lys. La succinilación agrega una carga negativa.
Glicosilación	Asn, Arg, Ser, Thr	Actor clave en la fisiología bacteriana. Formas comunes: Ligado a N (unión de azúcares al átomo de nitrógeno de asparagina o arginina) Ligado a O (unión de azúcares a los grupos hidroxilo) Ligado a S (unión de azúcares al grupo tiol)
Lipidación	Cys	PTM enzimático reversible que implica la unión de cadenas lipídicas a un residuo de cisteína a través de un enlace tioéster Activa las toxinas bacterianas secretadas Contribuye a la adhesión e invasión de las células del huésped Brinda protección contra el sistema inmunitario del huésped.

Nota. Adaptado de *Protein post-translational modifications in bacteria* (p.2-7), Macek et al., 2019. *Nature Reviews Microbiology* (2019).

Proceso a Nivel de ADN

El promotor procariótico con más importancia es el promotor *lac*, componente importante del operón *lac* (Gatti-Lafranconi et al., 2013). Aquí, la lactosa provoca la inducción del sistema y con los niveles de glucosa bajos, se produce monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), necesario para la activación completa del operón *lac* (Rosano & Ceccarelli, 2014). Sin embargo, actualmente se prefiere el sistema pET, basado en la ARN polimerasa T7, para la producción de proteínas recombinantes (Overton, 2014).

Sistema pET. Para *E. coli*, el sistema más poderoso para la clonación y expresión de proteínas recombinantes es el sistema pET. En los vectores pET, se encuentra presente el sistema promotor T7, donde el gen de interés se clona detrás de un promotor reconocido por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (ARNP T7), luego, esta polimerasa se coloca en el genoma bacteriano de un profago (λ DE3) que codifica la ARNP T7 bajo el control transcripcional de un promotor mutante lacUV5 (Demain & Vaishnav, 2009; Mierendorf et al., 1998). De esta forma, el sistema logra ser inducido por lactosa o su análogo no hidrolizable el isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Du et al., 2021; Overton, 2014). Tras la adición de IPTG, de la región promotora *lac*, se libera LacI, permitiendo la transcripción y traducción del gen de la ARNP T7, y, en consecuencia, se activa la transcripción del promotor T7 ubicado en el plásmido de expresión pET, dando paso, a la clonación del gen recombinante de interés (Overton, 2014; Rosano et al., 2019).

Así también, se debe considerar al elegir el plásmido, el número de copias necesarias, teniendo en cuenta que un alto número no implica un aumento en los rendimientos de producción. En particular, la serie de vectores pET, poseen un origen pMB1, capaz de expresar de 15 a 60 copias por célula (del Solar & Espinosa, 2000). En la Tabla 2 constan las características predominantes de uno de los vectores de clonación más utilizados hoy en día, el vector pET-22b (+).

Tabla 2

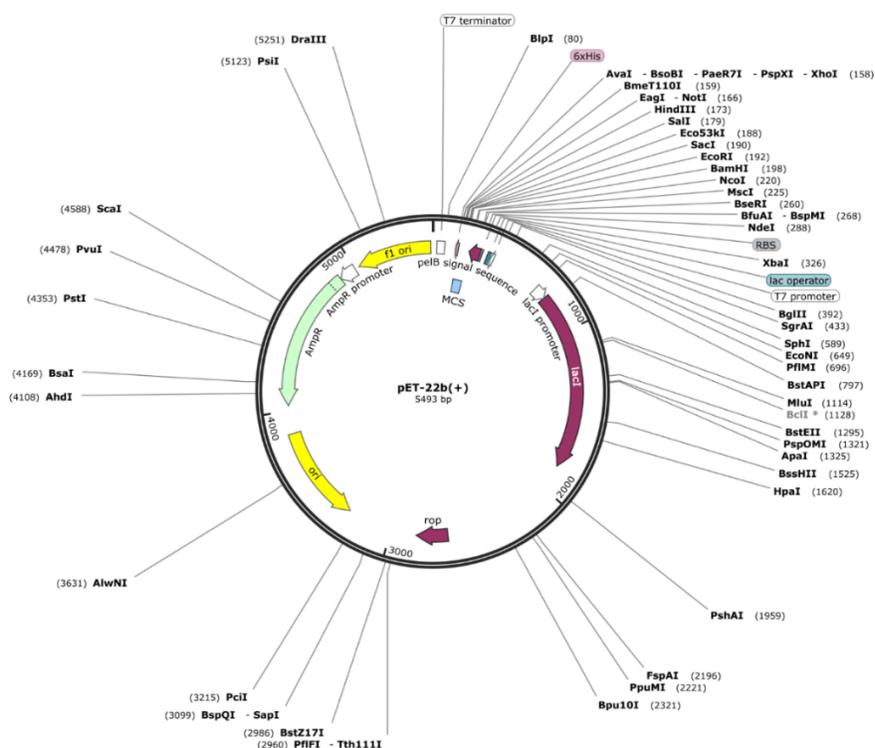
Características del Vector pET-22b (+)

Notación y triplete que expresa	a	GGA
	b	GAT
	c	ATC
Tamaño	5493 pb	
Resistencia	Ampicilina	
Promotor	<i>lacT7</i>	
Enzimas de Restricción	<i>EcoRI</i>	
	<i>SacI</i>	
	<i>SacII</i>	
	<i>HindIII</i>	
	<i>XhoI</i>	
Etiqueta de afinidad	<i>His-Tag</i> (C-terminal)	

Nota. Adaptado de *Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System* (p.3), Mierendorf et al., 1998. *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (2009).

Figura 7

Vector Bacteriano pET-22b (+)



Nota. Anatomía del plásmido pET22-b (+). SnapGene, 2022. Obtenido de:

<https://www.snapgene.com/resources/plasmid>

[files/?set=pet and duet vectors \(novagen\)&plasmid=pET-22b\(%2B\)](files/?set=pet and duet vectors (novagen)&plasmid=pET-22b(%2B))

Elección de Plataformas de Producción

Huéspedes. Existen varios sistemas de expresión para proteínas recombinantes, como consta en la Tabla 3, muchos de ellos son desafiantes, costosos y no prometen ser una opción viable, como el uso de sistemas eucarióticos superiores (Frenkel, 2000).

Sin embargo, entre los microorganismos, hay huéspedes disponibles capaces de facilitar el proceso e incluyen los sistemas de expresión procarióticos (*Escherichia coli*) y eucarióticos inferiores; levaduras (*Pichia pastoris*) (Thakur & Shankar, 2017).

Tabla 3*Ventajas y Desventajas de los Sistemas de Expresión*

Sistema de expresión	Ventajas	Desventajas
<i>E. coli</i>	Expresión rápida (días). Medios de bioproducción económicos y biomasa de alta densidad. Proceso fácil de escalado. Genes bien caracterizados.	Capacidad limitada para modificaciones postraduccionales. Dificultad para producir algunas proteínas en un estado soluble correctamente plegado.
<i>P. pastoris</i>	Método de expresión moderadamente rápido (semanas). Medios de bioproducción económicos y biomasa de alta densidad. La mayoría de las modificaciones postraduccionales y alta capacidad de plegado.	Precauciones de seguridad mejoradas necesarias para la bioproducción a gran escala debido al metanol en medios de inducción.
Baculovirus/ células de insectos	Método de expresión moderadamente rápido (semanas).	Biomasa de baja densidad y medios de bioproducción caros.

Sistema de expresión	Ventajas	Desventajas
	Alta capacidad de plegado.	
Mamífero: expresión transitoria	Método de expresión moderadamente rápido (semanas). Todas las modificaciones postraduccionales y alta capacidad de plegado.	Biomasa de baja densidad y medios de bioproducción caros. Escalado de procesos difíciles.
Mamífero: expresión estable	Todas las modificaciones postraduccionales y alta capacidad de plegado.	Método de expresión prolongado (meses). Biomasa de baja densidad y medios de bioproducción costosos. Difícil ampliación del proceso.

Nota. Adaptado de *Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein* (p.140), Brondyk, 2009, *Elsevier*.

Entre estos, *E. coli* presenta la ventaja de ser el sistema de expresión de afinidad y mejor caracterizado. Destaca su rápida tasa de crecimiento, fácil acceso y bajos costos de producción a pequeña y gran escala (Jia & Jeon, 2016). Inclusive, en comparación con las células eucariotas, en *E. coli* la tasa de traducción y plegamiento es casi 10 veces mayor, pero, en consecuencia, esto contribuye a la formación de cuerpos de inclusión (IB) (Brondyk, 2009).

En general, su uso como fábrica de células es la plataforma de expresión mejor acogida, por esta razón, existen variedad de herramientas y protocolos moleculares, así como, un amplio catálogo de plásmidos y cepas diseñadas (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Escherichia coli BL21(DE3). En las últimas décadas del siglo XX, se han estudiado diversas líneas de *E. coli*, pero en particular, la línea B consta como la mejor en cuanto a características para la producción de proteínas recombinantes (Rosano et al., 2019). Un derivado, BL21(DE3), presenta peculiaridades dignas de mención, sus células son deficientes en proteasa Lon (degrada proteínas extrañas), y carecen del gen que codifica para la proteína de membrana OmpT, (degrada proteínas extracelulares). A su vez, gracias a la mutación hsd SB presente en la cepa parenteral (B834), BL21 puede evitar la pérdida del plásmido (Rosano & Ceccarelli, 2014).

En BL21(DE3), la expresión del gen que codifica la proteína diana, está impulsada por la ARNP T7, que se halla en el plásmido pET, esta, a su vez, se encuentra bajo el control del promotor lacUV5 inducible por IPTG y su elección se prefiere, debido a que su tasa de transcripción es aproximadamente ocho veces más rápida en comparación con la ARN polimerasa (ARNP) de *E. coli* (Du et al., 2021). Recientemente, su genoma ha sido secuenciado y se encuentra disponible en la entrada *GenBank* CP001509.3 (Rosano et al., 2019).

Escherichia coli BL21(DE3) pLysS. Otra cepa popular es BL21(DE3) pLysS, encargada de la expresión basal, se diferencia de la BL21 tradicional por presentar un plásmido pLysS con el gen de la lisozima T7, un inhibidor natural de la ARNP T7. De esta forma, es capaz de brindar un control más estricto, evitando las fugas que se dan en la expresión sin la presencia del inductor (IPTG) (Rosano et al., 2019). En casos donde las células sean muy

tóxicas, se prefiere la combinación de un vector que contenga lacT7 y pLsS, dado que, puede facilitar la preparación de extractos celulares (Heyde & Nørholm, 2021).

Separación de Células y Recolección de Productos a partir de E. coli BL21

Una vez obtenida la proteína recombinante mediante el sistema de producción escogido, el producto debe separarse y recuperarse del huésped, ya sea eliminando o aislado las células huésped para continuar con su posterior purificación (Pieracci et al., 2018).

Particularmente, en *E. coli*, la producción de proteínas recombinantes puede darse como resultado de proteínas que se expresan de forma intracelular y pasar a localizarse tanto en el espacio citoplasmático (altamente reductor), como en el periplasmático (oxidativo), o de forma extracelular (Pieracci et al., 2018). Sin embargo, destaca la producción intracelular en forma de cuerpos de inclusión (Rodríguez-Carmona et al., 2010; Rosano & Ceccarelli, 2014).

Tras la formación de los cuerpos de inclusión, estos deben ser liberados y, para ello, se debe romper tanto la membrana externa, como la membrana interna citoplasmática. Los métodos de disrupción celular son variados y difieren significativamente en términos de escalabilidad y costo (Middelberg, 1995; Pham, 2018). En la Tabla 4 constan distintas estrategias para superar problemas comunes durante la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Tabla 4

Estrategias Utilizadas en la Producción de Proteínas Recombinante en E. coli

Problema	Posible explicación	Soluciones
Ninguna o baja expresión	La proteína puede ser tóxica antes de la inducción.	Controlar la inducción basal al agregar glucosa en caso de usar promotores basados en lac. Usar cepas portadoras de pLysS/pLysE en sistemas basados en T7.
	La proteína puede ser tóxica después de la inducción	Menor número de copias del plásmido. Usar cepas que permitan el control de la inducción.
	Sesgo de codón	Menor número de copias del plásmido. Probar nuevas formulaciones de medios. Proporcionar una buena aireación y evitar la formación de espuma.
Formación de cuerpos de inclusión	Formación incorrecta de enlaces disulfuro	Proteína directa al periplasma. Usar cepas de <i>E. coli</i> con ambiente citoplasmático oxidativo.
	Plegado incorrecto	Disrupción celular: Métodos mecánicos como cizallamiento, colisión o cavitación para romper las membranas celulares. Métodos químicos para lograr la ruptura de la membrana celular gracias a la adición de un agente químico.

Problema	Posible explicación	Soluciones
Inactividad de proteínas	Plegado incompleto	<p>Métodos físicos como el choque osmótico, tratamiento térmico y congelación/descongelación.</p> <p>Métodos enzimáticos usando enzimas (lisozimas), para debilitar la capa de peptidoglicano y membrana celular.</p> <p>Temperatura más baja.</p> <p>Supervisar la formación de enlaces disulfuro.</p>

Nota. Adaptado de *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges* (p.8), Rosano & Ceccarelli, 2014, *Frontiers in Microbiology* (2014).

Purificación de Proteínas

Después de la expresión del cultivo celular y las operaciones de recolección subsiguientes, el producto objetivo se somete a su purificación. Este proceso se enfoca en aislar las proteínas de una mezcla compleja conservando su actividad biológica e integridad química (Rosano & Ceccarelli, 2014). (Labrou, 2014). Es considerado el paso más laborioso, ya que, la proteína purificada debe estar libre no solo de contaminantes (ácidos nucleicos, virus, pirógenos, proteínas residuales de la célula huésped, medios de cultivo celular, lixiviados de los medios de separación), sino también, de la presencia de varias isoformas originadas por modificaciones postraduccionales (Labrou, 2014).

Posteriormente, la separación puede enfocarse en explotar las diferencias en las propiedades químicas, estructurales y funcionales que existen entre la proteína de interés y

otras proteínas presentes en la mezcla cruda. De esta forma, los procesos cromatográficos y de fraccionamiento permiten diseñar un esquema de purificación viable (Milne, 2017; Labrou, 2021). Se tiene en la Tabla 5, los tipos de cromatografía más utilizados en la purificación de proteínas recombinantes.

Tabla 5

Características de los Tipos de Cromatografía.

Tipo de cromatografía	Clasificación	Características	Referencias
Cromatografía de afinidad	Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC)	<p>Importante en la detección de metaloproteínas, proteínas marcadas con histidina y proteínas fosforiladas.</p> <p>Su fase estacionaria consta de un ligando quelante inmovilizado que forma un complejo con un ion metálico. Se utiliza Ni(II), Cu(II), Zn(II), Fe(III) o Ga(III) para el aislamiento y la purificación de proteínas marcadas con histidina y proteínas fosforiladas.</p>	(Hage et al., 2017)

Tipo de cromatografía	Clasificación	Características	Referencias
	Cromatografía de intercambio catiónico (CIEC)	Los ligandos cargados negativamente se unen a moléculas cargadas positivamente.	(Grönberg, 2018)
Cromatografía de intercambio iónico (IEC)	Cromatografía de intercambio aniónico (AIEC)	Los ligandos cargados positivamente se unen a moléculas cargadas negativamente. Más utilizada, dado que muchas proteínas recombinantes son ácidas, y, por lo tanto, cargadas negativamente a pH neutro	(Grönberg, 2018)

Identificación y Visualización de Proteínas

En particular las técnicas de electroforesis pueden ser una herramienta valiosa para comprender la actividad biológica y el significado de una proteína dentro de un sistema vivo, así también, sirven de guía en los esquemas de purificación de proteínas (Grönberg, 2018). En la Tabla 6 destacan los tipos de electroforesis en gel usados en la identificación de proteínas.

Tabla 6*Ventajas y Desventajas de los Tipos de Electroforesis en Gel*

Tipo	Ventajas	Desventajas	Referencias
Gel de agarosa	El gel no es tóxico, fácil y rápido de aplicar. Bueno para separar grandes moléculas de ADN. Al fundir el gel se pueden recuperar las muestras.	Alto costo de la agarosa. Bandas borrosas. Mala separación de muestras de bajo peso molecular.	(Hage et al., 2017)
Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	Gel reticulado químicamente estable. Buena para separar muestras de bajo peso molecular.	Monómeros tóxicos. Procedimiento tedioso de preparación del gel. Requiere un gel nuevo para cada experimento.	(Rodriguez et al., 2020)

Capítulo III

Materiales y Métodos.

Localización Geográfica

El presente trabajo de integración curricular se ejecutó en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología perteneciente al departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en Av. General Rumiñahui S/N y Ambato, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, Ecuador.

Purificación del Plásmido *E. coli* JM109 Recombinante

Se seleccionaron 8 tubos de bacteria conservados en la refrigeradora de -80 °C y se sembraron en medio líquido en un volumen de 2 mL (medio LB + 20 µl de ampicilina + 25 µl de glucosa), y se llevaron a incubación a 37 °C con agitación a 200 rpm toda la noche.

Posteriormente, se usó el Kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)* para la purificación del plásmido *E. coli* JM109 recombinante, para lo cual, en la fase de lisado, se agregó 600 µl de cultivo bacteriano, 100 µl de tampón lisis, 350 µl de solución neutralizante, misma que se mezcló por inversión y se centrifugó por 3 min a velocidad máxima. Luego, los 900 µl de sobrenadante resultante se transfirieron a las columnas del Kit y se centrifugaron nuevamente a máxima velocidad, pero el tiempo se disminuyó a 15s.

En cuanto a la fase de lavado, se agregó 200 µl de tampón de remoción de endotoxinas y se centrifugó a máxima velocidad por 15s, luego se adicionó 400 µl de solución de lavado y se centrifugó a velocidad máxima, pero por 30s. Finalmente, para la fase de elución, se añadió 15 µl de tampón de elución, se incubó por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a máxima velocidad por 15s y se desechó el pellet. Los resultados del sobrenadante obtenido

para cada uno de los 8 tubos fueron cuantificados en el *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific™ J999*) y se corrieron en gel de agarosa al 1%.

Verificación de *E. coli* JM109 Recombinante

Para validar los resultados obtenidos en la cuantificación de los plásmidos recombinantes, se realizó el corte con la enzima de restricción EcoRV (*Ref: R6351, Promega*), según la Tabla 7.

Tabla 7

Corte con Enzima de Restricción EcoRV

Compuesto	1X (µl)	9X (µl)
Tampón de enzima EcoRV (10x)	2	18
Enzima EcoRV	0.5	4.5
Plásmido (1 µg/mL)	5	45
BSA acetilado (10 µg/mL)	0.2	1.8
Agua DEPC	12.3	110.7
Total	20	180

Con las muestras listas, se incubó en el Termobloque (*Ref: 88810, Thermo-Shaker*) a 37 °C por 2 h y se realizó su inactivación subiendo la temperatura a 65 °C por 15 min. Finalmente, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1%.

Aislamiento y Clonación de *E. coli* BL21

Partiendo de la purificación del plásmido en *E. coli* JM109, se seleccionó aquel que poseía la mayor concentración medida en el *Nanodrop*. A su vez, se prepararon medios de

cultivo (medio LB + 10 μ l/mL de ampicilina + 12.5 μ l/mL de glucosa), además de un control positivo (medio LB) y un control negativo (Cloranfenicol).

Para la clonación se utilizó el vial BL21 (DE3) pLysS *Competent Cells* (Ref: L1195, Promega) y se añadió 5 μ l del plásmido seleccionado. Se incubó por 20 min en hielo y después se llevó a baño maría en el termobloque en una temperatura de 42 °C por 1 min. Después, se incubó por 2 min en hielo y se añadió 250 μ l de medio SOC en el vial y se llevó a incubación a 37 °C por 1h y 30 min con agitación constante de 225 rpm. Posteriormente, se dispensó en los medios de cultivo establecidos y se incubaron toda la noche a 37 °C en condiciones estériles.

Colony PCR para Verificación de E. coli BL21 Recombinante

Seguido al paso de clonación, se seleccionaron y marcaron en los medios de cultivo las colonias aisladas más uniformes. El procedimiento se realizó para un total de 8 colonias según la Tabla 8, considerando que el ADN molde se introdujo en los tubos de la reacción PCR al hacer punción con una punta para micropipeta en cada una de las colonias transformadas con el plásmido. Las condiciones fueron: 95°C 5 min., 95°C 30 seg., 65°C 30 seg., y 72°C por 10 min. El resultado se corrió en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 8

Colony PCR para E.coli BL21 Recombinante

Compuesto	1X (μl)	9X (μl)
Tampón PCR (10x)	2.5	22.5
dNTPs (10 mM)	0.5	4.5
MgCl ₂	1.5	13.5
Primer Forward	0.5	4.5

Compuesto	1X (μl)	9X (μl)
Primer reverse	0.5	4.5
Platinum Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)	0.2	1.8
Agua DEPC	18.3	164.7
<i>E. coli</i> BL21	1	9
Total	25	225

Expresión Génica

La cepa BL21 de *E. coli* transformada con plásmido recombinante se cultivó en medio Luria Bertani (LB) suplementado con 10μl/ml de ampicilina, en incubación a 37 °C con agitación de 200 rpm durante toda la noche. Se inocularon cinco matraces de 250 mL con 10 mL de LB que contenía 10 μl/mL de ampicilina con muestras de 1,5 mL de los cultivos de toda la noche. Las muestras se cultivaron a 37 °C con agitación constante de 200 rpm hasta obtener una absorbancia OD600 ~0,6-0,7. Los cultivos se indujeron con diversas concentraciones de (IPTG).

Ensayos Variando la Concentración de (IPTG)

Se realizaron cuatro ensayos con diversas concentraciones de (IPTG), además de un ensayo control en ausencia de este componente. Posteriormente se midió su absorbancia durante 1,2,3,4,5 y 24 horas respectivamente. Los ensayos constan de manera concreta en la Tabla 9.

Tabla 9

Parámetros usados en ensayos de inducción por IPTG

Ensayo	[IPTG]	Temperatura ° C	rpm	Horas
A	1 mM	37	200	1,2,3,4,5 y 24
B	1 mM	Ambiente	300	1,2,3,4,5 y 24
C	0,05 mM	37	200	2,4 y 24
D	0,1 mM	37	200	2,4 y 24
E	-	37	200	1,2,3,4,5 y 24

Obtención del Pellet de Expresión Génica de E.coli BL21 recombinante y SDS-PAGE

Una vez concluidas las 24 horas de expresión por (IPTG), se seleccionó el mejor ensayo mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) en gel de concentración al 4% y gel de separación al 8%. Para ello, se obtuvo el pellet de cada ensayo usando la centrifuga con refrigeración (*Ref: MIKRO 200, Hettich*) a 3000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, este se resuspendió en proporción (1:1) de tampón fosfato (PB) y tampón de carga 2X (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8, 2.5 mL; SDS 0.4 g; glicerol 2 mL; azul de bromofenol 20 mg; 2-mercaptoetanol 400 µl y dH₂O). Se homogenizaron las muestras y se desnaturalizaron usando el termobloque a 100 °C por 10 minutos sin agitación. Al culminar el proceso, las muestras se verificaron mediante la tinción de azul de Coomassie por 10 minutos y se leyeron usando el sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System (Ref.:12003154, Bio-Rad)*.

Lisis Celular de E.coli BL21 recombinante

Los cultivos se indujeron de acuerdo al Ensayo C, para lo cual, se aumentó el volumen de producción inoculando matraces de 500 mL con 50 mL de LB suplementado con 500µl/ml de ampicilina, con muestras de 3 ml de los cultivos de toda la noche. Las muestras se

cultivaron a 37 °C con agitación constante de 200 rpm hasta obtener una absorbancia OD600 ~0,6-0,7. Pasadas cuatro horas las muestras se sedimentaron mediante centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El pellet se lavó en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) I pH 7 (NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM y dH₂O hasta 1 L) tres veces y se resuspendió en 500 µl de PBS I. El pellet celular fue sonificado seis veces en pulsos de 30 segundos usando el sonicador (*Ref.: 13413619, Branson Ultrasonics™ CPX-952-238R*) y centrifugado a 12.000 rpm durante 10 minutos. De esta manera, se conservó el sobrenadante en la refrigeradora de -20 °C.

Comprobación de la Presencia de MIC3 Mediante Western Blot

Para el protocolo de Western Blot, se realizó (SDS-PAGE) como primer paso, por ello, se tomó dos alícuotas de 10 µl de las muestras obtenidas por lisis de MIC3/BL21, y se cargaron en gel de poliacrilamida al 4% de concentración y 9% de separación en proporción 1:1 respecto al tampón de carga 2x. Posteriormente, se tiñó uno de los geles con azul de Coomassie a modo de comprobación, y se reveló su resultado en sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System*.

El gel sobrante, fue colocado en tampón de transferencia 1X (Glicina 200mM, Tris-base 25mM, etanol absoluto 20% y SDS 0.0376%). A su vez, se preparó la membrana de nitrocelulosa y dentro del *cassete* del módulo *Mini Trans-Blot* del sistema *Mini PROTEAN (Biorad)*, se realizó una especie de sánduche usando papel Whatman. Básicamente, el ensamblaje consistió en colocar capas de papel Whatman seguido de gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y finalmente, nuevamente papel Whatman. Se removieron los excesos de tampón de transferencia con un rodillo y el sistema de transferencia en medio semi-

seco, se transfirió al equipo *Mini PROTEAN (Biorad)*. El sistema realizó tres ciclos de 2.5 A y 25 V, durante siete minutos.

Se verificó la presencia de proteínas, sumergiendo la membrana en una solución de rojo Ponceau (Ponceau S 0.5%, ácido glacial 1%). Posteriormente, se lavó la membrana con TBS 1X (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) por diez minutos y luego, se manipuló la membrana con pinzas y se colocó en un tubo Eppendorf de 15 mL con solución de bloqueo (tampón TBS, Tween 20 0.1%, BSA 5%) y se mantuvo en incubación por una hora en agitación constante. Pasado el tiempo requerido, se realizaron seis lavados a la membrana con TTBS (tampón TBS y Tween 20% 0.1%). Seguidamente, se preparó la solución de anticuerpo primario (tampón TTBS, BSA 3%) usando suero de *Toxoplasma gondii* en dilución (1:50) y se dejó en incubación toda la noche.

El anticuerpo secundario (GAM-HRP S1410 Anti-Human, 1:20000; tampón TTBS) se incubó por una hora en temperatura ambiente con agitación constante. Después, se colocó la solución sustrato *Clarity ECL Western Blot* (solución peróxido de luminol y solución de luminol, 1:1) y se incubó por cinco minutos en oscuridad. Finalmente, se realizó la lectura de la membrana usando el sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System*

Purificación *E. coli* BL21 Recombinante por Cromatografía

Se realizaron dos protocolos de purificación de proteínas por cromatografía tanto de afinidad y de intercambio iónico.

Purificación por Cromatografía de Afinidad

El sobrenadante obtenido por lisis fue acondicionado a un pH de 7.4, según la preparación del tampón de unión (20 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, 30m M Imidazol) recomendado en el inserto de la columna de Sefarosa inmovilizada con Níquel HisTrap™ HP

de 1 mL (*Cytiva Ref.: 71502768 AL*). Además, se preparó algunas variantes del tampón de elución según consta en la Tabla 10.

Tabla 10

Variantes Preparadas del Tampón de Elución

Ensayo	Componentes	pH
A	20 mM Na ₃ PO ₄ , 500 mM NaCl y 500 mM de Imidazol	7.4
B	20 mM Na ₃ PO ₄ , 500 mM NaCl y 250 mM de Imidazol	7.4
C	20 mM Na ₃ PO ₄ , 300 mM NaCl y 250 mM de Imidazol	8
D	50 mM Na ₃ PO ₄ , 300 mM NaCl y 500 mM de Imidazol	8
E	20 mM Na ₃ PO ₄ , 500 mM NaCl y 250 mM de Imidazol	6.4

La muestra acondicionada con un volumen final de 3 mL, se filtró con un filtro de jeringa PES de 0,45 µm (*Thermo Scientific*), a su vez, se realizó el blanco de la columna lavándola con 5 volúmenes de columna (VC) de agua destilada, seguido del lavado con 5 VC de tampón de elución y fue equilibrada con 10 VC de tampón de unión.

Para el proceso de purificación, se equilibró la columna con 5 VC de tampón de unión y se mantuvo un caudal de 1 mL/min, seguido se aplicó con jeringa la muestra de la proteína acondicionada y se recolectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, se lavó la columna con 10 VC de tampón de unión y se conservó su remanente igualmente en tubos de 1.5 mL, hasta que la absorbancia se estabilizó (fracciones negativas), de esta forma, se continuó con 5 VC de tampón de elución y se conservó cada mL en tubos de 1.5 (fracciones positivas) hasta recuperar la proteína. Finalmente, todas las muestras obtenidas se cuantificaron mediante espectrofotometría en el *NanoDrop* a 280 nm.

Purificación por Cromatografía de Intercambio Iónico

Se quitó el embolo de una jeringa de 10 mL y se realizó el empaquetamiento de la columna DEAE Sefarosa Fast Flow (Ref.: DFF100-50mL, Sigma Aldrich) con 6 mL de este reactivo con ayuda de una micropipeta. Posteriormente, se dejó decantar la solución toda la noche y se retiró el sobrenadante. Con esto, se preparó cada una de las soluciones para la posterior purificación según la Tabla 11.

Tabla 11

Soluciones Usadas en la Purificación en Columna DEAE

Solución	Componentes	pH
Tampón de inicio/equilibrio	Tampón Tris HCl 20 mM	7.5
Tampón de elución 1	Tampón Tris HCl 20 mM, NaCl 0.1 M	7.5
Tampón de elución 2	Tampón Tris HCl 20 mM, NaCl 0.2 M	7.5
Tampón de elución 3	Tampón Tris HCl 20 mM, NaCl 0.3 M	7.5
Tampón de elución 4	Tampón Tris HCl 20 mM, NaCl 0.4 M	7.5
Tampón de elución 5	Tampón Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M	7.5
Tampón de elución 6	Tampón Tris HCl 20 mM, NaCl 1 M	7.5
Solución de lavado	dH ₂ O, NaCl 2M	-

Los tampones se prepararon teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de la proteína requerida, ya que, el pH usado debía ser al menos una unidad mayor a este. Se lavó la resina con 12 mL de agua destilada autoclavada y se equilibró la columna con 12 mL de tampón de inicio. La muestra se preparó en proporción v/v 1:5 (proteína: tampón de inicio) y se acondicionó a un pH de 7.5 como se observa en la Tabla 12.

Tabla 12

Preparación de la Muestra para la Columna DEAE

Proteína Recombinante	Concentración de proteína (mg/mL)	Volumen de la proteína (mL)	Volumen del tampón de inicio (mL)	Volumen total (mL)
MIC3	10,513	0.495	2.475	2.97

Se adicionó el volumen total de muestra preparada y se inició el gradiente de elución mediante lavados de 12 mL de los tampones de elución (1-6) como se puede observar en la Figura 8.

Figura 8

Protocolo de Cromatografía de Afinidad de Intercambio Iónico



Nota. Pasos seguidos para la cromatografía de afinidad de intercambio iónico en columna DEAE. *Biorender.*

Concentración de la Proteína MIC3 Mediante Unidades de Filtración Centrifuga

La proteína obtenida tanto de la purificación por cromatografía de afinidad, como aquella obtenida por cromatografía de intercambio iónico, fueron concentradas usando unidades de filtración centrifuga Ultra-4 Amicon® (*Ref.: 805024, Merk*) de 50K para volúmenes de 4 mL. Para aquello, se colocó 4 mL de las fracciones que resultaron positivas después de su medición en el *Nanodrop* y se centrifugaron a 4°C a 7500 g por 15 min. Luego, se recolectó el volumen remanente de la membrana con la ayuda de una micropipeta y nuevamente fueron cuantificadas con ayuda del *Nanodrop*.

Verificación de la Presencia de la Proteína MIC3 por SDS-PAGE

Después de concentrar la proteína, se tomaron alícuotas de 10 µl y se cargaron en proporción 1:1 con tampón de carga 2x en un gel de poliacrilamida al 4% de concentración y 9% de separación. El gel se tiñó con azul de Coomassie por 8 min y se mantuvo en solución de lavado durante 2 días antes de leer los resultados el sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System*.

Capítulo IV

Resultados

Expresión de Proteína MIC3 en *E. coli* JM109 Recombinante

Purificación del Plásmido

En la Tabla 13 constan las absorbancias obtenidas para cada una de las muestras seleccionadas de -80 °C que contienen la proteína de interés MIC3 en el plásmido pET-22b (+) de la cepa de *E. coli* JM109. La muestra 4 con una absorbancia de 26.7 ng/μl, representa el valor más alto obtenido en la cuantificación, pero, a modo de confirmación se puede observar en la Figura 9, la presencia de la banda que representa a la proteína MIC3 en un gel de agarosa al 1%.

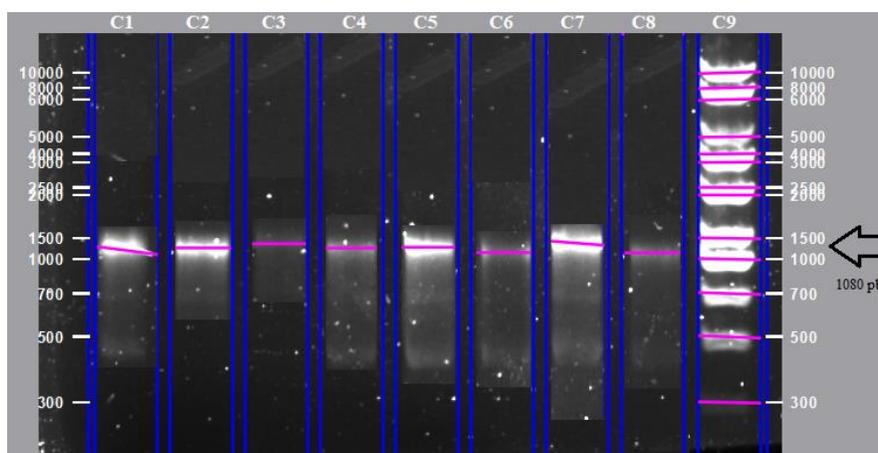
Tabla 13

Concentraciones Obtenidas en el Nanodrop para E. coli JM109 a partir de cDNA

Muestra	Ácido Nucleico (ng/μl)
1	22.8
2	19.5
3	26.4
4	26.7
5	24.2
6	23.7
7	24.3
8	25.9

Figura 9

Electroforesis en Gel Agarosa de la Purificación del Plásmido en E.coli JM109



Nota. Gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Ref.: R1000-1KB, Labnet) (C8). Tamaño de las bandas de 1080 pb. Las concentraciones variaron en cada carril. Para C1 (2.28 ng/μl); C2 (1.95 ng/μl); C3 (2.64 ng/μl); C4 (2.67 ng/μl); C5 (2.42 ng/μl); C6 (2.37 ng/μl); C7 (2.43 ng/μl) y C8 (2.59 ng/μl). *ImageLab.*

Verificación con Enzima de Restricción *EcoRV*

Se verificó la presencia de MIC3 en *E. coli* JM109 usando la enzima de restricción *EcoRV*, misma que generó 2 cortes que se encuentran detallados en la Tabla 14 y se pueden observar en la Figura 10 y comprobar en la Figura 11.

Tabla 14

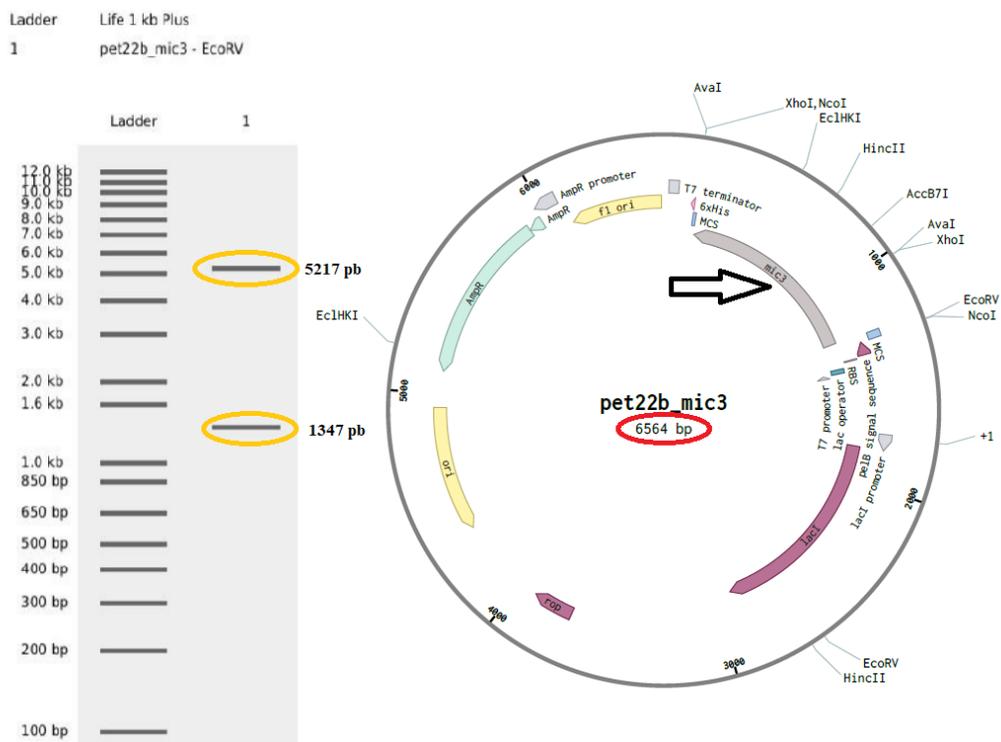
*Sitios de Corte de la Enzima de Restricción *EcoRV* en el Plásmido Recombinante *E.coli* JM109*

Enzima	Cortes	Temperatura de incubación
EcoRV	2	37°C

Comienzo del corte	Final del corte	Tamaño (bp)
1289	2635	1347
2636	1288	5217

Figura 10

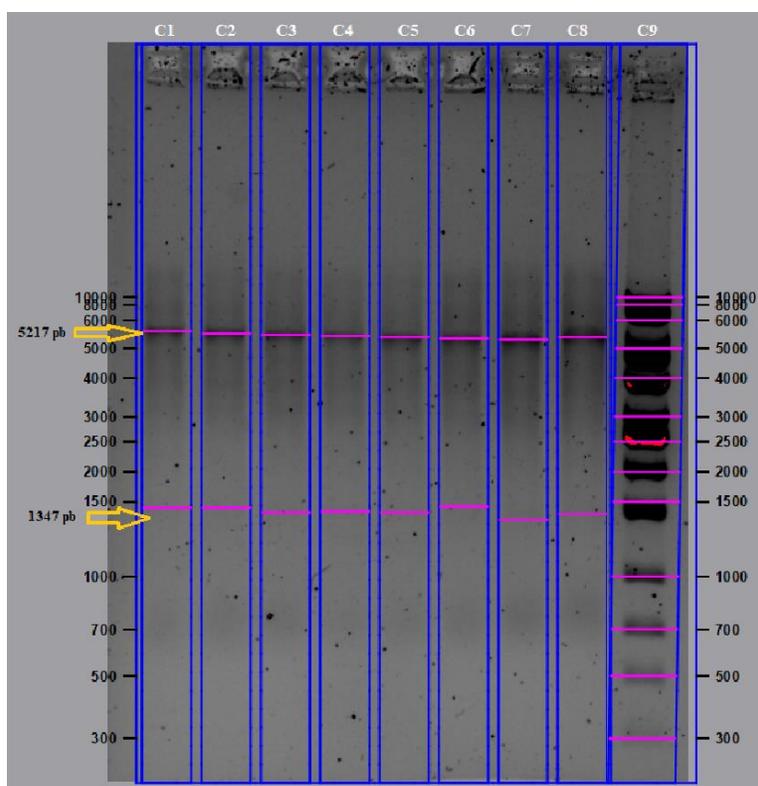
Cortes en Plásmido pET-22b (+) Usando Enzima de Restricción EcoRV



Nota. Primer corte generado por EcoRV en 1347 pb, seguido de un segundo corte en 5217 pb (amarillo). Tamaño del plásmido pET-22b (+) recombinante de 6564 pb (rojo). Sitio de clonación múltiple (MCS), presencia de la proteína MIC3 (flecha). *Benchling.*

Figura 11

Comprobación con Enzima de Restricción EcoRV en Gel de Agarosa



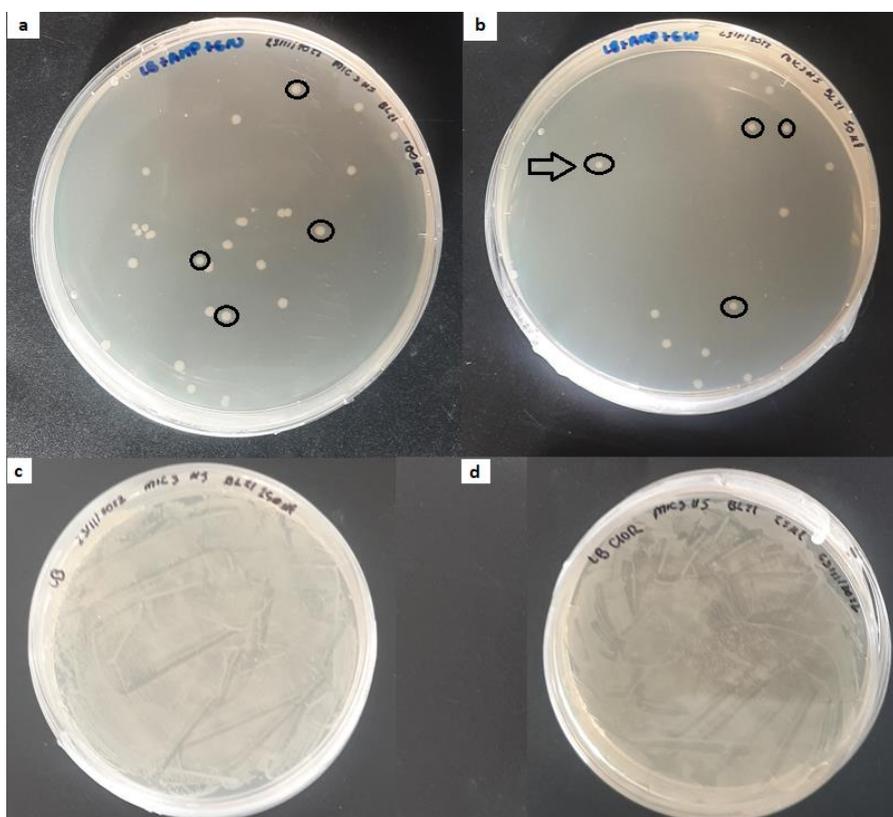
Nota. Gel de agarosa al 1%. Presencia de bandas en 1347 pb y 5217 pb en carriles (C1-C8). Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Ref.: R1000-1KB, *Labnet*) (C9). Las concentraciones variaron en cada carril. Para C1 (1.14 ng/μl); C2 (0.98 ng/μL); C3 (1.32 ng/μL); C4 (1.34 ng/μL); C5 (1.21 ng/μL); C6 (1.19 ng/μL); C7 (1.22 ng/μL) y C8 (1.30 ng/μL). *ImageLab.*

Clonación en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Competent Cells

Tanto para los medios en los que se agregó 100 μ L (Figura 12a) y 50 μ L (Figura 12b) del producto de clonación, existió crecimiento de colonias. De estas, se seleccionaron aquellas con bordes uniformes que se encontraban aisladas, dando un total de ocho colonias entre ambas cajas Petri. Además, en el medio de control positivo (LB) existió crecimiento masivo, al igual que en el medio usado como control negativo (Cloranfenicol).

Figura 12

Clonación en *E. coli* BL21 (DE3)



Nota. Patrón de colonias seleccionadas (Flecha). 100 μ L del producto de clonación en medio LB + ampicilina + glucosa (a). 50 μ L del producto de clonación en medio LB + ampicilina + glucosa

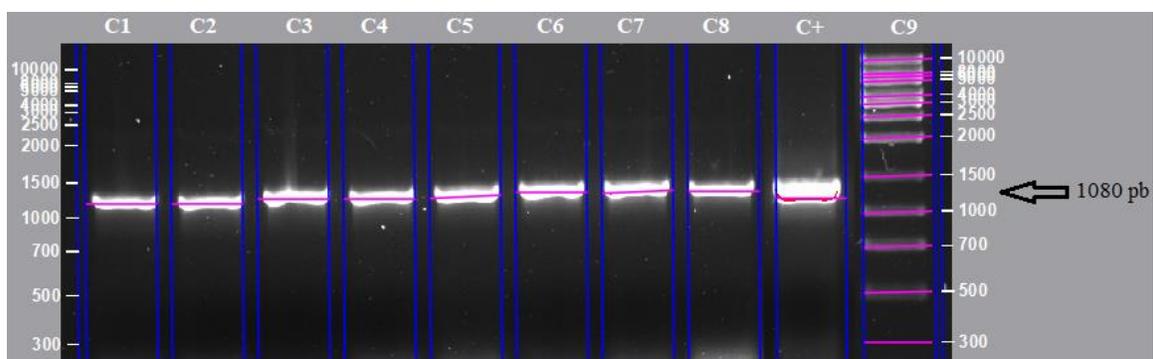
(b). Control (+), 25 μ L del producto de clonación en medio LB (c). Control (-), 25 μ l del producto de clonación en medio con Cloranfenicol (d).

Verificación con Colony PCR de *E. coli* BL21 Recombinante

Cada una de las colonias seleccionadas de los medios de cultivo con producto de clonación resultaron positivas para *E. coli* BL21 en comparación con el control positivo como se puede observar en la Figura 13.

Figura 13

Colony PCR para E. coli BL21 (DE3)



Nota. Gel de agarosa al 1%. Presencia de bandas en 1080 pb (flecha). Cepas seleccionadas de la clonación en *E. coli* BL21(C1-C8). Control positivo de *E. coli* BL21(C+). Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Ref.: R1000-1KB, Labnet) (C9). ImageLab.

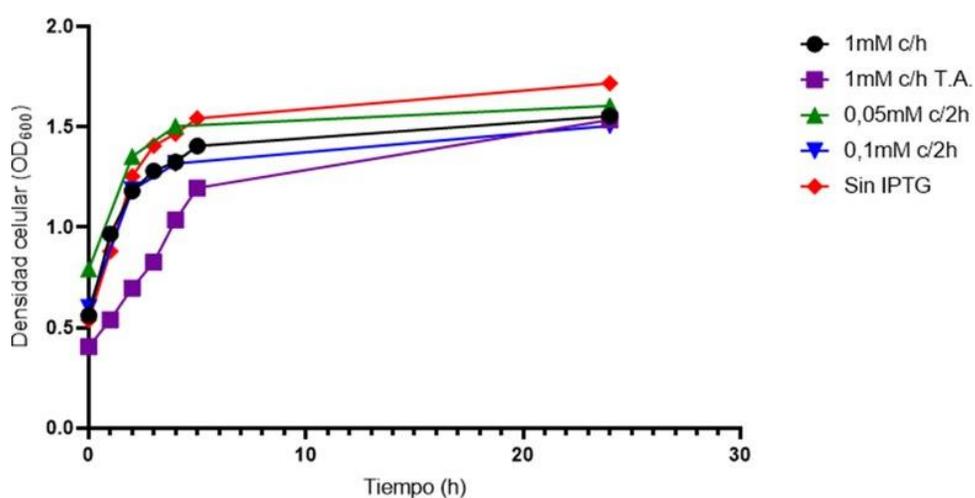
Estandarización de la concentración de (IPTG) en *E. coli* BL21 Recombinante

En la Figura 14, se observa el crecimiento de *E. coli* BL21 en referencia a un OD600 en función de los tiempos establecidos en la Tabla 9. Al comparar los valores provenientes de la medición de absorbancia para cada concentración de IPTG en las horas establecidas, se obtuvo que todas las muestras se estabilizaron en un tiempo de cuatro horas, además la mejor concentración para la inducción fue de 0.05mM y su resultado en (SDS-PAGE) coincide con el

tamaño de la proteína MIC3 de 38 kDa como se observa en la Figura 14. Así también, se puede observar que, al conservar las muestras en temperatura ambiente, estas tienen un crecimiento más lento.

Figura 14

Estandarización de las concentraciones de (IPTG) para la Proteína MIC3

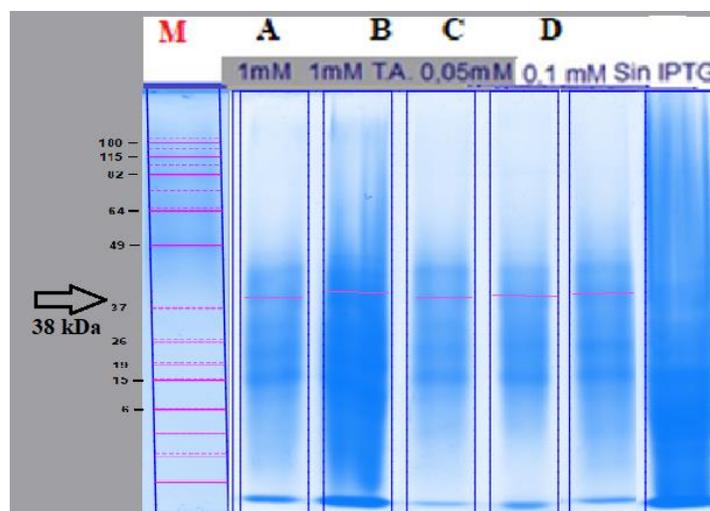


Nota. Absorbancia obtenida de la inducción de la proteína MIC3 a 1,2,3,4,5 y 24 horas (ejeX). Densidad celular obtenida OD600 (ejeY). IPTG [1mM] c/h (rojo); IPTG [1mM] c/h T.A. (morado); IPTG [0.05mM] c/2h (verde); IPTG [0.1mM] c/2h (azul); Sin IPTG c/h (rojo). *GraphPad Prism 8.*

En la Figura 15, se muestran los resultados de la expresión de MIC3 a las cuatro horas, mismo que representa el tiempo en que el crecimiento se estabiliza.

Figura 15

Gel de poliacrilamida de la Estandarización de las concentraciones de (IPTG) para la Proteína MIC3 en (t4).



Nota. Gel de poliacrilamida 9% de concentración, 4% de separación. Los parámetros para los ensayos (A-D), se encuentran detallados en la Tabla 9. Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (*Ref.: R1000-1KB, Labnet*). Ensayo para t4 (tiempo a las cuatro horas de inducción), presentó bandas en 38 kDa.

Lisis Celular de MIC3/BL21

Se cargaron tanto los pellets como los sobrenadantes obtenidos por lisis mediante lavados de PBS, aun así, la presencia de bandas solo se puede observar en los sobrenadantes como consta en la Figura 16, lo que implica que no quedaron remanentes de proteína en el sedimento. En la Tabla 15, se encuentran los datos pertenecientes a la absorbancia medida a 280 nm.

Tabla 15

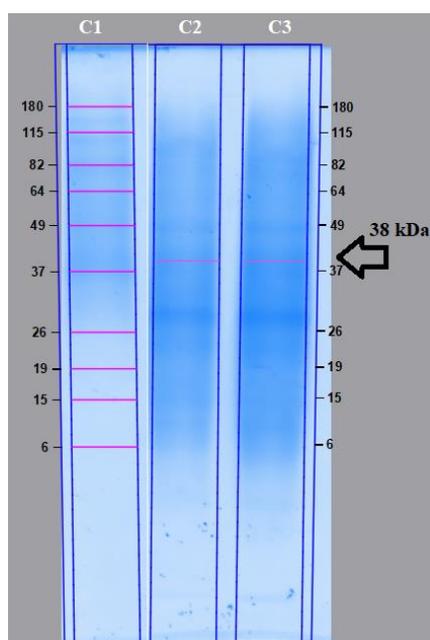
Medición de Concentración de los Ensayos de Lisis Celular de MIC3/BLI21 en Nanodrop

Muestra	Proteína (mg/ml)
Lisis 1	10,513

Muestra	Proteína (mg/ml)
Lisis 2	9,381

Figura 16

Lisis Celular MIC3/BL21



Nota. 10 μ l de marcador de peso molecular (Ref: 10748-010, *BenchMark*) (C1). Presencia de bandas de interés en 38 kDa (flecha). Para C2 (1.0513 mg/ μ l) y C3 (0.9381ng/ μ l). *ImageLab*.

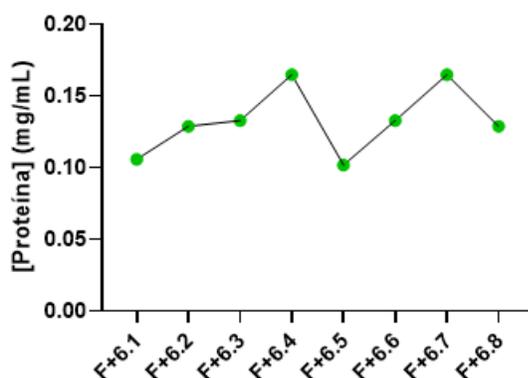
Purificación de MIC3/BL21 Mediante Cromatografía de Afinidad en Columna de Níquel HisTrap™ HP de 1mL

Con respecto a los ensayos que se describen en la Tabla 10, ninguno de los tampones permitió la elución de la proteína, por ello, se estandarizó el gradiente de elución usando 5VC del ensayo A, seguido de 5 VC del ensayo E. De esta forma, se consiguió la elución de la proteína. De esta forma, se realizó un total de ocho repeticiones del ensayo de purificación de MIC3/BL21, lo que resultó, en la recolección de ocho tubos Eppendorf de 1mL cada uno, con

concentraciones ≈ 0.100 - 0.170 mg/mL, como se puede observar en la Figura 17. Todo esto con el fin de tener un volumen mayor y poder concentrar las fracciones mediante unidades de Filtración Centrífuga *Ultra-4 Amicon®*.

Figura 17

Fracciones Positivas Resultantes de la Purificación de MIC3/BL21 por Cromatografía de Afinidad de Níquel.



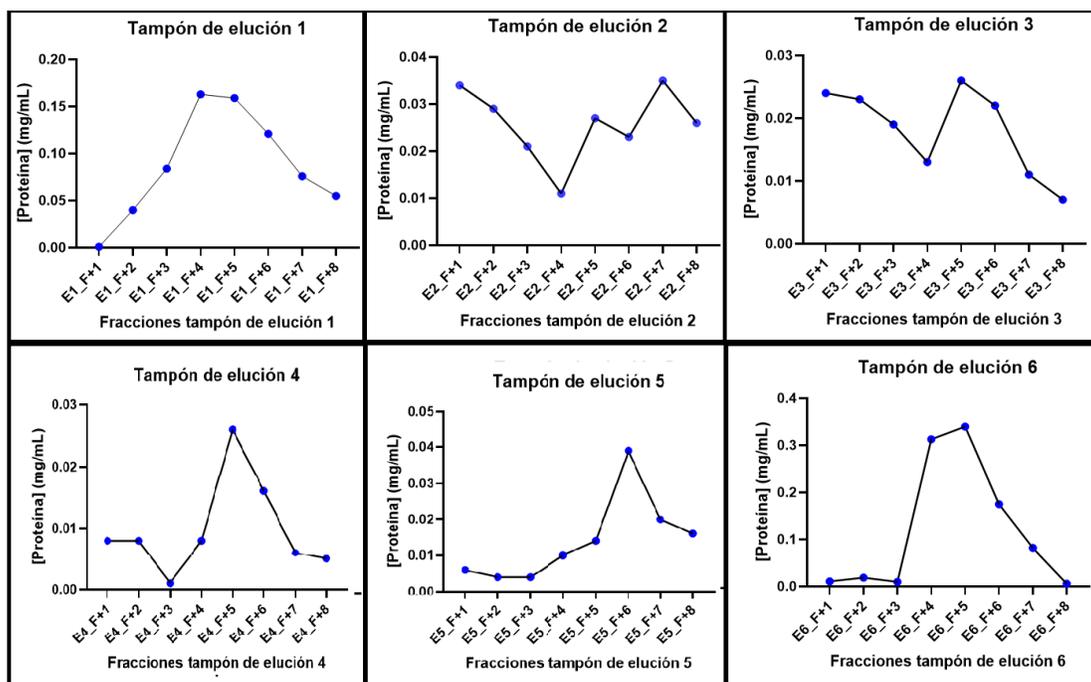
Nota. Fracciones obtenidas al realizar repeticiones del ensayo de purificación mediante cromatografía de afinidad. *GraphPad Prism 8.*

Cromatografía de Intercambio Iónico en Columna DEAE Sefarosa Fast Flow

En cada uno de los ensayos de elución, las fracciones recolectadas presentaban en menor o mayor concentración la posible presencia de MIC3/BL21, dado que todas las fracciones resultaron positivas, como se puede notar en la Figura 18. De estas, el tampón de elución 6, presentó las concentraciones más altas obtenidas en la recolección de fracciones, con valores de 0.313 mg/mL, 0,340 mg/mL y 0.175 mg/mL.

Figura 18

Fracciones Positivas Obtenidas para cada uno de los Tampones de elución Usados en Cromatografía de Intercambio Iónico.



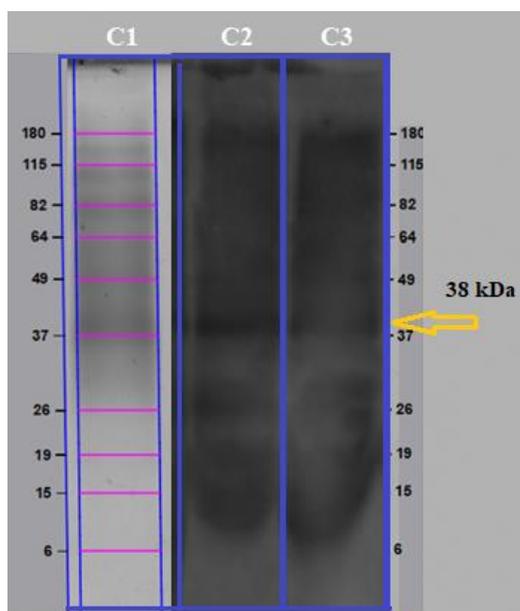
Nota. Las concentraciones obtenidas en el gradiente de elución por cromatografía de intercambio iónico resultaron en fracciones positivas para cada ensayo de elución en Columna DEAE Sefarosa Fast Flow. GraphPad Prism 8.

Verificación de la presencia de MIC3/BL21 mediante Western Blot

Dado que, no se logró concentrar la proteína usando unidades de Filtración Ultra-4 Amicon®, se procedió a verificar la presencia de proteínas pertenecientes a *Toxoplasma gondii*, mediante Western Blot, en las muestras de lisis utilizadas en la purificación por cromatografía de afinidad. En particular se observó una banda que corresponde con el tamaño de MIC3 de 38 kDa que consta en la Figura 19. Lo que demuestra que las fracciones recolectadas de la purificación si pertenecen a MIC3/BL21.

Figura 19

Comprobación mediante Western Blot de la presencia de proteína MIC3/BL21



Nota. Western Blot. 10 μ l de marcador de peso molecular (Ref: 10748-010, *BenchMark*) (C1). Se cargó 20 μ g de las muestras de lisis de MIC3/BL21 en gel de poliacrilamida (C1 y C2). Presencia de bandas de interés en 38 kDa (flecha). *ImageLab*.

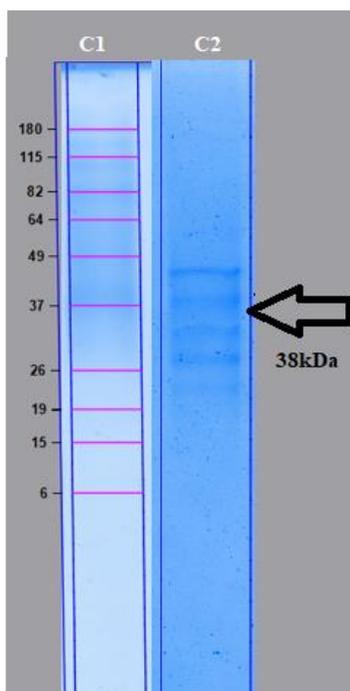
Concentración de Fracciones Positivas Obtenidas Mediante Cromatografía de Afinidad Usando Unidades de Filtración Centrífuga Ultra-4 Amicon®.

Al tener un volumen total de 8 mL, se realizó dos veces el proceso de concentrar la proteína mediante las unidades de Filtración centrífuga Ultra-4 Amicon®, dado que, el volumen máximo aceptado correspondía a 4 mL. El proceso permitió obtener un volumen aproximado de 20 μ L de proteína concentrada. El valor obtenido resultante de la concentración de la proteína MIC3 fue de 8.190 mg/mL. A modo de comprobación se realizó (SDS-PAGE) de la

concentración obtenida mediante unidades de filtración Ultra-4 Amicon®. En la Figura 20, se puede constatar la presencia de la proteína de interés MIC3.

Figura 20

(SDS-PAGE) de la proteína MIC3 Usando Unidades de Filtración Ultra-4 Amicon®



Nota. 10 μ l de marcador de peso molecular (Ref: 10748-010, BenchMark) (C1). Presencia de varias bandas siendo una en particular de interés de 38 kDa, dado que corresponde a la proteína MIC3. GraphPad Prism 8

Capítulo V

Discusión

La toxoplasmosis causada por el protozoario intracelular obligado *Toxoplasma gondii*, es considerada una zoonosis de importancia a nivel médico y veterinario, dado que, es capaz de infectar a gran parte de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos (Leader et al., 2008). Además, su fácil contagio, ya sea por ingerir carne poco cocida que contiene quistes tisulares viables, o por ingerir alimentos contaminados con ooquistes, vuelven a esta enfermedad un punto prioritario de estudio para el diagnóstico y caracterización génica de *T. gondii* (Liu et al., 2015).

Actualmente, varios enfoques tradicionales como las técnicas etiológicas, inmunológicas y de imagen, han ayudado a llenar muchos vacíos referentes al campo del diagnóstico y epidemiología de la toxoplasmosis (Leader et al., 2008). Sin embargo, no existe algún tratamiento que abarque y pueda combatir todas las formas infecciosas de este parásito (Valdés Abreu et al., 1996). Generalmente, el uso de fármacos sigue siendo complejo, debido a que su eficacia se ve perjudicada por la intolerancia y aparición de resistencia parasitaria. Inclusive, Leader et al., (2008), menciona que estos fármacos solo se dirigen a la toxoplasmosis aguda, con poco o nulo efecto sobre la forma crónica de la enfermedad. Por ello, la introducción de nuevos productos innovadores que ofrezcan beneficios potenciales para los pacientes, junto con una reducción de los costos de producción es un punto clave que debe ser considerado.

A menudo se prefiere el uso de proteínas recombinantes dado que no interfieren con los procesos biológicos y, por ende, no causan efectos adversos. Así también, estos agentes se

toleran bien y es menos probable que provoquen respuestas inmunitarias. Y, aunque, se considere a la microscopía y bioensayos como el estándar de oro en la detección de toxoplasmosis, es más probable que su diagnóstico clínico se realice mediante métodos serológicos (Leader et al., 2008; Scott, 2013). En sí, la expresión de la proteína MIC3 en *E. coli* BL21, abre paso al desarrollo de potenciales pruebas diagnósticas basadas en la detección específica de anticuerpos o antígenos, por ello, el interés de obtener y posteriormente purificar MIC3 de manera recombinante.

Ya que el gen de interés con un tamaño de 1080 pb fue insertado en el plásmido pET22-b (+) en la cepa de *E. coli* JM109 en estudios previos, simplemente se realizó la purificación del plásmido a modo de comprobación (Fig. 9) y se determinó que la presencia de bandas correspondía con el tamaño esperado del gen MIC3. Aun así, para asegurar el proceso se utilizó el programa *Benchling* para generar un corte usando la enzima de restricción EcoRV (Fig. 10). Con esto, se determinó que, tanto el modelo realizado de manera virtual como aquel realizado en gel de agarosa, corresponden con el tamaño de bandas descritos en la (Tabla 14).

Una vez confirmada la presencia de mi gen de interés, se realizó con éxito la clonación del gen MIC3 de *Toxoplasma gondii* en *E. coli* BL21. En el estudio previo, se diseñaron cebadores con sitios de restricción SacI y XhoI respectivamente. Los sitios de restricción se usaron para ligar el vector de expresión pET22-b (+) con el inserto MIC3. Y, de esta forma, se logró obtener el plásmido recombinante, que se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS Competent Cells* usando el método de choque térmico.

Tanto *E. coli* JM109 y *E. coli* BL21, son cepas usadas en la producción de proteínas recombinantes, sin embargo, responden de distintas formas a factores ambientales como la concentración de oxígeno y glucosa (Shiloach et al., 1996). En el estudio de Phue et al., (2007),

se destaca que la principal diferencia recae en la producción de acetato, de modo que *E. coli* BL21 no lo produce y *E. coli* JM109, sí. El acetato afecta negativamente tanto al crecimiento como a la producción de proteínas. Por ello, la elección de la cepa de *E. coli* BL21 para la expresión del gen MIC3 recombinante de *T. gondii*.

Posterior a la expresión de la proteína MIC3, y, debido a que el gen que codifica la ARNP T7 está gobernado por el promotor lacUV5 inducible por (IPTG) se buscó estandarizar los parámetros de inducción. El interés primordial recae en la producción de proteínas recombinantes, que corresponden al periodo inductor de BL21 (DE3). Aunque, también cuenta con un periodo donde la biomasa se acumula con rapidez denominado no inductor (Du et al., 2021). Así, se determinó que la concentración idónea de (IPTG) correspondía a 0.05mM (Fig. 14) y que las muestras se estabilizan a un tiempo aproximado de 4 horas. Cabe destacar que al manejar una concentración mayor de (IPTG), no se favorece al proceso, e inclusive, el aumentar este componente podría generar toxicidad, dañando así al huésped utilizado (Dvorak et al., 2015). También, se logró comprobar la presencia de bandas en 38 kDa (Fig. 15), lo que implica que la proteína obtenida no logró ensamblarse como un dímero de 90 kDa, como pasa en el estudio de purificación realizado por Beghetto et al., (2005). Esto puede deberse a que el plásmido utilizado pertenecía a la serie pET32a (+).

Con esto, la proteína MIC3 recombinante se secretó en el sobrenadante mediante lisis celular. Sin embargo, por la formación de cuerpos de inclusión se utilizó la sonicación como método de disrupción celular acompañado de un tampón de lisis de lavados de PBS. Rodríguez-Carmona et al., (2010), afirma que los protocolos actuales para el aislamiento de cuerpos de inclusión en *E. coli*, suelen brindar entre un 95 y un 99% de recuperación de proteínas. Y, se constata su eficacia al comprobar por (SDS-PAGE), que no existió remanente de

proteína en el pellet, y que toda la proteína de interés se recupera en el sobrenadante (*Fig. 16*) con un tamaño de 38 kDa.

La cromatografía de afinidad al presentar altos rendimientos de recuperación y pureza de proteínas, es considerada hoy en día, una de las estrategias más eficientes presentes en el mercado. Sin embargo, muchas veces se encuentra en dependencia de la disponibilidad de adsorbentes de afinidad específicos que cada proteína presenta, inclusive, se debe considerar en gran medida el rendimiento de la columna de purificación que se disponga (Deutscher, 1990).

Para facilitar el proceso y mejorar el rendimiento de expresión en *E. coli*; MIC3 se ensambló con una etiqueta de afinidad tipo His-Tag, capaz de permitir la purificación de proteínas diana de membrana mediante la técnica IMAC. Básicamente, la interacción que se logró con los gradientes de elución de los ensayos A y E, se dio entre el ion de metal de transición Ni²⁺ inmovilizado en la matriz y la histidina. Particularmente, se prefiere el uso de histidina, dado que es el aminoácido que exhibe la interacción más fuerte con las matrices de iones metálicos inmovilizados, debido a que todos los grupos donantes de electrones en el anillo de histidina imidazol forman fácilmente enlaces de coordinación con el metal de transición inmovilizado (Pina et al., 2014). Pese a esto, no se logró obtener de manera eficiente proteína purificada (*Fig. 17*) y se requirió ocho repeticiones del ensayo para obtener un volumen mínimo requerido para ser purificado mediante unidades de filtración.

Varias consideraciones se plantean. Puede ser que las altas concentraciones de imidazol utilizadas en los ensayos de elución A y E (250 mM y 500 mM), sean tóxicas para la proteína, lo que conlleva a daño del huésped y por ende del plásmido provocando una

inminente degradación de la proteína de interés. Así también, es posible que la proteína no se llegara a expresar y, por ende, nunca se generó su purificación.

A modo de solventar estas dudas se realizó la técnica de Western Blot en las muestras de lisis empleadas en el protocolo de purificación de cromatografía de afinidad de Níquel. Sin embargo, se comprobó la presencia de *Toxoplasma gondii* en las bandas del gel de poliacrilamida con un tamaño de 38 kDa (*Fig. 19*), que coincide con mi proteína de interés MIC3. De esta forma, se determinó que existía proteína en las muestras de lisis, pero que, aun así, el rendimiento en cuanto a la purificación de MIC3 mediante cromatografía de afinidad de Níquel era muy bajo.

Como último ensayo, se realizó cromatografía de afinidad de intercambio iónico en columnas DEAE *Sefarosa Fast Flow*, y a diferencia de la cromatografía de afinidad, solo se requirió hacer un ensayo para obtener fracciones positivas. Es más, para cada ensayo de elución, todas las fracciones resultaron positivas (*Fig. 18*) y solo se requirió tomar los valores más altos obtenidos de concentración pertenecientes al tampón de elución 6 (0.313 mg/mL, 0,340 mg/mL y 0.175 mg/mL), para lograr concentrar la proteína usando unidades de filtración centrífuga Ultra-4 Amicon® resultando en un valor de 8.190 mg/mL mismo que denotó una banda de interés en 38 kDa (*Fig. 20*).

Capítulo VI

Conclusiones

Se expresó la proteína recombinante MIC3 con un tamaño de 1080 pb de *Toxoplasma gondii* en *E. coli* BL21 (DE3) mediante el uso del sistema pET-22b (+) inducible por (IPTG).

La purificación de la proteína MIC3 mediante cromatografía de afinidad en columna de Níquel *HisTrap™ HP* de 1mL, permitió la recolección de varias fracciones positivas con concentraciones que oscilaban entre ≈ 0.100 - 0.170 mg/mL, mismas que se concentraron mediante unidades de filtración Ultra4-Amicon®, resultando en una concentración final de 8.190 mg/mL.

Se constató la presencia de varias bandas por electroforesis (SDS-PAGE) de la muestra concentrada obtenida de la cromatografía de afinidad en columnas de níquel, entre las cuales una presentaba el tamaño esperado de proteína MIC3 de 38 kDa.

Capítulo VII

Recomendaciones

Es de importancia poder continuar con el estudio de la proteína MIC3, dado que puede ayudar en la detección de la infección por *T. gondii*, el diagnóstico de toxoplasmosis y la tipificación de aislamientos de *T. gondii*. Inclusive, se puede ahondar en el uso de tecnologías moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos. Así también, la purificación de la proteína MIC3, podría influir en el reciente desarrollo del método PCR-RFLP anidado multiplex multilocus (Mn-PCR-RFLP), mismo que permite caracterizar o clasificar genéticamente a *T. gondii* a partir de muestras biológicas con alta resolución. En general, se plantea el aumento del uso de tecnologías genómicas, transcriptómicas y proteómicas y el desarrollo de métodos de genotipado multilocus, el uso integrado de tecnologías moleculares y bioinformáticas, dado que será crucial para investigar la caracterización genética de *T. gondii* y podría brindar perspectivas para el diseño de diagnósticos completamente nuevos.

Bibliografía

- Abinaya, R. V., & Viswanathan, P. (2021). Chapter 2—Biotechnology-based therapeutics. En Y. Hasija (Ed.), *Translational Biotechnology* (pp. 27-52). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821972-0.00019-8>
- Anusha, S., P. Sirisha. (2018). A OVERVIEW ON AFFINITY CHROMATOGRAPHY: A REVIEW. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2530650>
- Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & Vectors*, 13(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>
- Brondyk, W. H. (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in Enzymology*, 463, 131-147. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1)
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology*, 73(2), 114-123.
- Cérède, O., Dubremetz, J. F., Bout, D., & Lebrun, M. (2002). The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *The EMBO Journal*, 21(11), 2526-2536. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2526>
- Cérède, O., Dubremetz, J. F., Soète, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., & Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(3), 453-463. <https://doi.org/10.1084/jem.20041672>
- del Solar, G., & Espinosa, M. (2000). Plasmid copy number control: An ever-growing story. *Molecular Microbiology*, 37(3), 492-500. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02005.x>

- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Despommier, D. D., Gwadz, R. W., & Hotez, P. J. (1995). *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux 1908). En D. D. Despommier, R. W. Gwadz, & P. J. Hotez (Eds.), *Parasitic Diseases* (pp. 162-169). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2476-1_27
- dos Anjos Pinheiro Bogoevich Morais, R., Lima do Carmo, E., Carneiro Bichara, C. N., Ramos dos Santos, B., Silva da Silveira, K. W., & Marins Póvoa, M. (2020). Seroprevalence and risk factors associated with *T. gondii* infection in pregnant individuals from a Brazilian Amazon municipality. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00133.
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00133>
- Dowse, T., & Soldati, D. (2004). Host cell invasion by the apicomplexans: The significance of microneme protein proteolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4), 388-396.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.013>
- Du, F., Liu, Y.-Q., Xu, Y.-S., Li, Z.-J., Wang, Y.-Z., Zhang, Z.-X., & Sun, X.-M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 189.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
- Dubey, J. P. (1988). *TOXOPLASMOSIS OF ANIMALS & MAN*. CRC-Press.
<https://books.google.com.ec/books?id=oNpzQgAACAAJ>
- Dubey, J. P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii*—The first 100 years. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(6), 467-475. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>

- Dubey, J. P. (2020). Chapter 1—The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. En L. M. Weiss & K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii (Third Edition)* (pp. 1-19). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267-299. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>
- Flegr, J. (2007). Effects of *Toxoplasma* on Human Behavior. *Schizophrenia Bulletin*, 33(3), 757-760. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbl074>
- Flegr, J. (2013). Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: Pros and cons of the *Toxoplasma*–human model in studying the manipulation hypothesis. *Journal of Experimental Biology*, 216(1), 127-133. <https://doi.org/10.1242/jeb.073635>
- Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., & Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. *PLoS ONE*, 9(3), e90203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>
- Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* In and Around Us. *BioScience*, 23(6), 343-352. <https://doi.org/10.2307/1296513>
- Frenkel, J. K. (2000). Biology of *Toxoplasma gondii*. En P. Ambroise-Thomas & P. E. Petersen (Eds.), *Congenital toxoplasmosis* (pp. 9-25). Springer. https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0847-5_2
- Garcia-Réguet, N., Lebrun, M., Fourmaux, M. N., Mercereau-Pujalon, O., Mann, T., Beckers, C. J., Samyn, B., Van Beeumen, J., Bout, D., & Dubremetz, J. F. (2000). The microneme

- protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cellular Microbiology*, 2(4), 353-364.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00064.x>
- Gatti-Lafranconi, P., Dijkman, W. P., Devenish, S. R., & Hollfelder, F. (2013). A single mutation in the core domain of the lac repressor reduces leakiness. *Microbial Cell Factories*, 12, 67. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-67>
- Grandía G., R., Entrena G., Á., & Cruz H., J. (2013). Toxoplasmosis en *Felis catus*: Etiología, epidemiología y Enfermedad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), 131-149.
- Grönberg, A. (2018). Chapter 18—Ion Exchange Chromatography. En G. Jagschies, E. Lindskog, K. Łacki, & P. Galliher (Eds.), *Biopharmaceutical Processing* (pp. 379-399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00018-9>
- Hage, D. S., Anguizola, J. A., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Sobansky, M., & Zheng, X. (2017). Chapter 12—Affinity chromatography. En S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, & M.-L. Riekkola (Eds.), *Liquid Chromatography (Second Edition)* (pp. 319-341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00012-9>
- Heyde, S. A. H., & Nørholm, M. H. H. (2021). Tailoring the evolution of BL21(DE3) uncovers a key role for RNA stability in gene expression toxicity. *Communications Biology*, 4, 963. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02493-4>
- Jacobs, L., Remington, J. S., & Melton, M. L. (1960). The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 46(1), 11-21. <https://doi.org/10.2307/3275325>

- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Current status and future perspectives. *Open Biology*, 6(8), 160196. <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Labrou, N. E. (2014). Protein purification: An overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1129, 3-10. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_1
- Labrou, N. E. (2021). Protein Purification Technologies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2178, 3-10. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0775-6_1
- Lebrun, M., Carruthers, V. B., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2020). Chapter 14—Toxoplasma secretory proteins and their roles in parasite cell cycle and infection. En L. M. Weiss & K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii (Third Edition)* (pp. 607-704). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00014-1>
- Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C., & Mijakovic, I. (2019). Protein post-translational modifications in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 17(11), 11. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0243-0>
- Matthiesen, S. H., Shenoy, S. M., Kim, K., Singer, R. H., & Satir, B. H. (2003). Role of the parafusin orthologue, PRP1, in microneme exocytosis and cell invasion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 5(9), 613-624. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00305.x>
- McLeod, R., Cohen, W., Dovgin, S., Finkelstein, L., & Boyer, K. M. (2020). Chapter 4—Human *Toxoplasma* infection. En L. M. Weiss & K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii (Third Edition)* (pp. 117-227). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00004-9>

- Merlin, M., Gecchele, E., Capaldi, S., Pezzotti, M., & Avesani, L. (2014). Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. *BioMed Research International*, 2014, e136419. <https://doi.org/10.1155/2014/136419>
- Middelberg, A. P. J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 13(3), 491-551. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02007-P](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02007-P)
- Mierendorf, R. C., Morris, B. B., Hammer, B., & Novy, R. E. (1998). Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods in Molecular Medicine*, 13, 257-292. <https://doi.org/10.1385/0-89603-485-2:257>
- Milne, J. J. (2017). Scale-Up of Protein Purification: Downstream Processing Issues. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1485, 71-84. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_5
- Montazeri, M., Mikaeili Galeh, T., Moosazadeh, M., Sarvi, S., Dodangeh, S., Javidnia, J., Sharif, M., & Daryani, A. (2020). The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967–2017): A systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 13(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3954-1>
- Nicolle, C., & Manceaux, L. H. (1908). On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 863-864. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.001>
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, 19(5), 590-601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>
- Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital

- toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385-1394.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>
- Paredes-Santos, T. C., de Souza, W., & Attias, M. (2012). Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Structural Biology*, 177(2), 420-430. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.028>
- Pham, P. V. (2018). Chapter 19 - Medical Biotechnology: Techniques and Applications. En D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 449-469). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>
- Pieracci, J. P., Armando, J. W., Westoby, M., & Thommes, J. (2018). Chapter 9—Industry Review of Cell Separation and Product Harvesting Methods. En G. Jagschies, E. Lindskog, K. Łącki, & P. Galliher (Eds.), *Biopharmaceutical Processing* (pp. 165-206). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00009-8>
- Rodríguez, E. L., Poddar, S., Iftekhhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, S., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S., & Hage, D. S. (2020). Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1157, 122332.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>
- Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A., & García-Fruitós, E. (2010). Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-71>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00172>

- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Soldati, D., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 31(12), 1293-1302. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00257-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00257-0)
- Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo*, 3, 109-112.
- Thakur, R., & Shankar, J. (2017). Strategies for Gene Expression in Prokaryotic and Eukaryotic System. En V. C. Kalia & A. K. Saini (Eds.), *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes* (pp. 223-247). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5511-9_11
- Velásquez Serra, G. C., Piloso Urgiles, L. I., Guerrero Cabredo, B. P., Chico Caballero, M. J., Zambrano Zambrano, S. L., Yaguar Gutierrez, E. M., & Barrera Reyes, C. G. (2020). Current Situation of Congenital Toxoplasmosis in Ecuador. *Journal of Community Health*, 45(1), 170-175. <https://doi.org/10.1007/s10900-019-00729-3>
- Wang, Y., & Yin, H. (2015). Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 384. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1001-4>