

PURIFICACIÓN DE UNA CISTEÍN PROTEINASA DE *Trichomonas vaginalis* INVOLUCRADA EN LA CITOTOXICIDAD DEL PARÁSITO.

Eduardo Solano González*, Rossana Arroyo Verástegui**, Jaime Ortega López*, *Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y **Departamento de Patología Experimental. CINVESTAV IPN. Av. IPN 2508, México D.F. C.P. 07360. Tel: 57473800 ext. 4381. Fax. 57473800 ext 4305. esolano@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Trichomonas vaginalis*, cisteín proteinasa, citotoxicidad.

Introducción. *Trichomonas vaginalis* es el protozoo flagelado, anaerobio, responsable de la trichomonosis humana, una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en humanos (1). Este parásito sintetiza un gran número de proteinasas que participan en propiedades de virulencia como adhesión, citotoxicidad, y evasión de la respuesta inmune (2). Se ha demostrado que una cisteín proteinasa de 65 kDa (CP65) participa en la citotoxicidad (3) por lo que su purificación y caracterización bioquímica son de gran interés para entender su participación en esta propiedad de virulencia.

Metodología. La CP65 se purificó a partir de lisados de *T. vaginalis*. Los extractos de proteínas del parásito se precipitaron diferencialmente con concentraciones crecientes de sulfato de amonio. Estas muestras se sometieron a cromatografía de intercambio iónico y las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y en geles de sustrato. La CP65 se identificó por ensayos de ligando y "Western blot" con el anticuerpo específico anti-CP65. Una vez purificada e identificada la proteína de interés se secuenció el extremo amino.

Resultados y Discusión. Las proteínas del precipitado de 60% de saturación de sulfato de amonio se dializaron y se pasaron en una columna de intercambio aniónico. (Fig.1A) y las fracciones se analizaron por SDS-PAGE (Fig.1B).

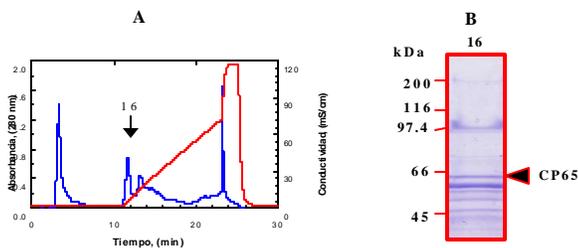


Fig. 1.-Cromatografía de intercambio iónico de las proteínas presentes en el precipitado del 60%. Perfil cromatográfico (A) (UnoQ1) utilizando como buffer (A) Tris HCl 20 mM, 1mM EDTA a pH 8 a un flujo de 1 ml/min y gradiente lineal de 0-60% de Buffer B (buffer A + 1M KCl) y se colectaron fracciones de 1.5 ml con lo que se logró enriquecer la proteína de interés. **Electroforesis de la fracción 16 (B).** En geles de poliacrilamida 7.5 % en tinción de coomassie.

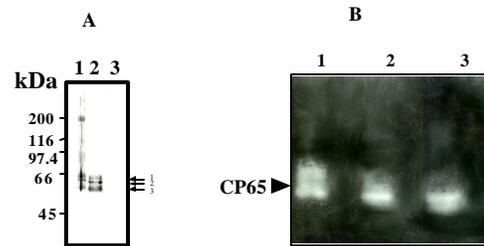


Fig. 2.-Análisis de las proteinasas presentes en la fracción 16 (A) "Western blot" (B) Electroforesis de las tres bandas en la región de 65 kDa en geles de sustrato (gelatina).

En la fig. 2 en el ensayo de "Western blot" el anticuerpo anti-CP65 reconoció tres bandas presentes en la región de 65 kDa de la fracción 16 (A). Los resultados obtenidos en la (B) muestran que cada una de las bandas posee actividad proteolítica.

Conclusiones. La cisteín proteinasa de 65 kDa se enriqueció en el precipitado obtenido al 60% de saturación de sulfato de amonio y la fracción 16 de la cromatografía de intercambio iónico. Los ensayos de ligando y "Western blot" indican que las bandas en la región de 65 kDa de la fracción 16 corresponden a la CP65.

Con un solo paso de purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico se logró obtener cantidades adecuadas de la CP65 para la microsecuenciación del extremo amino.

Agradecimiento. Este trabajo se realizó con el apoyo económico del 25572-N CONACYT otorgado a R.A.

Bibliografía.

- 1.- Lockhart, A.B.; Thrall, P.H.; and Antonovics, J. (1996). Sexually transmitted diseases in animals: ecological and evolutionary implications. *Biol Rev* **71**:415-471.
- 2.-Arroyo, R., and Alderete, J. F. (1995). Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med. Res.* **26**:279-285.
- 3.- Alvarez-Sánchez, M.E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel- Facenda, L., Ortega-López, J., and Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP 65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbiol Path* **28**:193-202.