

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para acceder al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

**Estudio de la utilidad de las proteínas P22,
P30 y P35 de *Toxoplasma gondii* para el
diagnóstico de fase aguda de la toxoplasmosis**

Autor: Lic. Juan Gabriel Costa

Laboratorio de Tecnología Inmunológica

Director: Dr. Iván Sergio Marcipar Co-Directora: Dra. Claudia Marina Lagier

Se agradece a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y al CONICET, instituciones que permitieron el desarrollo de la investigación para esta tesis doctoral.

A partir de los resultados de esta tesis, se presentaron los siguientes resúmenes de trabajos en congresos o revistas científicas:

❖ Costa, J. G.; Sferco, S. J. y Marcipar, I. *Programas Actuales para la Predicción de Antigenicidad: Evaluación de su efectividad*. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. La Plata, Buenos Aires, Argentina. año 2008.

❖ Costa, J. G.; Lagier, C. M y Marcipar, I. S. *Modelado de la Proteína P35 de Toxoplasma Gondii y Predicción de sus Epitopes*. Primer Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional. Quilmes, Buenos Aires, Argentina, año 2010.

❖ Costa, J. G.; Faccendini, P.; Carral, L.; Kaupfer, F.; Lagier, C. M y Marcipar, I. S. *Evaluación de dos regiones de la proteína P35 de Toxoplasma Gondii para el diagnóstico de fase aguda de la toxoplasmosis*. XXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Ascochinga, Córdoba, Argentina, año 2010.

❖ Costa, J. G.; Faccendini, P.; Lagier, C. M y Marcipar, I. S. *Modelado y Predicción de los Epitopes del Antígeno P22 de Toxoplasma gondii*. Segundo Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional. Córdoba, Córdoba, Argentina, año 2011.

❖ Costa, J. G.; Faccendini, P.; Lagier, C. M y Marcipar, I. S. *Desarrollo de una Técnica de Lectura Visual para Detectar Toxoplasmosis Aguda*. IX Congreso de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, año 2011.

❖ Peretti, L.; Gonzalez, V.; Costa, J. G. y Marcipar, I. S. *Synthesis of Carboxylated Latexes and Sensitization with a Recombinant Protein to Detect Toxoplasmosis*. IX Simposio Argentino de Polímero. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, año 2011.

❖ Cardona, P.; Costa, J. G.; Carral, L.; Kaupfer, F.; Lagier, C. M y Marcipar, I. S. *Clonado, Purificación y Evaluación de Dos Regiones del Antígeno P30 para Discriminación entre la Fase Aguda y Crónica de la Infección de Toxoplasmosis*. VII Jornada de Comunicación de Producciones Académicas y Científicas en Biología. Parana, Entre Ríos, Argentina, año 2011.

❖ Costa, J. G.; Perotti, J.; Faccendini, P.; Lagier, C. M. y Marcipar, I. S. *Optimization of the acute toxoplasmosis immunodiagnostic during the pregnancy*. Workshop “Frontiers in Biosciencie”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, año 2012.

❖ Costa, J. G.; Perotti, J.; Faccendini, P.; Dure, A.; Carral, L.; Kaupfer, F.; Lagier, C. M y Marcipar, I. S. *Evaluación de diferentes regiones de las proteínas P22, P30 y P35 para diagnóstico de la fase aguda de la toxoplasmosis*. XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, año 2012.

❖ Costa, J. G.; Faccendini, P.; Sferco, J. S.; Lagier, C. M. y Marcipar, I. S. *Comparison of the ability to predict true linear B-cell epitopes by on-line available prediction programs*. 3er Congreso Argentina de Bioinformática y Biología Computacional, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina, año 2012.

❖ Peretti, L.; Gonzalez, V.; Costa, J. G.; Marcipar, I. S. y Gugliota, L. *Síntesis de Partículas tipo "core-shell" y sensibilización con una proteína recombinante del Toxoplasma gondii*. XIII Simposio Latinoamericano de Polímeros y XI Congreso Iberoamericano de Polímeros, Bogotá D.C., Bogotá, Colombia, año 2012.

❖ Costa, J. G.; Faccendini P.; Sferco, S. Lagier, C. y Marcipar, I. (2013) *Evaluation and comparison of the ability of online available prediction programs to predict true linear B-cell epitopes*. Protein and Pept. Lett. 20: 724-730.

❖ Peretti, L.; Gonzalez, V.; Costa, J. G.; Marcipar, I. S. y Gugliota, L. *Síntesis, Caracterización y Sensibilización de Látex Carboxilados de Diferentes Tamaños para la Detección de Toxoplasmosis*. XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, Rosario, Argentina, 2013.

❖ Faccendini, P.; Costa, J. G.; Ribone, É.; Marcipar, I. y Lagier, C. *Desarrollo de un sistema electroquímico para evaluar infección toxoplásmica*. VII Congreso Argentino de Química Analítica, Mendoza, Argentina, 2013.

❖ Peretti, L.; Gonzalez, V.; Costa, J. G.; Marcipar, I. S. y Gugliota, L. *Obtención de complejos látex-proteína para detección diferencial de infección aguda por Toxoplasma gondii mediante inmunoaglutinación*. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, Rosario, Argentina, 2013.

Índice

Introducción	1
1. La infección de toxoplasmosis	2
1.1. ¿Qué es la toxoplasmosis?.....	2
1.2. Agente etiológico.....	3
1.2.1. Genotipos de <i>T. gondii</i>	5
1.3. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1.4. Invasión celular y proteínas involucradas	8
1.5. Respuesta inmune ante la infección.....	10
1.6. Prevalencia de la infección en el mundo, Argentina y Santa Fe	11
1.7. Infección en la embarazada y el feto	12
1.8. Tratamiento de la infección en embarazadas.....	13
1.9. Técnicas actuales para el diagnóstico	14
1.9.1. Ensayo de Sabin-Feldman.....	14
1.9.2. IFI.....	14
1.9.3. ISAGA	14
1.9.4. HAI	14
1.9.5. ELISA	15
1.9.6. Ensayo de avidéz.....	15
1.10. Técnicas actuales para el diagnóstico de fase aguda de la infección.....	16
2. Optimización del diagnóstico de la fase aguda de toxoplasmosis	19
2.1. Técnicas experimentales.....	19
2.2. Antígenos para diagnóstico	19
2.3. Antígenos usados para diferenciar las fases de la infección.....	20
2.4. Complicaciones para comparar los antígenos evaluados	25
2.5. ¿Qué antígeno emplear?	28
2.5.1. Antígeno P22	29
2.5.2. Antígeno P30	30
2.5.3. Antígeno P35	32
3. Bioinformática.....	34
3.1. Bioinformática en la selección de antígenos	34

3.2. Bases de datos.....	35
3.3. Programas de búsqueda de dominios proteicos.....	35
3.4. Modelado molecular.....	36
3.4.1. Etapas del modelado molecular:.....	37
3.5. Predicciones de epitopes.....	39
3.5.1. Programas de predicción de epitopes lineales.....	39
3.5.2. Programas de predicción de epitopes estructurales.....	41
Objetivos	43
1. Objetivo general.....	43
2. Objetivos específicos.....	43
2.1. Desarrollo de los objetivos específicos.....	43
Materiales y Métodos	45
1. Experimentos de laboratorio.....	46
1.1. Clonado de genes de los antígenos P22, P30 y P35 de <i>Toxoplasma gondii</i>	46
1.1.1. Purificación de ADN genómico.....	46
1.1.2. Armado de gel de agarosa, electroforesis y visualización de ADN.....	46
1.1.3. PCR de ADN.....	47
1.1.3.1. Agregado de cola de dAMP (desoxiadenin monofosfato) en los extremos romos.....	48
1.1.3.2. Obtención del ADN de P30.....	48
1.1.4. Vectores plasmídicos.....	49
1.1.5. Ligación de secuencias de ADN.....	50
1.1.6. Cepas bacterianas.....	50
1.1.7. Cultivos e incubaciones.....	50
1.1.8. Transformación.....	51
1.1.9. Purificación de plásmido de ADN.....	52
1.1.9.1 Protocolo tradicional.....	52
1.1.9.2. Kit comercial.....	53
1.1.10. Corte de ADN.....	53
1.2. Inducción y purificación de proteínas.....	53
1.2.1. Inducción de proteínas.....	54
1.2.2. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida (PAGE).....	54

1.2.3. Purificación de proteínas.....	55
1.2.3.1. Protocolo basal.....	55
1.2.3.2. P35A.....	56
1.2.3.3. P22L.....	56
1.2.3.4. P30c.....	56
1.2.3.5. P30L.....	56
1.2.4. Cuantificación de proteínas.....	57
1.3. Ensayos inmunoquímicos.....	57
1.3.1. Panel de sueros.....	57
1.3.1.1. SIN.....	58
1.3.1.2. SIC.....	58
1.3.1.3. SIA.....	58
1.3.1.4. SIAS.....	58
1.3.1.5. SIP.....	58
1.3.2. ELISA indirecto con proteínas recombinantes.....	58
1.3.3. Ensayo de avidin.....	60
1.3.4. Dot blot.....	61
1.3.4.1. Dot blot semicuantitativo.....	61
2. Análisis bioinformático.....	62
2.1. Programas de procesamiento de datos experimentales.....	62
2.1.1. Parámetros de evaluación.....	62
2.1.1.1. Análisis estadístico.....	63
2.1.2. Estudio de secuencias.....	64
2.2. Modelado molecular.....	64
2.2.1. Búsqueda de patrones.....	64
2.2.2. Generación de la estructura.....	65
2.2.3. Evaluación y refinado del modelo.....	65
2.2.3.1. Mapa de Ramachandran.....	65
2.2.4. Evaluación de las regiones expuestas sobre la superficie.....	66
2.3. Evaluación de los programas predictores de epítopos lineales.....	66
2.3.1. Programas evaluados.....	67
2.3.2. Proteínas analizadas.....	67
2.3.3. Selección de epítopos de los programas de predicción.....	68

2.3.4. Parámetro de comparación.....	69
2.3.4.1. Análisis estadístico.....	69
2.4. Predicción de epitopes.....	69
Resultados y Discusiones	71
1. Evaluación del antígeno P22.....	72
1.1. Resultados experimentales.....	72
1.1.1. Obtención de las secuencias de ADN.....	72
1.1.2. Clonado e inducción de proteínas.....	73
1.1.3. Purificación de los antígenos.....	76
1.1.4. Evaluación de las diferentes secuencias de P22 mediante ELISAs.....	78
1.1.4.1. ELISA para detección de IgG.....	78
1.1.4.2. ELISA para detección de IgA.....	82
1.1.4.3. ELISA para detección de IgM.....	85
1.1.4.4. ELISA de avidéz.....	88
1.1.4.5. Comparación entre Inmunoensayos.....	90
1.2. Bioinformática.....	92
1.2.1. Análisis de la secuencia.....	92
1.2.2. Búsqueda de estructuras patrones para modelado.....	94
1.2.3. Modelado molecular.....	95
1.2.4. Ubicación de regiones en la estructura conformacional de P22.....	98
1.2.5. Predicción de epitopes.....	100
1.2.6. Hipótesis sobre la ubicación de los epitopes.....	102
2. Evaluación del antígeno P30.....	106
2.1. Resultados experimentales.....	106
2.1.1. Obtención de las secuencias de ADN.....	106
2.1.2. Clonado en el vector de expresión e inducción de proteínas.....	107
2.1.3. Purificación de los antígenos.....	110
2.1.3.1. Antígeno P30c.....	110
2.1.3.2. Antígeno P30L:.....	112
2.1.4. Evaluación de las diferentes secuencias de P30 mediante ELISAs.....	113
2.1.4.1. ELISA para detección de IgG.....	113
2.1.4.2. ELISA para detección de IgA.....	117
2.1.4.3. Comparación entre inmunoensayos.....	119
2.2. Bioinformática.....	122
2.2.1. Análisis de secuencia.....	122
2.2.2. Búsqueda de las estructuras patrones para modelado.....	125
2.2.3. Modelado molecular.....	125
2.2.4. Ubicación de regiones en la estructura conformacional de P30.....	128

2.2.5. Información bibliográfica experimental sobre ubicación de epitopes	131
2.2.5.1. Epitopes de fase aguda de la infección.....	131
2.2.6. Predicción de epitopes	132
2.2.7. Consenso sobre la ubicación de los epitopes	134
3. Evaluación del antígeno P35	138
3.1. Resultados experimentales	138
3.1.1. Obtención de las secuencias de ADN	138
3.1.2. Construcción del vector de clonado	139
3.1.3. Clonado en distintos vectores de expresión e inducción de proteínas	139
3.1.4. Purificación de los antígenos	144
3.1.5. Evaluación de las diferentes secuencias de P35 mediante inmunoquímica.....	145
3.1.5.1. Dot blot para detección de IgG	145
3.1.5.2. ELISA para detección de IgG	145
3.1.5.3. ELISA para detección de IgA	149
3.1.5.4. ELISA para detección de IgM.....	152
3.1.5.5. ELISA de avidéz	155
3.1.5.6. Dot blot semicuantitativo	156
3.1.5.7. Comparación entre inmunoensayos	157
3.2. Bioinformática.....	160
3.2.1. Análisis de secuencia	160
3.2.2. Búsqueda de las estructuras patrones para modelado	163
3.2.3. Modelado molecular	164
3.2.4. Ubicación de regiones en la estructura conformacional de P35	167
3.2.5. Predicción de epitopes	169
3.2.6. Hipótesis sobre la ubicación de los epitopes.....	170
4. <i>Anexo A</i> : Evaluación de los programas de predicción de epitopes lineales	173
4.1. Selección de las proteínas empleadas.....	173
4.2. Empleo del VPP únicamente para evaluar los programas.....	173
5. <i>Anexo B</i> : Evaluación de la proteína de fusión TrxA	178
5.1. Clonado, expresión y purificación de la proteína	178
5.2. Dot blot.....	178
6. Comparación entre las proteínas	180
6.1. Obtención de los antígenos.....	180
6.2. Bioinformática.....	181
6.3. Inmunoquímica.....	182
Conclusión	184
Bibliografía	190

Abreviaturas y símbolos

AA: Aminoácido.

Ac conj.: Anticuerpo anti-Anticuerpo humano conjugado a peroxidasa de rábano picante.

Ac: Anticuerpo.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Ag: Antígeno.

ARN: Ácido ribonucleico.

Cc: Carbono del grupo carboxilo de un aminoácido .

C α : Carbono α de un aminoácido.

D.O.: Densidad óptica.

Da: Dalton.

dAMP: Desoxiadenin monofosfato.

dATP: Desoxiadenin trifosfato.

dCTP: Desoxicitidin trifosfato.

dGTP: Desoxiguanidin trifosfato.

dTTP: Desoxitimidin trifosfato.

E. coli: *Escherichia coli*.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FT: Flow true - flujo verdadero.

GPI: glicosil-fosfatidil-inositol.

GRA: proteínas provenientes de las organelas Gránulos Densos de *Toxoplasma gondii*.

HAI: Hemoaglutinación Indirecta.

HIV: Human Immunodeficiency Virus - Virus de Inmunodeficiencia Humana.

HRP: horseradish peroxidase - peroxidasa de rábano picante.

IC: Intervalo de confianza.

IFI: Inmunofluorecencia.

Ig: Inmunoglobulina.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

ISAGA: Immunosorbent Agglutination Assay - Ensayo de aglutinación por inmunoabsorción.

L.B.: Lurea Bertani.

M: masa.

MIC: proteínas provenientes de las organelas Micronemas de *Toxoplasma gondii*.

MPM: marcador de peso molecular.

Myce: Marca y clase empleada.

NCBI: National Center for Biotechnology Information - Centro Nacional para Información Biotecnológica.

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis - Electroforesis en gel de Poliacrilamida.

Pb: pares de bases.

PBS: buffer de fosfato salino.

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

PDB: Proteins Data Bank - Banco de Datos de Proteínas.

Poc.: Pocillo.

Pos.: Positivo de visualización de la altura correcta en un PAGE, de una proteína inducida.

R.p.m.: revoluciones por minuto.

RFLP: Restriction fragment length polymorphism - polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción.

ROC: Receiver Operating Characteristic - Característica Operativa del Receptor.

ROP: proteínas provenientes de las organelas Roptrias de *Toxoplasma gondii*.

S: Sobrenadante residual formado luego de centrifugar células inducidas y lisadas.

SAG: Antígeno de superficie.

SDS: Dodecil Sulfato de sodio.

SIA: Sueros de individuos con la fase aguda de la infección de toxoplasmosis.

SIAS: Sueros de individuos sobre los que se tiene alto grado de certeza que se encuentran en la fase aguda de la infección de toxoplasmosis.

SIC: Sueros de individuos con la fase crónica de la infección de toxoplasmosis.

SIN: Sueros de individuos no infectados con toxoplasmosis.

SIP: Sueros de individuos infectados con toxoplasmosis.

T. gondii: Toxoplasma gondii.

TrxA: Tioredoxina A.

V: volumen.

VMD: Visual Molecular Dynamics.

VPN: Valor Predictivo de los Negativos.

VPP: Valor Predictivo de los Positivos.

Resumen

El objetivo general de este trabajo fue lograr una optimización del diagnóstico de toxoplasmosis aguda en mujeres embarazadas que permita una verdadera prevención de la infección materno-fetal por medio de un tratamiento precoz y, alternativamente, para evitar dicho tratamiento en casos innecesarios.

La toxoplasmosis es una infección causada por el protozoario *Toxoplasma gondii* que afecta a todos los animales de sangre caliente. Aunque este parásito rara vez produce una infección sintomática en el hombre, puede generar complicaciones en individuos inmunodeprimidos y en mujeres embarazadas.

La toxoplasmosis congénita es la segunda infección parasitaria más común en el útero y puede generar aborto del feto o graves consecuencias para el recién nacido, como desarrollo de afecciones del cerebro o el tejido ocular (hidrocefalia, retraso mental, sordera, deterioro psicomotor, cataratas, estrabismo, necrosis retiniana y/o ceguera).

Normalmente, la infección inicia con la fase aguda y luego de unos meses transita hacia la fase crónica. Pero solamente en la fase aguda el parásito puede infectar al feto. Por lo tanto, es esencial que las mujeres prevengan infecciones durante el embarazo.

Existen tratamientos para la infección en fase aguda que permiten disminuir la probabilidad de transmisión al feto y el daño que pueda surgir en el caso de la infección transplacentaria. Sin embargo, estas terapias pueden ser teratogénicas y/o generar intolerancia al tratamiento para la mujer. De este modo, se torna de vital importancia administrar este tratamiento solamente en casos de infección aguda. En consecuencia, es necesario un diagnóstico confiable de esta fase de la infección en la embarazada.

Desafortunadamente, el diagnóstico preciso de la infección aguda no es una tarea sencilla. De hecho, actualmente ninguna técnica permite determinar de forma inequívoca esta etapa de la infección por sí misma y en una sola determinación. Hay varios esquemas de diagnóstico que incluyen la aplicación de diferentes conjuntos de técnicas para clasificar la fase de la infección en aguda o crónica. Sin embargo, la fiabilidad de estos resultados no siempre es apropiada y se requieren largos periodos de tiempo para el diagnóstico certero, lo que resulta perjudicial para el tratamiento. Por lo tanto, es imperativo encontrar nuevas técnicas de diagnóstico que permitan definir rápidamente y con precisión la fase de la infección por *T. gondii*.

La selección del antígeno es uno de los elementos clave para el desarrollo de cualquier técnica de inmunodiagnóstico. Muchas proteínas de *T. gondii* se han evaluado para discriminar la fase aguda de la fase crónica de la infección pero, lamentablemente, los resultados de estos estudios además de no ser contundentes a menudo son contradictorios. En este trabajo de tesis se

analizaron en profundidad publicaciones previas y se definieron las posibles fuentes que generarían los resultados dispares. Éstas fueron: distintas procedencias de los sueros, utilización de un número de muestras insuficientes, clasificación incierta de los sueros estudiados y diferencias en las estrategias utilizadas para la clonación de las proteínas recombinantes propuestas como antígenos.

Esta investigación se llevó a cabo estudiando y verificando la utilidad de algunas proteínas de *T. gondii* para su posterior uso en técnicas de inmunodiagnóstico. En base a la información bibliográfica, se eligieron las proteínas P22, P30 y P35. Luego, se seleccionaron y clonaron diferentes regiones de estas proteínas. Dichos antígenos fueron posteriormente evaluados por los siguientes ensayos inmunoquímicos: ELISA para detectar anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA, ELISA de avidéz para IgG específica y dot blot para detectar IgG específica. Para aumentar la confiabilidad de los resultados, en el diseño de las evaluaciones se tuvieron en cuenta los elementos que fueron considerados como fuentes de disparidad en trabajos previos. En este sentido, para evaluar las proteínas se utilizaron sueros específicamente seleccionados según criterios estrictos de clasificación. Trabajamos con sueros de individuos no infectados por *T. gondii* (SIN), con infección crónica (SIC) y con sospecha de infección aguda (SIA). Además, se utilizó siempre un elevado número de muestras con el objetivo de que los resultados fueran representativos de la población estudiada (excepto para el ensayo de avidéz). Todas las evaluaciones inmunoquímicas de las proteínas se realizaron con sueros de personas de diferentes regiones de Argentina. Teniendo en cuenta que la infección de las poblaciones con diferentes cepas de *T. gondii* puede influir en la reactividad de anticuerpos del paciente contra antígenos definidos del parásito, nuestros resultados indican que el comportamiento de los antígenos será reproducible en otros desarrollos posteriores de kits de diagnóstico para ser utilizados en Argentina. Por último, se realizó un análisis bioinformático exhaustivo de los antígenos en estudio para complementar y explicar los resultados experimentales.

Se analizaron dos secuencias de P22, P22c y P22L, donde la diferencia entre ambas fue que sólo P22L presentó tanto el péptido señal como la región carboxi terminal. La adición de los dos péptidos en P22L desencadenó la formación de cuerpos de inclusión, contrariamente a lo ocurrido con P22c que fue expresada como proteína soluble. Aunque P22L pudo ser solubilizada por procedimientos posteriores, es factible que el antígeno obtenido no haya adquirido su conformación nativa. En efecto, el desempeño de P22c y P22L en técnicas inmunoquímicas para la detección de anticuerpos fue muy diferente, con P22c presentando siempre mejores resultados que P22L. Hay que destacar que P22c fue el mejor de todos los Ag ensayados en esta tesis para diferenciar SIP (combinación de SIA y SIC) de SIN mediante la detección de anticuerpos específicos anti-IgG, utilizando ELISA indirecto (área bajo la curva ROC: 0,82). Cuando se

evaluó la avidéz de los anticuerpos utilizando este antígeno para diferenciar SIA de SIC, los resultados obtenidos también fueron muy prometedores (área bajo la curva ROC: 0,82).

En el caso de la proteína de membrana P30, se obtuvieron y probaron dos secuencias con diferentes extensiones; P30C, un fragmento interno del antígeno cuya evaluación se informó previamente en la bibliografía (Nigro y col., 2003) y P30L, que comprendió la mayor parte de los aminoácidos de la proteína nativa. Se utilizaron plásmidos diferentes para la expresión de ambas secuencias, siendo éstos a su vez distintos de los empleados por Nigro y col. (Nigro y col., 2003). A pesar de la introducción de estos cambios, no se obtuvo una mejora significativa en relación a los resultados descritos previamente por Nigro y col. empleando P30. Estos Ags se evaluaron solamente mediante ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgA. Los mejores resultados con P30 se lograron detectando IgA específica para diferenciar SIP de SIN usando P30C (área bajo la curva ROC: 0,65). Aun así, la aptitud de este antígeno fue poco satisfactoria. Al igual que con P22L, la hipótesis propuesta fue que la proteína no se logró obtener en su conformación nativa.

Para el análisis de la proteína P35, se dividió la secuencia codificante en 5 regiones que se superponían. Éstas fueron clonadas, así como la secuencia completa del Ag. Pero sólo se consiguieron expresar con éxito dos fragmentos de la región N terminal de la proteína (P35A y P35B). Se probaron diferentes vectores pero no se lograron expresar las secuencias que incluían la región C terminal. De todos los antígenos ensayados en este trabajo, P35B presentó los mejores resultados para discriminar entre SIA y SIC, valorando anticuerpos IgG específicos por ELISA indirecto o midiendo la avidéz de IgG específica (áreas bajo la curvas ROC: 0,85 y 1, respectivamente). Dado el buen desempeño de esta proteína, se desarrolló solamente con la misma un dot blot semicuantitativo para detección de IgG específica (área bajo la curva ROC con P35B: 0,75), nueva metodología propuesta para el diagnóstico.

Finalmente, utilizando herramientas *in silico* se desarrolló un análisis siguiendo principalmente tres etapas: análisis de secuencias, modelado molecular y predicción de epitopes. En P22c se encontraron tres regiones antigénicas que explican el buen desempeño de este Ag. Además, las secuencias antigénicas de P22L que no están presentes en P22c (no se encuentran en la secuencia o se encuentran ocultas en la estructura tridimensional) explicarían la alta reactividad inespecífica evidenciada en P22L. En relación con P30, se identificaron 2 regiones antigénicas, una situada en la región carboxi terminal y la otra en uno de los dos dominios estructurales de la proteína. Por último, el estudio bioinformático de P35 presentó diferencias significativas entre los fragmentos proteicos que pudieron y aquellos que no pudieron ser expresados. A su vez, sólo se encontraron regiones antigénicas importantes en las regiones expresables, principalmente en P35B, explicando los resultados experimentales.

Como conclusión general, nuestros resultados indican que P35B y P22c son antígenos muy promisorios para integrar kits para diagnosticar la fase aguda de toxoplasmosis en Argentina.

Summary

The general objective of this work was to achieve an optimization of acute toxoplasmosis diagnosis in pregnant women to allow for a real prevention of fetal-maternal infection through an early treatment and, alternatively, to avoid such treatment in unnecessary cases.

Toxoplasmosis is an infection caused by *Toxoplasma gondii* protozoan that affects all warm-blooded animals. Although this parasite rarely produces a symptomatic infection in man, it leads to complications in immunosuppressed individuals and pregnant women.

Congenital toxoplasmosis is the second most common parasitic infection in uterus and can cause abortion or bring serious consequences for the newborn, such as brain or ocular tissue damage (e.g. hydrocephalus, mental retardation, deafness, psychomotor impairment, cataracts, strabismus, retinal necrosis and/or blindness).

Typically, the infection begins with the acute phase and after few months transits to the chronic phase. But only in the acute phase, the parasite can infect the fetus. Therefore, it is essential for women to prevent this infection during pregnancy.

There are treatments for pregnant women who are in the acute phase of toxoplasmosis that help to decrease the probability of transmission to the fetus, and prevent potential damages in case of transplacental infection. However, these therapies may be teratogenic and/or they sometime generate intolerance to women. Therefore it is very important to treat patients only whose acute infection has been proven. Consequently, an accurate diagnostic of this infection phase is necessary.

Unfortunately, the accurate diagnosis of acute infection is not a simple task. Indeed, no technique currently allows for unambiguous determination of the infection stage by itself and in only one step. There are several diagnostic schemes, applying different sets of techniques to classify the patient phase as acute or chronic one. However, the reliability of these results is not always appropriate and long periods of time are frequently required to accurately diagnose the infection stage, in detriment of the treatment. It is therefore imperative to find new diagnostic techniques to promptly and accurately define *T. gondii* infection phase.

Antigen selection is one of the key issues of any immunodiagnostic technique. Many *T. gondii* proteins have been assessed to discriminate between acute and chronic phase of the infection but, unfortunately, these studies results are not only inconclusive but often contradictory. Therefore, previous works were deeply analyzed and the potential incongruence sources were identified: different sources of sera, small number of samples, sera uncertain classification as well as different cloning strategies to obtain the recombinant proteins used as antigens.

This research was conducted by studying the usefulness of some *T. gondii* proteins for diagnostic techniques. Analyzing previous bibliographic information, P22, P30 and P35 proteins were chosen. Different regions of the mentioned proteins were selected and cloned. Such antigens were subsequently evaluated by the following immunochemical assays: ELISA to detect specific IgG, IgA and IgM antibodies, avidity ELISA and dot blot assays to detect specific IgG antibodies. To enhance the confidence of our results, during the evaluation design, we took into account the potential sources of disparity of previous works. In this line, to assess proteins we used sera specifically selected according to strict classification criteria. We worked with sera from individuals not infected with *T. gondii* (SIN), with chronic infection (SIC) and with suspected acute infection (SIA). A large number of samples was analyzed so that results were representative of the whole population (except in avidity ELISA case). Furthermore, all immunochemical assessment of the evaluated proteins was performed with sera of people from different regions of Argentina. Taking into account that population infection with different strains of *T. gondii* could influence patient's antibodies reactivity against defined parasite antigens, our results indicate that these antigens behavior should be reproducible in further developed diagnostic kits to be used in our country. Finally, an exhaustive bioinformatics analysis was performed to complement and explain the experimental results.

Two sequences of P22 were analyzed; P22c and P22L. The difference between them was that P22L presented both the signal peptide together with the carboxy terminal region. The presence of these two regions in P22L triggered the formation of inclusion bodies, contrarily to P22c behavior, which expressed as a soluble protein. Although P22L could be solubilized by subsequent procedures, it seems feasible that the obtained antigen did not keep its native conformation. Indeed, P22c and P22L immunochemical performances to detect antibodies were very different, P22c always leading to better results than P22L. It is noteworthy that P22c was the best of all our tested Ags to differentiate between SIP (combination of SIA with SIC) and SIN, when detecting specific anti IgG antibodies by indirect ELISA (area under the ROC curve: 0.82). The obtained results using this antigen were very promising to differentiate between SIA and SIC when assessing avidity of antibodies (area under the ROC curve: 0.82).

Two P30 membrane protein sequences with different extensions were obtained and tested; P30c, an internal fragment of the antigen whose evaluation was previously reported in the bibliography (Nigro *et al*, 2003) and P30L, which encompass most of the entire protein amino acids. Different expression plasmids were used to express both sequences, these plasmids being different to those used by Nigro *et al*. Despite the introduction of these changes, no significant improvement of results was achieved, regarding those previously reported by Nigro *et al* using P30 (Nigro *et al*, 2003). These Ags were assessed by ELISAs to detect only IgG and IgA

antibodies. With P30, the best results were to differentiate between SIP and SIN using P30c by detecting specific IgA (area under the ROC curve: 0.65). However, these were not actually satisfying results. At same that P22L, the proposed hypothesis was that the protein was not obtained in its native conformation

To analyze P35 protein, its coding sequence was divided into 5 overlapping regions which were cloned, as well as the complete sequence of the Ag. Only two fragments of the N terminus of the protein were successfully expressed (P35A and P35B). Although different vectors were tested no sequence including the C-terminal region could be expressed. From all the antigens tested in this work, P35B rendered the best results to discriminate between SIA and SIC, when specific antibodies were detected by indirect ELISA, or by evaluating IgG avidity (areas under the ROC curves: 0.85 and 1, respectively). Considering P35 good performance to detect specific IgG, a semiquantitative dot blot assay was developed only with this protein (area under the ROC curve: 0.75), a new methodology propose to diagnosis.

Further analyses were performed using *in silico* tools, mainly following three steps: sequence analysis, molecular modeling, and prediction of epitopes. Three antigenic regions were found in P22c, explaining its good performance. In addition, the antigenic sequences of P22L which are not exposed in P22c (absent in the sequence or being hidden in its three-dimensional structure) would explain the high nonspecific reactivity displayed by P22L. Regarding P30, two antigenic regions were identified, one located in the carboxy terminal region, and the other in one of the two structural domains of the protein. Finally, P35 bioinformatic study indicates significant differences between the protein fragments that could be and those which could not be expressed. Concerning the antigenic behavior, a major antigenic region was found in both of the expressed regions, and particularly in P35B, explaining the favorable experimental results.

As a general conclusion, results indicate that P35B and P22c are highly useful to diagnose acute phase of toxoplasmosis, envisaging its inclusion in commercial kits to be used in Argentina.



Introducción

1. La infección de toxoplasmosis

1.1. ¿Qué es la toxoplasmosis?

La toxoplasmosis es una infección causada por el protozoo *Toxoplasma gondii* y afecta a 1 de cada 3 personas en todo el mundo, convirtiendo a su agente causal en uno de los más eficientes parásitos. Puede contagiar cualquier mamífero de sangre caliente o ave, aunque sus hospedadores definitivos son los felinos (Peng y col., 2011).

En el hombre es una infección asintomática, pero en ciertas situaciones puede generar complicaciones afectando principalmente al cerebro, ojos y/o fetos de mujeres embarazadas (Peng y col., 2011). La infección pasa por dos fases. Cuando comienza se está en la fase aguda y es cuando puede haber síntomas clínicos. En este estadio el parásito se encuentra replicándose a gran velocidad e invadiendo las diferentes células de todo el cuerpo. Luego de unos meses (el tiempo exacto depende principalmente del individuo) el paciente entra en la fase crónica, en la cual el parásito se replica muy lentamente (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Una vez infectado el hospedador, no hay tratamiento para eliminar completamente al parásito (Cenci-goga y col., 2011).

Si bien en los animales de granja *T. gondii* no genera problemas de salud, al infectarse se convierten en vectores que terminaran infectando al ser humano cuando los ingiera. Otra manera de transmisión en las personas, es por los parásitos que provienen de las heces de los gatos, que pueden adherirse a las manos y si el individuo no se higieniza correctamente antes de comer, se terminará contaminando por ingesta. La contaminación por ingestión es la más usual pero también se puede dar la infección iatrogénica, es decir vía sangre, por tejidos trasplantados, por accidentes de laboratorio u otros (Bojar y Szymańska, 2010). Finalmente, existe la infección congénita, es decir que la embarazada transmita la infección al feto. Pero fuera de la infección iatrogénica y congénita, no se han reportado situaciones de transmisión de toxoplasmosis de una persona a otra (Díaz y col., 2010).

En los individuos inmunocompetentes, la infección generalmente no genera síntomas clínicos. En algunos países europeos o en E.E.U.U., la toxoplasmosis es asintomática para más del 80 % de estos individuos (Montoya y Liesenfeld, 2004). En los casos remanentes se ha observado fiebre o linfadenopatía cervical, a veces asociada a mialgia, astenia u otros síntomas clínicos no específicos, que pueden persistir por algunas semanas. En los casos más severos podemos encontrar coriorretinitis (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Fuera de estos casos poco frecuentes, normalmente sólo hay dos situaciones en las cuales la infección genera problemas:

- En individuos inmunodeprimidos: Son el caso de individuos con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) o con terapias inmunosupresoras por tratamientos después de un trasplante de órganos, para algunas clases de cánceres u otros. Puede generar complicaciones infectándose ya sea antes o durante el proceso de inmunodepresión, pero si el paciente ya se encuentra en la fase crónica cuando comienza la terapia, los problemas suelen ser mayores. Las complicaciones aparecen en los órganos donde suele depositarse el parásito, principalmente en el cerebro, pulmones, ojos y corazón; y secundariamente en médula ósea, vejiga, ganglios linfáticos, riñón, bazo y piel. En el caso de los pacientes con HIV es bastante característica la encefalitis toxoplásmica, que genera dolores de cabeza, fiebre, letargo, incoordinación, parálisis motrices parciales, pérdida de la memoria y/o demencia (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

- En embarazadas: La infección de toxoplasmosis congénita es la segunda infección parasitaria intrauterina más frecuente (Bojar y Szymańska, 2010). Es de vital importancia que las mujeres no se infecten durante la gestación del feto, de lo contrario es posible que el parásito traspase la placenta y genere graves consecuencias para el recién nacido (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). En este caso, es peligrosa la fase aguda de la infección. Esta situación será descripta con mayor detalle en el punto 1.7. de esta misma sección.

1.2. Agente etiológico

La toxoplasmosis es generada por el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*, un protozoo apicomplexa capaz de propagarse asexualmente mediante endodiogenia en células nucleadas. Su reproducción sexual sólo sucede cuando su hospedador es un felino (Peng y col., 2011). Fue descubierto en 1908 pero su clasificación filogenética fue aceptada recién en 1973 (De Fuentes Corripio, 1999), siendo esta:

Reino *Protozoa*.
Phylum *Apicomplexa*.
Clase *Sporozoa*.
Subclase *Coccidia*.
Orden *Eucoccidia*.
Suborden *Eimeriina*.
Familia *Sarcocystidae*.
Subfamilia *Toxoplasmatinae*.
Género *Toxoplasma*.
Especie *Toxoplasma gondii*.

Todos los humanos pueden infectarse por cualquiera de las 3 formas del parásito, correspondientes a sus 3 estadios morfológicos (Cenci-goga y col., 2011; Díaz y col., 2010; Robert-Gangneux y Dardé, 2012):

- Taquizoítos: es el estado asexual de replicación rápida del parásito. El taquizoíto tiene forma de punta de flecha curvada de aproximadamente $2 \times 7 \mu\text{m}$. Puede encontrarse libre en exudados, sangre, secreciones o excreciones. También se lo puede hallar en pseudoquistes, células del huésped sin envoltura quística que contienen numerosos taquizoítos. En la figura 1 se detallan las organelas del taquizoíto y en la figura 2 se muestra una foto del mismo observado al microscopio electrónico.

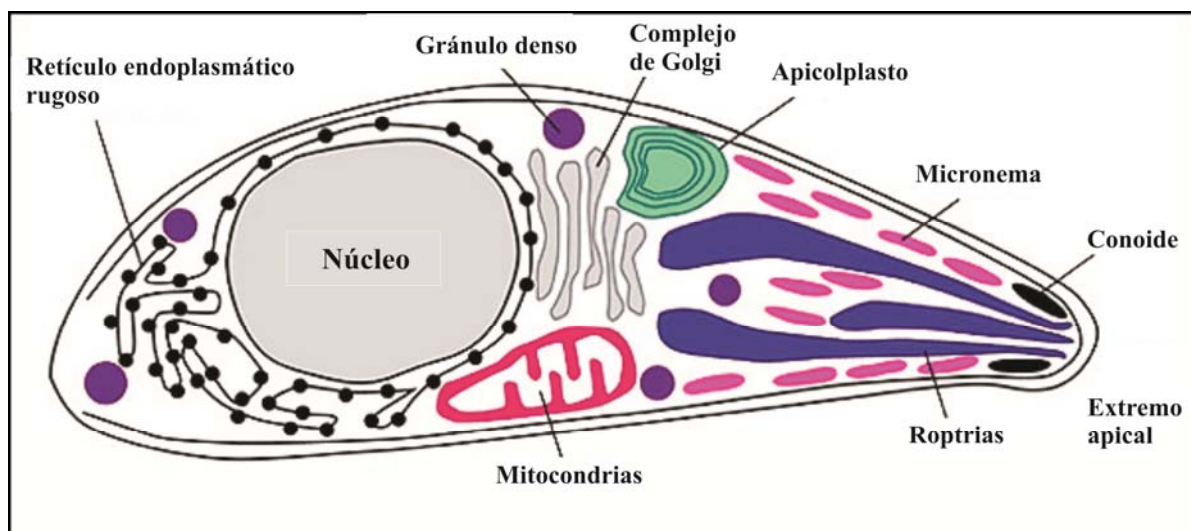


Figura 1: Esquema de un taquizoíto de toxoplasmosis y sus organelas principales (Ajioka y col., 2001)

- Bradizoítos: tienen forma de coma y están rodeados de una verdadera membrana formando un quiste dentro de tejidos y órganos del huésped. Cada quiste puede contener desde 2 hasta 100 bradizoítos, dependiendo de la antigüedad. El tamaño de los quistes va desde 10 hasta 100 μm . Los bradizoítos son de replicación lenta.

- Esporozoítos: Estos se encuentran de a 4 dentro de los esporoquistes elipsoidales, que a su vez están de a 2 dentro de los ooquistes. Los ooquistes tienen un diámetro de 12 a 13 μm .

Los detalles del citoplasma del bradizoíto y esporozoíto no se conocen, debido a que solo el taquizoíto ha logrado cultivarse *in vitro*.

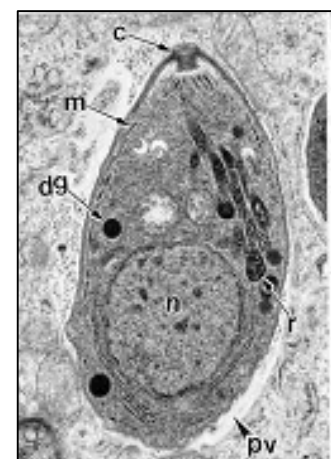


Figura 2: Microscopía electrónica de un taquizoíto de *T. gondii*. pv: Vacuola parasitófora. c: conoide, m: micronemas, dg: gránulos densos, n: núcleo y r: roptrias (Dubey, 1996).

1.2.1. Genotipos de *T. gondii*: mediante estudios de secuenciación, análisis de isoenzimas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) - polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP) y análisis de microsatélites, esta especie se ha dividido filogenéticamente en 12 halogrupos. Los primeros en ser descubiertos fueron 3 linajes bien diferenciados, que poseen muy baja similitud genética entre sí (entre 1 y 2 %) y que se encuentran distribuidos principalmente en Europa y E.E.U.U. Los otros 9, no sólo poseen mayor similitud genotípica entre ellos, sino que además con los tres primeros linajes. Aparecen en los otros países y son difíciles de clasificar (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

Se ha observado que el linaje I es uno de los más virulentos¹, pero es poco aislado en humanos. El linaje más encontrado en personas es el II. Y el linaje III solo se ha podido aislar de animales (Díaz y col., 2010; Munoz, y col. 2011). Otras clases de halotipos se han aislado en personas y cuando poseen mayor virulencia de la normal, suelen tener similitud con el halotipo I (Robert-Gangneux y Dardé, 2012), por ejemplo, una cepa aislada en Sudamérica era altamente agresiva y generaba neumonía en individuos inmunocompetentes (Cenci-goga y col., 2011)

Un punto importante a considerar cuando se observa la cepa de estudio, es la facilidad de diagnóstico de infección. Algunas técnicas no serían tan eficientes para diagnosticar la infección cuando se encuentren involucradas ciertas cepas (Ferrandiz y col., 2004). Kotresha y Noordin sugieren que una de las posibles razones por las que hay tanta diversidad en los resultados de los investigadores que evalúan las mismas proteínas recombinantes se debe a que trabajan con sueros de individuos provenientes de diferentes zonas geográficas que, por lo tanto, fueron expuestos a cepas diferentes que expresan proteínas polimórficas (Kotresha y Noordin, 2010; Kotresha y col., 2012).

1.3. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

Si bien los huéspedes definitivos son únicamente los felinos, los huéspedes intermediarios potenciales son todos los animales de sangre caliente. Al parásito se lo ha encontrado tanto en animales domésticos como de granja, por ejemplo: porcinos, ovinos, caprinos, bovinos, equinos y caninos. También se lo ha encontrado en diferentes animales salvajes, desde los canguros australianos hasta los zorros árticos de Noruega, pasando por monos, aves migratorias y diferentes depredadores, entre muchos otros (Díaz y col., 2010). Al ser tan amplio el reservorio natural de este patógeno, probablemente nunca pueda ser totalmente eliminado (Bojar y Szymańska, 2010).

¹ Virulencia: en las diferentes cepas de *T. gondii*, se evaluó observando los días que tarda en matar ratones infectados.

Exceptuando la infección iatrogénica y congénita, la toxoplasmosis se contagia por ingestión del parásito, cuando un animal se come a otro infectado o a plantas donde se depositaron los ooquistes. El ser humano tiene altas probabilidades de contagiarse cuando no cocina bien la carne, no lava bien los vegetales y/o no posee buenos hábitos de higiene y limpieza general, por ejemplo: lavarse las manos luego de jugar con gatos o trabajar en el jardín. La figura 3 muestra la circulación del *T. gondii* entre los diferentes hospedadores (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

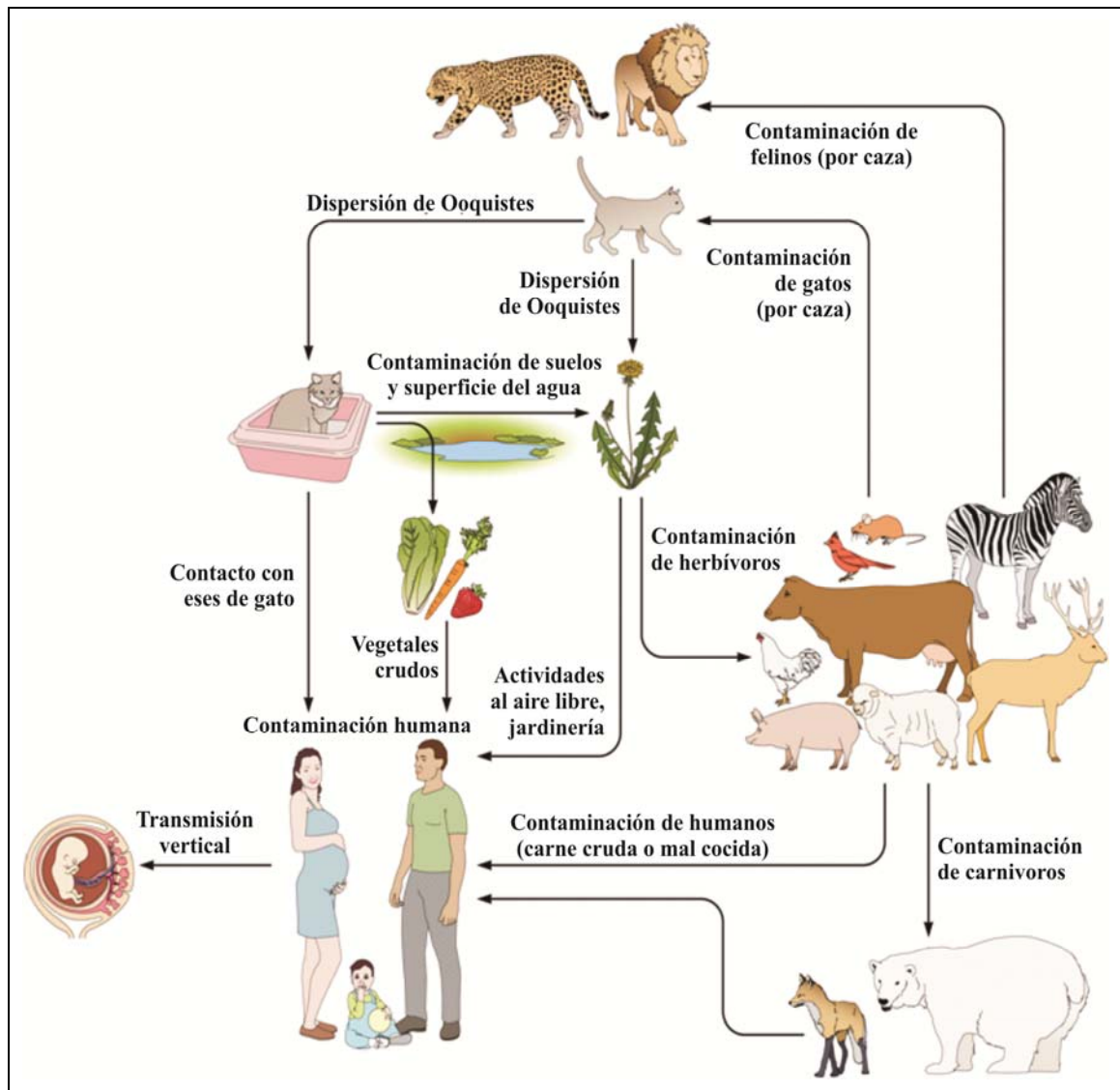


Figura 3: Ciclo del *T. gondii* a través de los diferentes hospedadores (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

Dependiendo de la clase de huésped, se desarrollará la replicación sexual principalmente o la replicación asexual únicamente. El ciclo comienza cuando algún felino ingiere una presa infectada con quistes tisulares (forma infectiva que contiene bradizoítos). En el intestino se

liberan los bradizoítos de los quistes e invaden los enterocitos del mismo intestino. Ahí ocurre una limitada reproducción asexual que forma gametos femeninos y masculinos (separados en distintos enterocitos), preparando los parásitos para la replicación sexual. Este proceso de desarrollo y diferenciación celular se denomina gametogonia. Luego hay un proceso de fertilización que conduce a la formación de los ooquistes (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

El ooquiste es liberado en forma no esporulada a través de las heces de los felinos y expuesto al medio ambiente, en donde bajo condiciones adecuadas esporula en 2 o 3 días, generando en su interior 8 esporozoítos. El ooquiste así maduro se convierte en la forma infecciosa. Millones de ooquistes son producidos y liberados por los felinos a través de las heces, contaminando suelo, plantas y fuentes de agua (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009). Los ooquistes pueden sobrevivir en el medio ambiente durante muchos años (Dubey, 2004). Se mantienen estables y con resistencia a muchos desinfectantes mientras están en ambientes tibios y húmedos, pero sobreviven pobremente en climas fríos o áridos.

Luego los huéspedes intermediarios se contaminan por consumo de ooquistes o de quistes tisulares presentes en los tejidos de otros huéspedes intermediarios. En estos huéspedes en donde se genera la reproducción asexual únicamente (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009).

Una vez ingerido el ooquiste o el quiste tisular, se liberan los esporozoítos o los bradizoítos respectivamente. Cualquiera de los 2 rápidamente se diferencia a taquizoíto, la forma altamente dinámica e invasiva que atraviesa eficientemente el epitelio intestinal, diseminándose a través de todo el organismo (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009). Prácticamente, el parásito tiene la capacidad de infectar cualquier célula nucleada de un organismo (Díaz y col., 2010). *T. gondii* comienza así a introducirse en diferentes células y a reproducirse asexualmente en su interior (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009).

La reproducción asexual del parásito se lleva a cabo mediante endodiogenia, proceso mediante el cual se forman dos células hijas en el interior de la célula madre. Durante la maduración de las células nuevas, éstas incorporarán algunas organelas de la célula madre mientras que otras las generarán *de novo*. Esta replicación celular ocurre sucesivamente hasta que el número de taquizoítos es entre 64 y 128, entonces se rompe la vacuola parasitófora (vesícula donde se aloja) y la célula hospedadora. Los taquizoítos son entonces liberados al torrente sanguíneo, propagándose por todo el cuerpo y comenzando con la infección aguda (Díaz y col., 2010; Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009).

La presencia de *T. gondii* en el organismo activa la respuesta inmune del huésped. Esta reacción sobre el parásito induce la diferenciación de los taquizoítos intracelulares a la forma de bradizoíto, con la consecuente transformación de la célula hospedadora a un quiste tisular en el cual

vive en una forma latente durante muchos años o incluso durante toda la vida del individuo (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009).

Una de las características que determinan la patogenia de toxoplasmosis está relacionada con la alta capacidad del parásito para diseminarse por todos los tejidos del huésped, atravesando barreras biológicas tisulares y alcanzando incluso órganos inmunoprivilegiados como cerebro, ojo y placenta en mujeres embarazadas. Todas las formas invasivas de *T. gondii* (esporozoíto, taquizoíto y bradizoíto) tienen la capacidad de invasión celular, pero el taquizoíto es la forma más invasiva, proliferativa y con mayor capacidad de diseminación tisular (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009).

1.4. Invasión celular y proteínas involucradas

Como *T. gondii* es un parásito intracelular obligado, la invasión celular es un evento crucial en su supervivencia (Díaz y col., 2010), para lo cual emplea principalmente 3 organelas: micronemas, roptrias y gránulos densos (ver figura 1). Éstas generan proteínas muy importantes para la invasión celular que son liberadas desde el extremo apical del parásito y son denominadas proteínas MIC, ROP y GRA, respectivamente, (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009). Otra manera de nombrarlas es mediante el peso molecular aparente que mostraron las primeras veces que fueron corridas en electroforesis en gel de poliacrilamida² (PAGE), por ejemplo: GRA8 también se denomina P35 porque en un PAGE corrió como una proteína de 35 KDa (kilo daltons) de masa molecular.

El taquizoíto, durante su búsqueda de un sitio blanco por donde introducirse, está continuamente liberando proteínas MIC. Éstas permiten la adhesión y el deslizamiento del parásito sobre la membrana de las células blanco, proceso imprescindible para la invasión. Por ejemplo, se ha propuesto que específicamente MIC3 es la que permite la adhesión y penetración en las células del endotelio. Cuando encuentra un buen sitio en la célula del hospedador para introducirse, libera más proteínas MIC para anclar el extremo apical a las proteínas receptores blancos de la célula hospedadora. Se sabe que *T. gondii* expresa más de 15 proteínas MIC durante todo el proceso. Luego se liberan proteínas ROP (que a diferencia de las MIC muchas tienen actividad enzimática), que interactúan con las MIC. Al mismo tiempo, varias proteínas ROP son inyectadas en la célula del hospedador. Entre las MIC y las ROP se desarrolla la penetración del parásito comenzando por su extremo apical. Para esto se genera previamente un orificio de menos de 1 μm de diámetro, por el cual el taquizoíto se internaliza mediante movimientos tipo tornillo. Al mismo tiempo que se va introduciendo, se genera una invaginación de la membrana plasmática de la célula hospedera (inducida por las proteínas ROP), generando

² En algunos casos la denominación de las proteínas no sigue ninguna de estas dos maneras.

la vacuola donde se hospedar  el parásito. Luego el parásito inicia rápidamente la secreción de proteínas GRA hacia el espacio intravacuolar, transformando la vacuola endocítica en una vacuola parasitófora. Algunas de estas proteínas se insertan en la membrana de esta vesícula, por ejemplo, GRA3, GRA5, GRA7 (P29) y GRA8 (P35). Otras como GRA1 (P24), GRA2 (P28), GRA4 (P41), GRA6

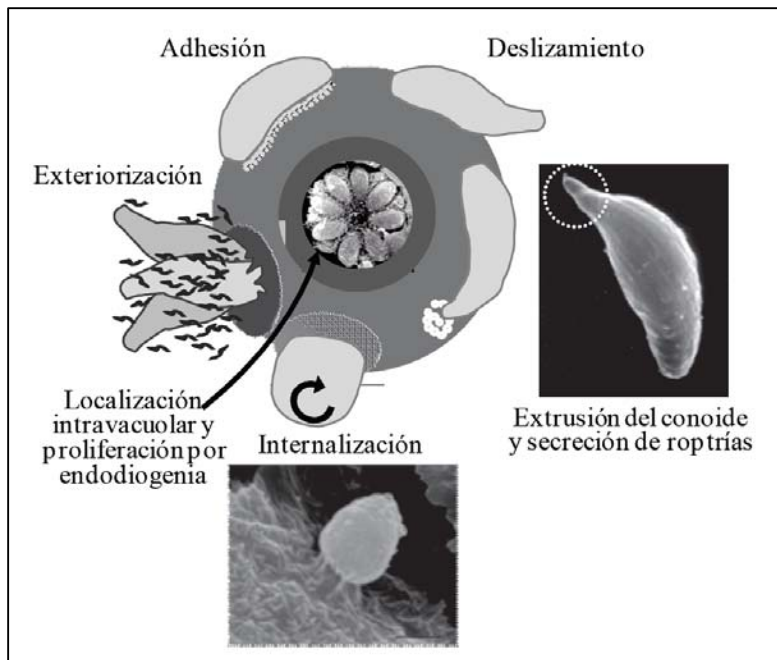


Figura 4: Esquema del proceso invasivo de *T. gondii* sobre una célula del hospedador (Mu niz Hernández y Mondragón Flores; 2009).

(P32) y GRA9 quedan en el espacio intravacuolar. Hasta ahora hay 16 proteínas GRA descubiertas que, entre otras funciones, permiten que el parásito pueda tomar nutrientes desde el citoplasma de la célula hospedadora y acondicione la vacuola parasitófora para la reproducción asexual. A su vez, proteínas ROP van mediando la interacción entre esta vacuola y las organelas de la célula del hospedador, suministrando al parásito de todo lo que precisa. En la figura 4 se muestra un esquema del proceso de invasión (Díaz y col., 2010; Carruthers y col., 2006; Huynh y col., 2006; Mu niz Hernández y Mondragón Flores, 2009).

Otro grupo de proteínas importante es el de los antígenos de superficie (SAG). Son 21 proteínas (descubiertas hasta la actualidad) que se encuentran expuestas sobre la superficie de la membrana del parásito, ancladas a la misma a través de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Se sabe que participan en la unión a las células del hospedador y que contribuyen en la virulencia de las cepas de *T. gondii* (Lekutisa y col., 2001). Hay evidencias de que varias de estas proteínas son específicas de ciertos estadios morfológicos del parásito. Se comprob  que SAG1 (P30) y SAG2A (P22) son específicas de los taquizoítos mientras que SRS9, BSR4 (P36) y SAG4A (P18) son específicas de los bradizoítos. Además, se ha corroborado que el sistema inmune actúa sobre el parásito a través de varias de estas proteínas (Boothroyd y col., 1998; Kim y Boothroyd, 2005).

1.5. Respuesta inmune ante la infección

La dispersión sistémica inicial de los taquizoítos es realizada por las células monocíticas intestinales que son infectadas al comienzo. Así el parásito se distribuye en diferentes lugares del organismo, donde se reclutarán neutrófilos, células dendríticas y macrófagos. Estas células, por un lado bajarán la carga parasitaria local actuando por sí mismas, y por el otro liberarán citoquinas como interleuquina 12, que estimula a las células natural killer. Éstas producirán interferón γ , que estimulará a los macrófagos para producir factor de necrosis tumoral α . Estas citoquinas activarán los linfocitos Th1 que estimularán a su vez a los linfocitos T CD8⁺ (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Al comienzo de la infección también se activarán los linfocitos B con la correspondiente generación de anticuerpos (Acs), en parte gracias al interferón γ . Cuando el sistema inmune logra controlar la replicación de los taquizoítos, estos se transforman en bradizoítos que convierten a la célula hospedadora donde se encontraban en un quiste, limitándose la fase aguda de la infección y estableciéndose así la infección crónica (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009).

En lo que es la respuesta humoral, los primeros isotipos de Acs específicos que aparecen son inmunoglobulinas A y M (IgA e IgM), en ese orden. Se presentan en la primera semana de infección y su título llega a un máximo al mes. Los anticuerpos isotipo IgE no siempre aparecen en la infección de toxoplasmosis; si lo hacen, aparecen antes que IgM y desaparecen rápidamente (Villena y col., 1999; Foudrinier y col., 2003). Los niveles de IgM van disminuyendo después del primer mes y desaparecen en el 25 % de los pacientes al séptimo mes, en el resto de los casos siguen presentes hasta el año o más (Gras y col., 2004). El isotipo IgA desaparece antes que la IgM pero en algunos casos ha sido detectada hasta el noveno mes de la infección (Robert-Gangneux y col., 1999). La IgG aparece 1 a 3 semanas después de ser detectada la IgM, llegando a un máximo de concentración a los 2 o 3 meses, luego comienza a bajar lentamente pero nunca desaparece (Durlach y col., 2008). En la figura 5 se muestra un esquema de la cinética de Acs IgA, IgG e IgM.

Todos los isotipos de Acs pueden ser producidos por el mismo linfocito B. Diferentes células o clones de linfocitos B varían entre sí por la especificidad de los Acs que producen. Los Acs producidos por un mismo linfocito B unen una única región de alguna proteína parasitaria. Estas regiones se llaman epitopes. Es decir que cada clon de linfocito B produce Acs que unen un único epitope a través de diferentes isotipos de anticuerpos (IgD, IgM, IgA, IgE o IgG), que va produciendo a lo largo de su vida o maduración (Abbas y col., 2012). A su vez los epitopes en las proteínas del parásito se pueden clasificar en 2 clases:

- Epitopes lineales: los definen la identidad de los aminoácidos (AAs) en un orden específico en la estructura primaria de la cadena polipeptídica, independientemente de su disposición espacial (Abbas y col., 2012).

- Epitopes estructurales: los definen la identidad de los AAs en una ubicación espacial específica, independientemente de que estén o no contiguos en la estructura primaria de la cadena polipeptídica (Abbas y col., 2012).

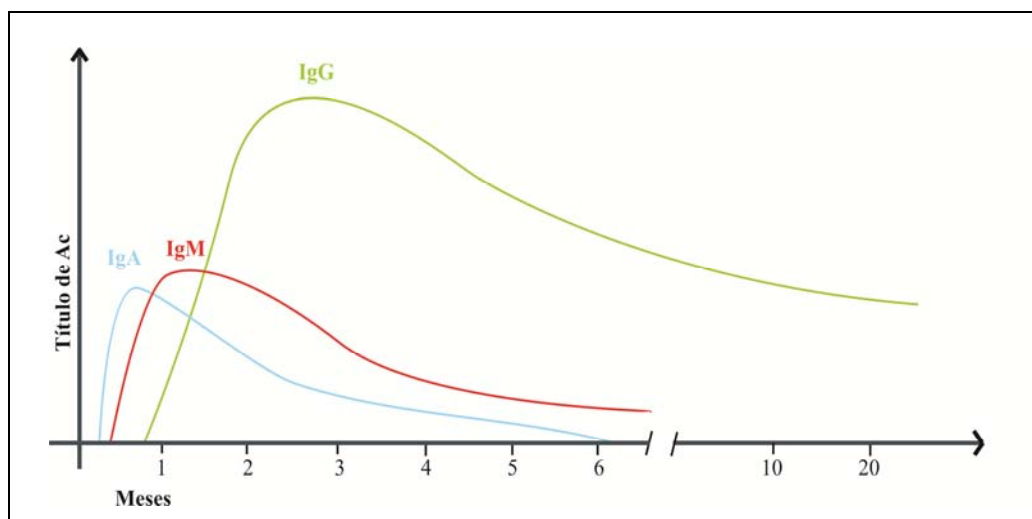


Figura 5: títulos de los anticuerpos IgG, IgM e IgA con el transcurso de los meses.

1.6. Prevalencia de la infección en el mundo, Argentina y Santa Fe

En general, la incidencia de la infección varía según el grupo de población, hábitos alimenticios, higiene ambiental, ocupación y la región geográfica. Con respecto a esto último, suele ser menor en las regiones frías, áridas y/o elevadas (McCabe y Remington, 1991).

Se asume que entre un 25 y 30 % de la población mundial tiene toxoplasmosis. Pero la prevalencia cambia de una región a otra desde 10 hasta 80 %, inclusive dentro de un mismo país. Una prevalencia de 10 a 30 % se encuentra en América del Norte, el norte de Europa y el sureste de Asia. Una prevalencia de 30 a 50 % tienen los países del centro y sur de Europa. Y prevalencias de más de 50 % se encuentran en varios países de América Latina y África (Montoya y Liesenfeld, 2004; Pappas y col., 2009). Por ejemplo la prevalencia de toxoplasmosis en Brasil es 66,3 %, en Perú es 55 %, en Chile es 36,2 %, en Uruguay es 49 % y en Colombia es 47,1 % (Díaz y col., 2010; Kaufer y Carral, 2012).

También se han realizado estudios de prevalencia de la infección en diferentes regiones de nuestro país, Argentina. Se han encontrado valores de: 47,3 % en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires; 51,7 % en toda la provincia de Buenos Aires; 39,7 % en la ciudad de Jujuy; 28,5

% en la ciudad de Resistencia; 23,8 % en la provincia de Chaco y 42,2 % en la provincia de Santa Fe (Durlach y col., 2008).

La infección afecta ambos sexos por igual y mientras mayor sea la edad de los individuos mayor la probabilidad de que tengan toxoplasmosis (Durlach y col., 2008; Marder y col., 2001).

1.7. Infección en la embarazada y el feto

Como se mencionó al principio, la toxoplasmosis no suele generar complicaciones, excepto en 2 situaciones, cuando se infectan individuos inmunodeprimidos y cuando se infectan embarazadas. No hay inconveniente que una mujer estando en la fase crónica de la infección quede embarazada, los problemas pueden ocurrir si en algún momento se superpone la fase aguda de la infección con el embarazo. La mujer no tiene riesgos mayores a los habituales, el problema es que el parásito puede atravesar la placenta e infectar al feto, generando una infección congénita. Si ocurre, las probabilidades de dañar al feto o al niño luego de nacer dependerán del trimestre en que suceda la infección (Díaz y col., 2010 y Robert-Gangneux y Dardé, 2012). En la figura 6 se muestran las probabilidades de contagio del feto y de generar daño, en función del trimestre en el que ocurre la infección aguda y congénita, respectivamente.

Cuando la infección es en el primer trimestre, puede producirse un aborto espontáneo. En casos no fatales, se generan problemas de desarrollo en los tejidos cerebrales u oculares, por el desarrollo de focos necróticos o inflamación severa. Las lesiones cerebrales se manifiestan muchas veces como hidrocefalias, microcefalia, mesenterio hiperecogénica, hepatoesplenomegalia y/o calcificaciones, que luego en el niño se puede manifestar clínicamente como retraso mental, convulsiones, sordera, epilepsia, anemia, trombocitopenia, trastornos hepáticos, neumonitis y/o deficiencia psicomotora (Remington y col., 2001). Las lesiones en los tejidos oculares se pueden manifestar también en el niño como microftalmia, cataratas, presión intraocular incrementada, estrabismo,

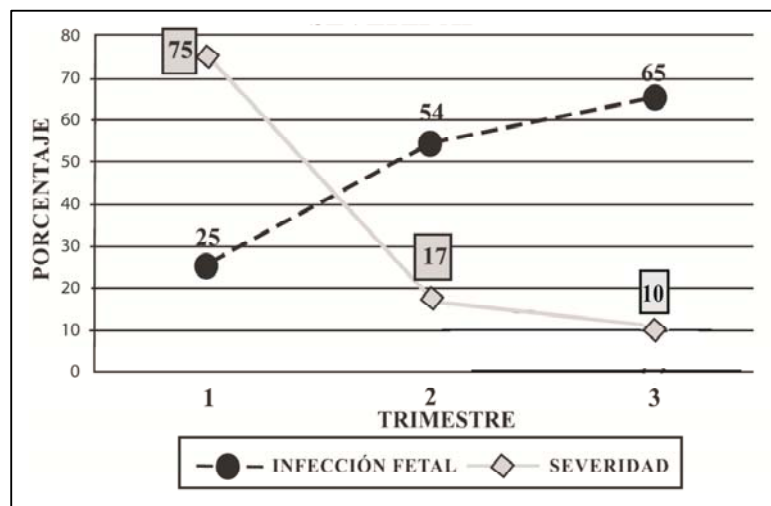


Figura 6: Probabilidades de infección fetal (círculo negro) y severidad de la misma (rombo gris) en función del trimestre del embarazo (Díaz y col., 2010 y Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

neuritis óptica, necrosis retinal, uveítis, coriorretinitis y/o hasta ceguera (Delair y col., 2011).

El grupo de mujeres embarazadas con mayor riesgo para primoinfección con *T. gondii* son las adolescentes, en especial cuando residen en ambientes contaminados por animales huéspedes y vehículos de transmisión de ooquistes (Díaz y col., 2010).

Se considera que la toxoplasmosis crónica es beneficiosa para la mujer, porque evita la infección congénita eliminando las posibilidades de complicaciones en sus futuros hijos (Bojar y Szymańska, 2010). En nuestro país, la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres en edad de concebir es del 40,5% (Durlach y col., 2008). Es decir que más de la mitad de las mujeres en edad de concebir se encuentra expuesta a una primoinfección.

1.8. Tratamiento de la infección en embarazadas

Si se confirma que la embarazada se encuentra en la fase aguda, hay que comenzar a realizar controles mediante ecografía uterina que permitirá detectar embrio/fetopatías y pronosticar la dirección de las complicaciones (Durlach y col., 2008). Realizar controles serológicos periódicos como seguimiento del tratamiento de una embarazada carece de valor y no debería indicarse (Bertolino y col., 2011).

Las embarazadas con infección reciente confirmada, deben ser tratadas con las drogas: pirimetamina, sulfadiazina, ácido fólico, espiramicina y clindamicina. La administración de estas drogas reduce las probabilidades de infección congénita y, en caso que ocurra, también disminuye los efectos nocivos del parásito sobre el feto. Su manera de administración dependerá principalmente del momento de la primoinfección y debe ser cuidadosa y controlada, debido a la toxicidad de estas drogas. La pirimetamina y la sulfadiazina pueden perjudicar al feto porque son teratogénicas (Bertolino y col., 2011). Además, muchas veces generan intolerancia en la embarazada por producir náuseas, malestar estomacal, vértigo, hipersensibilidad, anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, glositis atrófica, hematuria, arritmias, hiperfenilalaninemia, síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica (Villena y col., 1998). Por todos estos problemas es que se debe tener cuidado al indicar este tratamiento.

El mayor beneficio se obtiene con tratamiento temprano. Por ello es muy importante comenzar el mismo con certeza y rapidez (Bertolino y col., 2011; Li y col., 2000a) y de aquí la relevancia de diagnosticar la fase de la infección sin demoras y eficientemente.

1.9. Técnicas actuales para el diagnóstico

El diagnóstico de esta infección puede ser de manera directa (procedimiento poco habitual) detectando el parásito o su ácido desoxirribonucleico (ADN), o de manera indirecta detectando los Acs específicos contra *T. gondii* (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

Las principales técnicas actuales para diagnosticar toxoplasmosis y sus estadios son: ensayo de Sabin-Feldman, inmunofluorescencia, inmunofluorescencia indirecta (IFI), visualización directa, aislamiento del parásito por cultivo en ratones o en cultivo celular en fibroblastos humanos, PCR de muestras del paciente, aglutinación directa sensibilizada, ensayo de aglutinación por inmunoabsorción (ISAGA), hemoaglutinación indirecta (HAI), DYE-Test, ensayo de avidéz, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y ensayo con látex. A continuación se explicarán con más detalle aquellas técnicas utilizadas o mencionadas en este trabajo:

1.9.1. Ensayo de Sabin-Feldman: Mide preferentemente anticuerpos IgG. Como antígenos (Ags) se utilizan parásitos vivos de *T. gondii*, pues estos pierden la capacidad de colorearse con azul de metileno al ponerse en contacto con sueros que contienen Acs contra ellos. La muestra se observa al microscopio y *T. gondii* se observará teñido o no dependiendo de la presencia de Acs específicos en la muestra. Si el 50% o más se encuentran sin teñir, la reacción es positiva. Es un método de alta especificidad y sensibilidad, pues no hay reacción cruzada con otros protozoos o agentes infecciosos (Beaman y col., 1997; Sabin y Feldman, 1948). Ésta es la prueba de referencia para diagnosticar la infección según la Organización Mundial de la Salud.

1.9.2. IFI: detecta Acs específicos IgG, IgM o IgA. Se utilizan parásitos muertos en formol o liofilizados. Los Acs presentes en el fluido biológico del paciente se adhieren a la pared del parásito, donde se ponen de manifiesto por medio de anti-Ac humano, conjugado con isotiocianato de fluoresceína, observándolos con un microscopio de luz de fluorescencia. Es una prueba sensible y específica pero puede dar algunas reacciones cruzadas (es decir, falsos positivos; ver punto 2.1.1 en Materiales y Métodos) (McCabe y Remington, 1991).

1.9.3. ISAGA: Se emplean placas de poliestireno o cloruro de polivinilo con pocillos de fondo en U. Éstas primero se sensibilizan con Ac policlonal anti IgM, IgA o IgE humana. Luego se captura este Ac de la muestra de suero del paciente y, finalmente, se incuba con el parásito. Si había Acs anti- *T. gondii* en el suero, se formará un precipitado con forma circular en el fondo del pocillo (McCabe y Remington, 1991).

1.9.4. HAI: Los glóbulos rojos de animales, estabilizados y sensibilizados con Ags del parásito, se ponen en contacto con el suero a evaluar. Si hay Acs específicos contra *T. gondii*.

ocurre el fenómeno de hemoaglutinación. Mediante esta técnica se pueden determinar IgM e IgG específicas (Patton y col., 1990).

1.9.5. ELISA: Se realiza en placas de poliestireno o cloruro de polivinilo, con numerosos pocillos. El fondo de los mismos es el soporte sólido que se recubre con Ag o Ac. El último compuesto que se emplea, suele estar conjugado a una enzima de reacción colorimétrica. Finalmente se realiza una lectura cuantitativa con un espectrofotómetro (Porstmann y Kiessig, 1992). Existe una gran variedad de clases de ELISA, pero en el diagnóstico de toxoplasmosis se emplean:

ELISA indirecto: El soporte sólido captura el Ag. Luego se lo expone al suero para que se unan los Acs específicos. Finalmente, se lo incuba con un Ac (conjugado a la enzima) específico contra el isotipo que se desea determinar. Se emplea para detectar un isotipo a la vez, principalmente IgG, aunque también se lo emplea para detectar IgM, IgA e IgE (Borges y de Castro Fiquereido, 2004; Contreras y col., 2000; Araújo y Ferreira, 2010).

ELISA de inmunocompetición: El soporte sólido se recubre del Ag. Luego los Acs de la muestra inhibirán la unión posterior de un Ac monoclonal que suele estar conjugado a la enzima. Detecta todos los isotipos de Ac presentes en la muestra (Porstmann y Kiessig, 1992).

ELISA de inmunocaptura: Un Ac policlonal específico contra IgM o IgA humana se fija en el soporte sólido. Luego se lo expone al suero y se capturan todos los Acs de ese isotipo, entre ellos, los específicos contra *T. gondii*. Finalmente, se incuba con el antígeno que estará unido a la enzima (Santoro y col. 1985; Porstmann y Kiessig, 1992).

ELISA doble sándwich: En el soporte sólido, primero se inmoviliza un Ac contra algún isotipo específico de Ac. Luego se siembra el suero, uniéndose un isotipo específico de Ac. Se coloca el Ag y finalmente se coloca un Ac específico contra el Ag de interés (que estará unido a la enzima). Este ELISA elimina reacciones cruzadas que pueda haber con contaminaciones en la muestra del Ag (Decoster y col.; 1988; Lu y col., 2006; Suzuki y col., 2000).

1.9.6. Ensayo de avidéz: Se emplea para determinar la avidéz de los anticuerpos IgG y así poder inferir la antigüedad de la infección. A mayor avidéz, más antigua la infección. Hay diferentes variantes, pero en su protocolo experimental son similares a un ELISA indirecto. Al final se compara la diferencia de señales al desarrollar la técnica procesando o no con un agente caotrópico a los Acs del suero (Contreras y col., 2000; Remington y col., 2004; Béla y col., 2008). Esta técnica se explicará con mayor detalle en el punto 1.3.3. de Materiales y Métodos y 1.1.4.4. de Resultados y Discusiones.

1.10. Técnicas actuales para el diagnóstico de fase aguda de la infección

La sensibilidad y precisión de las técnicas para detectar presencia o ausencia de infección es suficientemente buena. El problema surge cuando hay que diferenciar una infección aguda de una crónica. Se emplean las mismas técnicas serológicas, pero observando presencia y concentración de Acs se trata de inferir la fase de infección (Pfrepper y col., 2005). Desafortunadamente, esto tiene ciertas deficiencias que dificultan estandarizaciones y diagnósticos. La presencia o concentración de un isotipo de Ac en cada estadio de la infección es variable de un individuo a otro. Esta diferencia se acentúa cuando las personas están recibiendo algún tratamiento médico (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Además, el tiempo en que aparece cada Ac y el que tarda en llegar al título máximo depende de la técnica empleada (Durlach y col., 2008). Por esto, es difícil estandarizar por serodiagnóstico cuando un individuo se encuentra en la fase aguda o en la crónica (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). No obstante, a pesar de estos problemas, la detección de una seroconversión³ es prueba inequívoca de infección primaria (Durlach y col., 2008).

Se observó que la detección de IgG usando una técnica u otra puede variar dependiendo de los Acs empleados (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Pero independientemente de esto, otra forma de hacer el diagnóstico de fase aguda de la infección es medir los títulos de IgG en el suero del paciente en dos muestras tomadas en un intervalo de 3 semanas, el incremento del Ac sugiere que la infección comenzó en menos de 2 meses desde que se tomó la primera (Lefevre-Pettazoni y col., 2007; Durlach y col., 2003). La prueba de Sabin-Feldman, que mide principalmente IgG, utiliza parásitos vivos, y el mantenimiento de la cepa requiere un bioterio o una línea de cultivo celular solamente disponibles en laboratorios especializados (Durlach y col., 2008). También se puede medir la avidéz de este Ac, técnica más confiable que la determinación de los niveles del Ac en sí, pero sólo se puede tener confianza de un diagnóstico de fase crónica al encontrar alta avidéz (Robert-Gangneux y Dardé, 2012), porque la maduración de la avidéz de los Acs varía en cada individuo (Béla y col., 2008). La técnica de HAI tampoco se recomienda para diagnóstico de toxoplasmosis aguda, debido a que demora más de 2 meses de comenzada la infección en dar positiva y, por lo tanto, no detecta tempranamente la seroconversión (Durlach y col., 2008).

Normalmente la IgM puede ser detectada por ISAGA o por ELISA hasta 4 meses después de iniciada la infección. Pero Gras y col. detectaron IgM en 27 % de 446 mujeres hasta 2 años después de comenzada la infección mediante la técnica ISAGA. Dicho porcentaje cayó a 9 % empleando IFI (Gras y col., 2004), pero la IFI anti-IgM tiene interferencias: los títulos elevados

³ seroconversión: es cuando dos muestras de un paciente tomadas en distintos momentos en el tiempo resultan la primera negativa y la segunda positiva para la presencia de un isotipo específico de Ac contra *T. gondii*, mediante una misma técnica.

de IgG pueden dar lugar a resultados falsos negativos, mientras que el factor reumatoide o Acs naturales pueden dar resultados falsos positivos. De nuevo, solo se puede confirmar con seguridad un diagnóstico de infección crónica cuando la IgM no se detecta (Durlach y col., 2008).

Considerando que normalmente a las mujeres se las evalúa pocas veces durante el embarazo y las complicaciones de las técnicas de diagnóstico recién mencionadas, se requiere la realización de varias de ellas para confirmar la infección aguda (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

Durlach y col., un grupo de expertos en el diagnóstico de toxoplasmosis en nuestro país, propusieron un algoritmo de diagnóstico a seguir con las mujeres embarazadas. Éste se muestra en la figura 7. Se observa que en caso que IgM resulte positiva, para confirmar la infección aguda se requiere comparar todos los ensayos realizados hasta el momento con nuevos a realizar, por ejemplo: IFI para IgM, determinaciones por inmunocaptura, prueba de avidéz, etc.

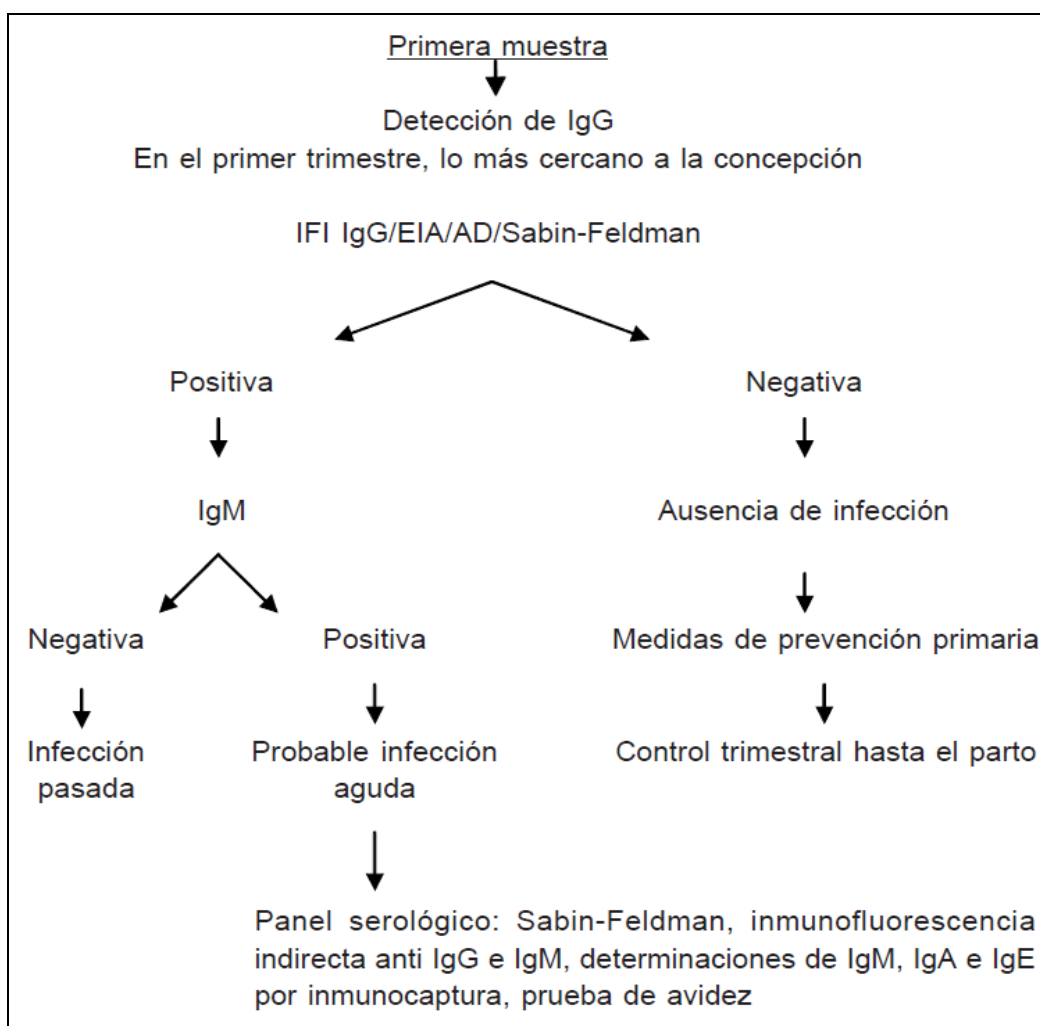


Figura 7: Algoritmo de las pruebas de tamizaje en el diagnóstico de la toxoplasmosis aguda, en la mujer embarazada. EIA: ELISA. AD: Aglutinación directa sensibilizada. (Durlach y col., 2008).

Las técnicas recomendadas y su combinación coincide con las pautadas internacionalmente (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Durlach y col. recomiendan comenzar con las evaluaciones lo más temprano posible luego de la concepción, realizando un examen trimestral y uno un mes antes de la fecha probable de parto (Durlach y col., 2008). Aquí difiere un poco a lo aconsejado por Robert-Gangneux y Dardé, quienes recomiendan un examen cada 2 o 3 semanas (Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Esta diferencia de criterios se debe a que, en nuestro país, una gestante puede tener un control trimestral, un control por embarazo o no tener ningún control, según el lugar donde se atienda y las posibilidades del equipo tratante. Además, no siempre las pruebas serológicas disponibles son las adecuadas o suficientes. (Durlach y col., 2008). Por todo esto, se requiere de nuevas técnicas diagnóstico de mayor efectividad que eliminen la necesidad de confirmación de infección aguda mediante numerosos ensayos y que, además, sean simples y accesibles. Por ello, todavía hoy en día muchos laboratorios siguen explorando nuevas técnicas o variantes a las utilizadas actualmente (Kotresha y Noordin, 2010; Robert-Gangneux y Dardé, 2012).

2. Optimización del diagnóstico de la fase aguda de toxoplasmosis

2.1. Técnicas experimentales

Como se mencionó en el punto 1.10. de esta misma sección, las técnicas actualmente disponibles en la clínica médica para diferenciar una infección aguda de una crónica, en muchos casos arrojan resultados indefinidos debido, entre otras cosas, a las particularidades de la cinética de Acs que genera esta infección (Pfrepper y col., 2005; Nigro y col., 2003; Kotresha y col., 2012). Esta situación impulsa a muchos grupos a trabajar en la obtención de nuevas técnicas para orientar al obstetra en el diagnóstico de una infección aguda en el curso de un embarazo. De tal manera, en el desarrollo de estas nuevas técnicas aparecen 3 preguntas a contestar:

- ¿Que antígeno emplear?
- ¿Que isotipo de anticuerpo detectar?
- ¿Que técnica utilizar?

El último punto depende en cierto grado de los 2 primeros. Por lo tanto inicialmente hay que definir el Ag y Ac. Analizar que Ac conviene detectar no es difícil. Solo existen 4 isotipos comunes libres en sangre: IgG, IgA, IgM e IgE (Contreras y col., 2000; Foudrinier y col., 2003); y hay metodologías estandarizadas para observar cual se desempeña mejor con cada Ag. Según que Acs se analicen, se encontrarán Acs específicos o no de la fase aguda o crónica (Candolfi y col., 2007; Lu y col., 2006). Por ejemplo, en el caso particular de la IgE, Kumolosasi y col. demostraron que ese isotipo de Ac sólo reconoce específicamente las proteínas Roptrias (Kumolosasi y col., 1994). Por lo tanto, como paso inicial se debería escoger el Ag a emplear.

Una vez seleccionado el Ag y el Ac, se debe definir la técnica. Uno de los procedimientos comunes es el ELISA. Es un test sencillo para un laboratorio de investigación, se pueden procesar muchas muestras al mismo tiempo y hay muchas variantes disponibles (Pietkiewicz y col., 2004; Aubert y col., 2000). Pero se deben buscar nuevos procedimientos, accesibles a centros de diagnósticos de baja complejidad, que no requieran de instrumental costoso y que sean simples (Kotresha y Noordin, 2010; Robert-Gangneux y Dardé, 2012). Respecto a esto, nuestro grupo de trabajo tiene 2 líneas de desarrollo de nuevos procedimientos diagnóstico, mediante biosensores amperométricos (Belluzo y col., 2011) o mediante partículas de Ag-latex para inmunoprecipitación (Gonzalez y col., 2010; Garcia y col., 2012 y 2013).

2.2. Antígenos para diagnóstico

Se pueden emplear 2 clases de Acs en las técnicas de diagnóstico:

2.2.1. Parásito completo: Tiene como ventaja que se utiliza una gran diversidad de Ags al mismo tiempo aumentando la sensibilidad. No obstante, ésta también es su desventaja, porque no se sabe ni se puede escoger cuáles Ags se emplean exactamente. Producirlo en un laboratorio requiere de instalaciones especiales y de personal especializado para su correcta y eficiente producción, como así también para disminuir al mínimo el riesgo de contaminación de los operarios (Durlach y col., 2008). Utilizarlo como componente de un kit diagnóstico requiere prepararlo de modo que pueda ser estandarizada su producción, almacenado y transportado sin alterar su composición (de manera de no modificar los Ags y epitopes expuestos); al igual que para eliminar su viabilidad celular, de modo que no pueda infectar a los usuarios.

2.2.2. Subunidades del parásito: típicamente son proteínas o polisacáridos, separados o combinados. Tienen la ventaja de que se conocen y controlan mejor los Ags a emplear. Como componentes de un kit diagnóstico, se simplifican las consideraciones para la distribución del mismo. Lo más común es emplear proteínas obtenidas por purificación de su fuente (el parásito) o generadas como proteínas recombinantes.

Con las herramientas de ingeniería genética disponibles hoy en día, es relativamente fácil obtener cualquier proteína en vez de purificarla del organismo de origen (Terpe, 2006). Además, comparando estas 2 opciones, las proteínas recombinantes ofrecen las siguientes ventajas:

- Permiten conocer la secuencia específica que se está utilizando, así como seleccionar y obtener sólo ciertas regiones de la misma en vez del Ag completo.

- El proceso es más sencillo de estandarizar y es más económico (Selseh y col., 2012a, Pietkiewicz y col., 2004; Hyszczynska-Sawicka y col., 2003; Jalallou y col., 2012).

- Su protocolo es más fácil de escalar para producir mayores cantidades del Ag. (Terpe, 2006; Babaie y col., 2011).

- Se tiene mayor control sobre los contaminantes del producto final (Lau y Fong, 2008).

- Permite modificar la proteína. Se puede introducir modificaciones en la secuencia. Así, se pueden incorporar secuencias que favorezcan ciertos procesos, por ejemplo: su purificación, su solubilidad, su sensibilidad al ataque de enzimas, su capacidad de tomar ciertos caminos metabólicos, entre otros (Sørensen y Mortensen, 2005). Inclusive se pueden combinar las secuencias útiles de varias proteínas en una sola secuencia polipeptídica. Aplicado a nuestro caso, se podrían combinar los epitopes de diferentes Ags.

2.3. Antígenos usados para diferenciar las fases de la infección

Si uno desea detectar específicamente la fase aguda de la infección, se deberían emplear Ags que sólo aparezcan en este estadio. Emplear el parásito completo como Ag resulta menos eficiente (Lu y col., 2006; Aubert y col., 2000; Beghetto y col., 2003; Béla y col., 2008). Por

ejemplo: Lu y Suzuki observaron desaparición de anticuerpos IgM e IgG contra el antígeno P35 (GRA8) en sueros de individuos en fase crónica de la infección, al mismo tiempo que las mismas muestras seguían presentando los mismos isotipos de Acs pero contra el parásito completo como Ag (Lu y col., 2006; Suzuki y col., 2000). Como el parásito se encuentra en forma de taquizoíto en la fase aguda, se supone que las proteínas que aparecen únicamente en el taquizoíto son específicas de esta fase.

Inicialmente se consideraron las proteínas MIC, ROP y GRA (Araújo y Ferreira, 2010). Si bien varios antígenos ROP y todos los GRA se liberan dentro de las células del hospedador, estos son liberados a circulación y expuestos al sistema inmune cuando las células se lisan (Jacobs y col., 1999). A su vez, también son útiles las proteínas SAG expresadas exclusivamente en los taquizoítos. Estos Ags de fase aguda han sido extensamente evaluados por diversos autores en forma aislada, pero no hay hasta la fecha un análisis amplio y profundo que permita integrar dichos resultados. Los trabajos mencionados han sido diseñados por distintos autores, en distintos tiempos, con diferentes metodologías y técnicas, por lo que difieren en muchos aspectos, dificultando su comparación. Para evaluarlas, se ensayaron sueros de individuos en la fase aguda de la infección por toxoplasmosis (SIA), sueros de individuos en la fase crónica de la infección por toxoplasmosis (SIC) y sueros de individuos no infectados con toxoplasmosis (SIN). Si bien los criterios por los que se definen las categorías de pacientes en los diferentes trabajos no son siempre los mismos, se pueden comparar los resultados considerando la clasificación final de los pacientes. La tabla 1 muestra un resumen de las proteínas evaluadas separadamente para diferenciar entre las fases de la infección, empleando sueros humanos. En la última columna de la tabla, se indica la referencia y "versión" de la proteína empleada por cada autor; es decir que cada autor empleó una secuencia distinta de una misma proteína, clonándola además bajo diferentes condiciones. Las técnicas utilizadas para estos ensayos fueron: ELISA indirecto, ensayo de avidéz, ELISA doble sandwich, ELISA de captura y wester blot. Sólo se incluyeron trabajos con proteínas recombinantes o purificadas a partir del parásito, empleando procedimientos que aseguraron cierto grado de pureza, como la utilización de Ac monoclonales, la ratificación de la pureza mediante espectroscopía de masa o similar. No se indican en la tabla trabajos que emplearon mezclas de Ags o proteínas quiméricas. Además, sólo se incluyeron aquellos trabajos cuyos resultados fueron cuantificados, es decir que se ensayaron las técnicas con varios sueros, permitiendo definir sensibilidad y especificidad (excepto cuando se realizaron ensayos de avidéz, que también se los indica).

Aclaraciones de la tabla 1: La quinta y sexta columna de la tabla muestran la sensibilidad y especificidad de las proteínas, diferenciando los sueros de fase aguda de los de fase crónica. Si estos valores no eran informados, se los

calculó a partir de los datos provistos en las publicaciones (en el punto 2.1.1. de la sección Materiales y Métodos se detalla las definiciones de sensibilidad y especificidad). La razón de esto, es que la manera de los autores de informar la eficiencia de los Ags fue diversa, complicando la comparación entre varios trabajos. Por lo tanto se homogeneizó la presentación de resultados, calculando la sensibilidad y especificidad. Una técnica que tenga 100% de sensibilidad significa que en el procedimiento todos los SIA dieron positivos. Si tiene 100% de especificidad, todos los SIC dieron negativos. Ocurre lo inverso en aquellos trabajos donde el nombre del autor está en verde (100% de sensibilidad significa que todos los SIC dieron positivos y 100% de especificidad que todos los SIA dieron negativos, detectando IgG). Cuando las citas bibliográficas tienen las letras verdes, es porque el autor encontró que el Ag tiene más reactividad con los SIC que con SIA, detectando IgG, en estos casos la proteína está descrita como propia de la fase crónica. Pero en ambas situaciones, mientras más cerca del 100% estén la sensibilidad y especificidad, mejor resultó la discriminación.

Cuando un autor desarrolló varios experimentos para una misma versión de la proteína, su renglón es el doble o triple del tamaño normal, en el caso de que haya realizado dos o tres experimentos diferentes, respectivamente; por ejemplo: "Araújo y Ferreira, 2010", "Aubert y col., 2000", "Santoro y col. 1985", entre otros. Si para una misma proteína el autor está repetido con la misma referencia en otro renglón, es porque el autor probó diferentes secuencias de la misma proteína en un mismo trabajo; por ejemplo: "Nigro y col., 2003".

Las casillas pintadas en amarillo, indican los ensayos de avidéz. Y las casillas que están en gris, marcan los valores de especificidad y sensibilidad cuya suma es superior a 175 %⁴.

En varios trabajos se dividen los SIA en diferentes subgrupos. Sólo se presentó los resultados de los SIA y SIC en su conjunto y no los de los subgrupos.

* En el trabajo original no se informan los datos necesarios para completar la información correspondiente a esa casilla.

Antígeno	Ac (isotipo)	Cant. de sueros		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Versión del Ag/Referencias
		SIA	SIC			
SAG1	IgG	25	125	88	4,8	Araújo y Ferreira, 2010
	IgM			88	92,8	
	IgA			92	97,6	
	IgG	142	105	73,2	24,8	Aubert y col., 2000
	IgM		*	10,6	*	
	IgG	12	43	*	*	Beghetto y col., 2003
	IgM	64	24	100	79,2	Cesbron y col., 1985
	IgM	*	*	*	*	Decoster y col., 1988
	IgA			100	100	
	IgM	9	*	*	*	Decoster y col.; 1992
	IgA			100	*	
	IgG	20	20	100	20	Kotresha y col., 2012
IgM	30	40	80	90	Jalallou y col., 2012	
IgG	12	22	8,3	86,4	Nigro y col., 2003	

⁴ Si la suma fuera 200 %, la técnica sería perfecta (100 % tanto de sensibilidad como de especificidad). Se observa la sumatoria y no los valores individuales debido a que se tuvo en cuenta que variando el valor umbral de corte empleado en la técnica, se puede aumentar la sensibilidad disminuyendo la especificidad, o al revés (Li y col., 2000b).

	IgG			0	100	Nigro y col., 2003
	IgG	2	4	*	*	
	IgG	102	71	72,3	91,5	Pfrepper y col., 2005
	IgM			7,4	100	
	IgA			2,9	100	
	IgG	117	82	99,1	9,8	Pietkiewicz y col., 2004
	IgM	47	40	38,3	100	Santoro y col., 1985
	IgM			100	97,5	
	IgG	70	74	13	93	Selseleh y col., 2012a
	IgM			5	95	
SAG2	IgG	30	30	93,5	3,3	Béla y col., 2008
	IgG1			86,7	33,3	
	IgG			60	70	
	IgG1			83,4	86,7	
	IgG			*	*	
	IgG			10	90	Béla y col., 2008
	IgG	33	66	93,9	4,5	Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005
	IgG	40	20	12,5	100	Lau y Fong, 2008
	IgM			12,5	100	
	IgG	10	10	80	100	Li y col., 2000a
	IgG	31	31	93,6	96,8	Parmley y col., 1992
	IgM	13	13	46,2	100	
	IgA			15,4	100	
	IgG			100	0	
	IgM	5	5	60	100	
	IgA			100	0	
IgG	7	5	71,4	60	Prince y col., 1990	
IgG			71,4	60	Prince y col., 1990	
MIC1	IgG	26	72	96,1	25	Holec y col., 2008
	IgG			100	47,3	Holec y col., 2008
	IgG			100	63,9	Holec y col., 2008
MIC3	IgG	20	97	100	100	Beghetto y col., 2003
ROP1	IgG	142	105	86,6	78,1	Aubert y col., 2000
	IgM		*	58,5	*	
	IgG	37	90	94,6	84,5	Holec-Gasior y col., 2009
	IgG	34	108	85	73,1	Holec-Gasior y col., 2010
	IgG	29	29	90	89,7	
	IgG	2	4	*	*	Pfrepper y col., 2005
	IgG	102	71	50,6	62	
IgM	92,6			95		
	IgA			32,3	100	
ROP2	IgG	142	105	65,5	51,4	Aubert y col., 2000
	IgM		*	12,7	*	
	IgG	67	*	85	*	Jacobs y col., 1999
	IgG	49	59	0	100	Liu y col., 2012
	IgM			100	100	
	IgG	39	107	89,7	1,9	Macre y col., 2009
	IgG			21,1	81,9	
IgG	42	35	97,6	17,2	Martin y col., 1998	

	IgM			54,8	100	
	IgA			69,1	82,8	
	IgG	12	22	83,3	45,5	Nigro y col., 2003
	IgG	34	64	91	13	Van Gelder, 1993
GRA1	IgG			76	8,8	Araújo y Ferreira, 2010
	IgM	25	125	52	80,8	
	IgA			84	90,4	
	IgG	32	46	65,6	78,26	Ferrandiz y col., 2004
	IgG	117	82	81,2	19,5	Pietkiewicz y col., 2004
GRA2	IgG	*	*	100	38,8	Ching y col., 2012
	IgG	42	63	97,6	43,5	Golkar y col., 2007
	IgG	37	90	100	77,5	Holec-Gasior y col., 2009
	IgG	23	44	82,6	25	Murray y col., 1993
GRA3	IgG	12	39	*	*	Beghetto y col., 2003
GRA4	IgG	12	22	58,3	81,8	Nigro y col., 2003
GRA6	IgG	55	51	98,2	100	Elyasi y col., 2010
	IgG	32	46	83	16	Ferrandiz y col., 2004
	IgG	24	34	87,5	94,1	Golkar y col., 2008
	IgM			91,7	2,9	
	IgG	33	66	93,9	39,4	Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005
GRA7	IgG			84	9,6	Araújo y Ferreira, 2010
	IgM	25	125	88	90,4	
	IgA			84	96,8	
	IgG	142	105	95,1	32,4	Aubert y col., 2000
	IgM		*	50,7	*	
	IgG	12	39	*	*	Beghetto y col., 2003
	IgG	77	277	94,8	20,2	Jacobs y col., 1999
	IgG	20	20	100	60	Kotresha y col., 2012
	IgG	10	10	80	90	Li y col., 2000a
	IgG	12	22	75	63,7	Nigro y col., 2003
	IgG	2	4	*	*	Pfrepper y col., 2005
	IgG			92,8	11,3	
	IgM	102	71	20,6	100	
	IgA			47,1	100	
	IgG	117	82	100	22	Pietkiewicz y col., 2004
IgG	70	74	100	89	Selseh y col., 2012b	
IgM			96	100		
GRA8	IgG	142	105	94,4	62,9	Aubert y col., 2000
	IgM		*	54,9	*	
	IgM	33	35	60,6	97,1	Babaie y col., 2011
	IgG	33	66	87,9	47	Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005
	IgG	10	10	60	90	Li y col., 2000a
	IgG	41	50	85,3	92	Li y col., 2000b
	IgG	50	50	*	*	Lu y col., 2006
	IgM			100	96	
	IgG	2	4	*	*	Pfrepper y col., 2005
	IgG			94	53,5	
IgM	102	71	64,7	100		
IgA			67,6	98,6		

	IgM	20	49	90	91,8	Suzuki y col., 2000
BSR4	IgG	20	20	100	100	Chen y col., 2012
MAG1	IgG	37	80	97,3	92,5	Holec y col., 2007
	IgG	2	4	*	*	Pfrepper y col., 2005
	IgG			51,8	38	
	IgM	102	71	11,8	100	
	IgA			8,8	100	
P25	IgG	10	10	80	100	Li y col., 2000a
P68	IgG	142	105	84,5	51,4	Aubert y col., 2000
	IgM		*	18,3	*	
SUB1	IgG	23	28	80	71	Hruzik y col., 2011
	IgM			17	99	
	IgA			32	80	
TgERP	IgG	163	176	63,2	82,4	Hill y col., 2011

Tabla 1: Antígenos evaluados por otros autores para diferenciar SIA de SIC.

Se han descubierto otras proteínas específicas del parásito, pero como no se las evaluaron para diferenciación de las fases de la infección, no se las incluyeron, por ejemplo: MIC4 (Lourenço y col., 2006), HSP30, HSP70 (Mohamed y col., 2003), BAG-5 (Silvia y col., 2002), entre otras.

2.4. Complicaciones para comparar los antígenos evaluados

Si bien es esperable encontrar pequeñas diferencias en los resultados para una misma proteína cuando se la ensaya con las mismas técnicas, un análisis detallado de la Tabla 1 permite observar diferencias significativas en la sensibilidad y especificidad de los Ags evaluados por los diferentes autores. Por ejemplo, notables son las diferencias observadas con la proteína SAG1 ensayada para IgG, entre Araújo, Nigro, Aubert y Pfrepper donde informan 88 y 4,8 %; 8,3 y 86,4 %; 73,2 y 24,8 % y 72,3 y 91,5 %, respectivamente (Araújo y Ferreira, 2010; Nigro y col., 2003; Aubert y col., 2000; Pfrepper y col., 2005). Similarmente ocurre con SAG2 evaluada para IgG, donde Béla, Li y Prince refieren 93,5 y 3,3 %; 80 y 100 % y 71,4 y 60 %, respectivamente (Béla y col., 2008; Li y col., 2000a; Prince y col., 1990). Igualmente, para GRA7, Araújo y Pfrepper refieren para IgA 84 y 96,8 % y 47,1 y 100 %, respectivamente (Araújo y Ferreira, 2010; Pfrepper y col., 2005).

Esos resultados disímiles llevan a discordancia para definir las proteínas como Ags de fase aguda o de fase crónica. Algunos autores reportan que los Ags presentan mayor reactividad con los SIC que con los SIA, contrariamente a lo informado por los otros: Pfrepper, Selseleh y Santoro con SAG1 (Pfrepper y col., 2005; Selseleh y col., 2012a; Santoro y col., 1985), Lau con SAG2 (Lau y Fong, 2008); Ferrandiz con GRA1 (Ferrandiz y col., 2004) y Selseleh con GRA7 (Selseleh y col., 2012b).

Desde el punto de vista del antígeno, se pueden diferenciar factores intrínsecos y extrínsecos que influyen en los resultados del análisis del desempeño de los mismos para uso en diagnóstico clínico. Los intrínsecos hacen referencia a las características propias del antígeno como ser, su secuencia aminoacídica, su plegamiento, su pureza, el sistema de expresión que se usa para expresarlo, mientras que los extrínsecos se ven influenciados por los aspectos metodológicos que se usan para evaluarlos como la caracterización de los sueros de los pacientes, las regiones geográficas en las cuales se obtuvieron los mismos o el criterio de cálculo de línea de corte. Se detallan a continuación la influencia de dichos factores en los estudios mencionados.

Diferencias Intrínsecas:

Diferencias en el modo de generación de la proteína. Las discrepancias en la capacidad de reportar tempranamente la toxoplasmosis o de discriminar efectivamente las fases de la infección está principalmente influenciada por la preparación de los Ags (Selseh y col., 2012a). Si bien la ingeniería genética facilita la producción de proteínas, esta metodología implica la selección de diferentes caminos que pueden originar diferencias en los resultados de diagnóstico con proteínas clonadas bajo el mismo nombre:

a) Selección de la secuencia: pocos autores clonan la secuencia completa de la proteína, normalmente se selecciona una secuencia interna menor. Diferentes regiones de una misma proteína contendrán diferentes epitopes, variando en la capacidad del Ag para unir Acs (Kotresha y col., 2012). Además, al no expresarse la proteína completa, la estructura terciaria de la secuencia seleccionada puede diferir de la estructura espacial de la misma secuencia pero incluida en la proteína natural completa. Esto puede alterar epitopes estructurales, variando la capacidad del Ag para unir Acs.

b) Vector de clonado: para poder expresar el gen, se lo debe introducir en un vector plasmídico. Éste normalmente agrega secuencias foráneas al Ag original que se expresará. Estas secuencias adicionales, a veces proteínas completas, influyen en propiedades del Ag, como su capacidad de solubilizarse o de plegarse (Terpe, 2006; Sørensen y Mortensen, 2005). Un plegado distinto al de la proteína nativa podrá alterar epitopes estructurales, lo cual también variará la capacidad del Ag para unir Acs (Selseh y col., 2012a).

c) Organismo de expresión: además de introducir el gen de interés en un vector, esta construcción se la debe insertar en un organismo vivo. Diferentes organismos tendrán ambientes intracelulares distintos que influenciarán de diversas maneras la expresión y plegado de la proteína. También, algunos organismos pueden inducir ciertas modificaciones en las secuencias generando alteraciones estructurales, por ejemplo, favoreciendo la generación de puentes disulfuros, originando estructuras cuaternarias alternativas, uniendo covalentemente

carbohidratos a la proteína u otros (Terpe, 2006; Sørensen y Mortensen, 2005; Lau y Fong, 2008; Huang y col., 2002). Estas modificaciones conformacionales pueden generar alteraciones en los epitopes.

d) Metodología de purificación: Diferentes procedimientos influirán de distintas maneras en la conservación de la estructura espacial de la proteína adquirida durante la expresión y plegado de la misma (Aubert y col., 2000; Sørensen y Mortensen, 2005; Selseleh y col., 2012a; Kotresha y col., 2012), lo cual también afectará los epitopes estructurales.

Diferencias Extrínsecas:

a) Diferente procedencia de los sueros: Como se indicó en el punto 1.2.1. en esta sección, en diferentes regiones geográficas hay diferentes cepas de *T. gondii*. Diferentes cepas presentan polimorfismo en sus proteínas, generando variaciones en la respuesta inmune de los individuos infectados. Esto generaría diferencias en el diagnóstico empleando un mismo Ag en diferentes países (Kotresha y Noordin, 2010; Kotresha y col., 2012). Otro fenómeno asociado a la variación entre las cepas y al polimorfismo de las proteínas fue el observado por Kato y col., quienes comprobaron que diferentes cepas de *T. gondii* generan Acs en ratón contra diferentes regiones de un mismo Ag (Kato y col., 2007).

b) Número insuficiente de sueros: Mientras mayor sea el tamaño de la muestra, más probable es que los estimadores puntuales que la describen se acerquen al valor poblacional. Mientras más pequeña sea la muestra, aumenta el riesgo de que los estimadores sean sesgados. Una muestra se considera de tamaño grande estadísticamente, cuando su número es 30 o más. No obstante, esto no sucede particularmente con los SIA de varios trabajos, por ejemplo, Araújo y Ferreira trabajaron con 25 sueros; Li y col. emplearon 10 sueros, Suzuki y col. utilizaron 20 sueros, entre otros (Araújo y Ferreira, 2010; Li y col., 2000a; Suzuki y col., 2000). Conscientes de esta limitación, en algunos trabajos, los mismos autores recomiendan repetir sus estudios pero con una población mayor (Jalallou y col., 2012). Esta situación se comprende considerando que no es sencillo recolectar SIA de los centros de diagnóstico, no sólo porque ello requiere desarrollar un convenio de trabajo conjunto con el centro de salud, sino porque además, generalmente, los sueros de los pacientes no se almacenan más del tiempo requerido para el diagnóstico. Por ello, el bajo número de SIA no permite comparar los mismos parámetros respecto de otros trabajos de una misma región geográfica.

c) Clasificación de los sueros incierta. Si bien se puede tener certeza de la mayoría de los sueros clasificados como SIC (sueros IgG positivos e IgM negativos) o como SIN (sueros IgG negativos e IgM negativos) difícilmente se tiene certeza sobre los SIA, excepto en los casos de seroconversión o presencia de síntomas clínicos (ver punto 1.10. en esta sección). Los criterios

para definir los sueros SIA varían entre los diferentes autores, generando diferencias entre los resultados de los ensayos con los mismos Ags (Li y col., 2000a).

d) Definición de la línea de corte de los ensayos: Cada autor define en sus ensayos un valor umbral para las señales ofrecidas por cada técnica. Cuando una muestra/suero tiene como señal un valor que sobrepasa este valor umbral correspondiente a la línea de corte, se considera que la muestra da una reacción positiva. En caso contrario, se considera reacción negativa. Generalmente, si la proteína es de fase aguda, el suero que presente reacción positiva se considerará SIA y si da una reacción negativa se lo considerará SIC. Si bien se homogeneizó la presentación de los resultados, cuantos sueros dan reacción positiva y cuantos dan reacción negativa está definido en cada trabajo y depende del valor umbral definido por el autor y cambiar la línea de corte modifica los resultados. Hay otros procedimientos para comparar técnicas, independientes de la decisión del autor y que facilitan la comparación entre técnicas de reconocimiento de poblaciones, por ejemplo, la construcción de curvas ROC (Metz, 1978). Sin embargo, para aplicar este criterio se necesitan todos los valores de densidad óptica obtenidos por los autores para cada suero.

2.5. ¿Qué antígeno emplear?

En busca de una técnica para diferenciar las fases de la infección de toxoplasmosis de mejor eficiencia que las actuales, se requiere encontrar secuencias proteicas de Ags de alta sensibilidad y especificidad. Se han reportado muchas secuencias que podrían ser útiles, pero es difícil clonar y purificar las proteínas en exactamente las mismas condiciones, y aunque se pudiera, todavía cabría la duda de cómo funcionarían con los sueros regionales.

Considerando que no se pueden evaluar todos los Ags descubiertos, se deberían seleccionar algunos, los que mejor discriminen entre las fases de la infección. De las 19 proteínas que se han ensayado, en 11 hay trabajos que presentan sensibilidades y especificidades cercanas a 90 %: SAG1, SAG2, ROP1, ROP2, GRA2, GRA6, GRA7, GRA8, BSR4, MAG1 y P25 (tabla 1).

P25 y BSR4 tienen pocas referencias sobre sus resultados, un solo autor ha trabajado con cada una de ellas (Li y col., 2000a; Chen y col., 2012). Solo dos autores trabajaron con MAG1; Pfrepper y col. fueron los que más la ensayaron y sus resultados no fueron demasiado satisfactorios, en especial con la detección de Acs tipo IgG, que difieren bastante de los obtenidos por Holec y col. (tabla 1; Pfrepper y col., 2005; Holec y col., 2007). Tanto GRA2 como ROP2 fueron ensayadas por varios autores (Ching y col., 2012; Golkar y col., 2007; Holec-Gasior y col., 2009; Murray y col., 1993; Aubert y col., 2000; Jacobs y col., 1999; Liu y col., 2012; Macre y col., 2009; Martin y col., 1998; Nigro y col., 2003; Van Gelder, 1993), pero

sólo uno de ellos obtuvo buenos resultados con cada una. Por lo tanto, los Ags prometedores se reducen a: SAG1 (P30), SAG2 (P22), ROP1, GRA6, GRA7 y GRA8 (P35). Todas estas proteínas fueron evaluadas en diferentes trabajos. Desgraciadamente, como ya se ha mencionado hay bastante disparidad en sus resultados. De todas las razones explicitadas anteriormente, una de las más influyentes e interesantes es la selección de la secuencia génica. Este aspecto fue analizado también por 2 autores en P22 (Béla y col., 2008; Prince y col., 1990). En P30 fue considerado por Nigro y col. (Nigro y col., 2003). Además, P30 fue el Ag más estudiado de todos. Finalmente, P35 es el Ag que presenta menos disparidad en los resultados y sus valores de sensibilidad y especificidad encontrados nunca fueron menores de 53,5% (ver tabla 1). De lo expuesto surge que P22, P30 y P35 son los candidatos más interesantes a estudiar.

2.5.1. Antígeno P22

Es una proteína de membrana que se encuentra específicamente sobre la superficie del taquizoíto. Se mantiene unida por anclaje al GPI de la membrana del parásito (Prince y col., 1990). Además, es uno de los Ags que el sistema inmune del hospedador reconoce específicamente (Huang y col., 2002; Parmley y col., 1992; Prince y col., 1990).

En la figura 8 se muestran las regiones nucleotídicas que han sido expresadas para evaluar la proteína y los autores responsables de cada estudio.

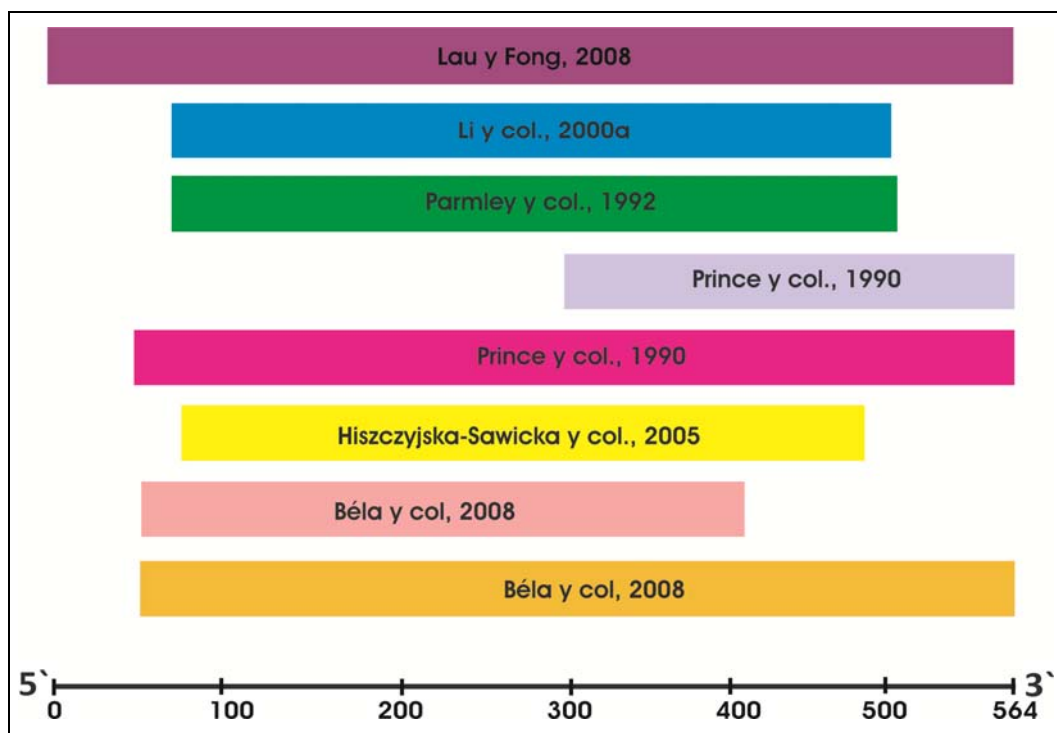


Figura 8: Esquema de las diferentes regiones nucleotídicas de P22, que fueron expresadas y evaluadas por distintos autores. Abajo se encuentra una escala en pares de base (pb) de la secuencia de número de acceso FJ825705 en el NCBI, "ARN mensajero del antígeno de superficie P22 (SAG2) de *Toxoplasma gondii*, cepa RH, secuencia codificante completa".

Este Ag ha sido evaluado mayoritariamente contra anticuerpos IgG. De entre todos los autores, los que obtuvieron los resultados más satisfactorios fueron Li y Parmley (Li y col., 2000a; Parmley y col., 1992), con sensibilidades de 80 y 93,6 % y especificidades de 100 y 96,8 % (tabla 1), mediante ELISA indirecto. Ambos clonaron prácticamente la misma secuencia de P22 (figura 8). Sólo en dos trabajos se reporta la detección de anticuerpos IgM y en uno de ellos la detección de IgA (Lau y Fong, 2008; Parmley y col., 1992). Si bien todas las especificidades obtenidas fueron del 100 %, las sensibilidades fueron menores de 60 % (tabla 1).

Únicamente Béla y col. ensayaron avidéz de anticuerpos. Analizaron isotipos IgG totales e IgG1 contra dos regiones de extensiones diferentes de P22. Obtuvieron los mejores resultados con la región más corta y evaluando IgG1, sensibilidad de 83,4 % y especificidad de 86,7 % (Béla y col., 2008; tabla1).

Todos los autores emplearon la técnica de ELISA indirecto (Béla y col., 2008; Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005; Lau y Fong, 2008; Li y col., 2000a; Parmley y col., 1992), excepto Prince y col. que emplearon solamente western blot (Prince y col., 1992).

Si bien P22 está considerada como un Ag de fase aguda, Lau y Fong describieron que P22 tiene mayor reactividad contra SIC que contra SIA (Lau y Fong, 2008).

2.5.2. Antígeno P30

Es una proteína dimérica que se encuentra en abundancia sobre la superficie del taquizoito intracelular y extracelular (Selseleh y col., 2012a; Araújo y Ferreira, 2010). P30 puede constituir hasta el 5% del total de las proteínas de membrana del parásito (Kato y col., 2007). Se mantiene unida por anclaje al GPI de la membrana del protozoo y posee la función de adhesión del mismo con las células del hospedador. Se cree que une específicamente proteoglicanos sulfato. Su estructura nativa fue resuelta por difracción de rayos X (He y col., 2002) y se muestra en la figura 9. Éste es uno de los primeros y principales Ags reconocidos por el sistema inmune del hospedador (Araújo y Ferreira, 2010; Jalallou y col., 2012;

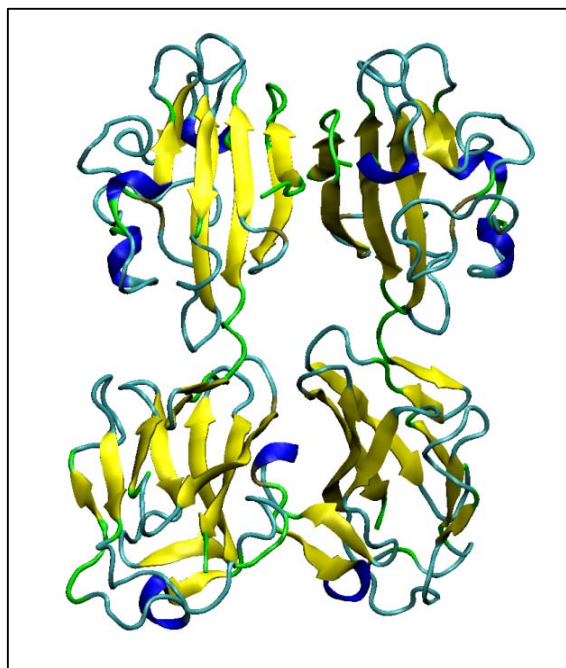


Figura 9: Estructura cuaternaria de P30 resuelta por difracción de rayos X. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

Pietkiewicz y col., 2004). Por otro lado, el gen de esta proteína está altamente conservado entre las diferentes cepas de *T. gondii* (Burg y col., 1988).

En la figura 10 se muestran las regiones de la secuencia nucleotídica del gen de P30 que han sido expresadas para evaluarlas como Ag, y sus autores responsables.

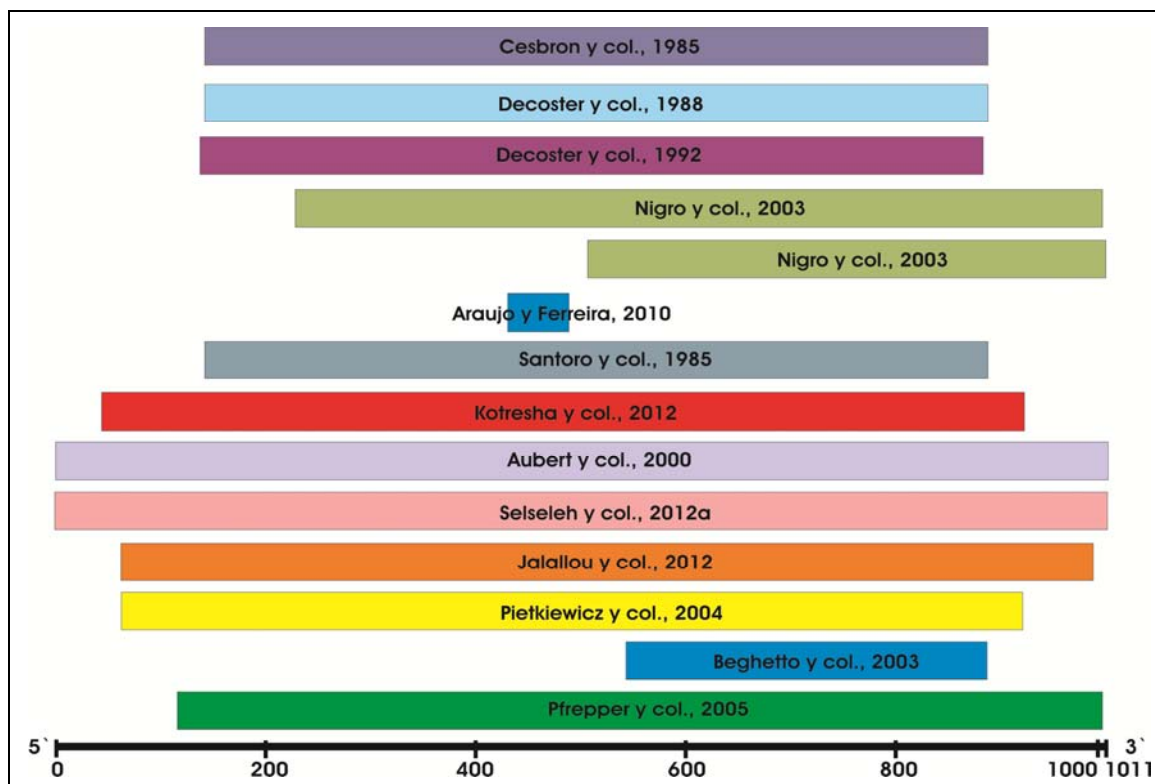


Figura 10: Esquema de las diferentes regiones nucleotídicas de P30 que fueron expresadas y evaluadas por distintos autores. Abajo se encuentra una escala en pb de la secuencia de número de acceso HM776940 en el NCBI, "ARN mensajero del antígeno de superficie mayor de la cepa de *Toxoplasma gondii* RH, secuencia codificante completa".

Este Ag ha sido el más evaluado para diferenciar las fases de la infección. Se ha ensayado contra anticuerpos IgG, IgA e IgM y se puede observar que la sensibilidad y especificidad superan el 90 % en muchos de los estudios contra los isotipos IgA e IgM (tabla 1).

Estos ensayos se han realizado mediante ELISA indirecto (Araújo y Ferreira, 2010; Aubert y col., 2000; Jalallou y col., 2012; Nigro y col., 2003; Pietkiewicz y col., 2004; Santoro y col. 1985), ensayo de avidéz (Beghetto y col., 2003; Pfrepper y col., 2005), ELISA doble sandwich (Cesbron y col., 1985; Decoster y col., 1988 y 1992), westernblot (Kotresha y col., 2012) y ELISA de inmunocaptura (Santoro y col., 1985).

Varios autores observaron que P30 tiene mayor reactividad con SIA que con SIC (Araújo y Ferreira, 2010; Jalallou y col., 2012; Beghetto y col., 2003; Cesbron y col., 1985; Decoster y col., 1988 y 1992), excepto Pfrepper, Santoro y Selseleh, quienes describen resultados contrarios, es decir, que P30 muestra mayor reactividad con SIC que con SIA (Pfrepper y col.,

2005; Santoro y col., 1985; Selseleh y col., 2012a). Esta disparidad en las conclusiones bibliográficas empleando P30 también es observada por Jalallou y col. (Jalallou y col., 2012).

Solamente Beghetto y Pfrepper evaluaron P30 por ensayo de avidéz. Observaron su desarrollo en varios sueros tomados a lo largo de la infección en algunos pacientes. Si bien observaron el desarrollo de avidéz en los anticuerpos IgG, no calcularon sensibilidad ni especificidad debido al escaso número de pacientes que evaluaron (Beghetto y col., 2003; Pfrepper y col., 2005).

2.5.3. Antígeno P35

P35 es una glicoproteína de 35 KDa generada en los gránulos densos de *T. gondii* y que se introduce en la membrana de la vacuola parasitófora, cuando el microorganismo se encuentra dentro de la célula hospedadora (Carruthers y col., 2006).

P35 fue evaluada para los 3 isotipos de Acs, obteniendo resultados prometedores contra IgG e IgM (Li y col., 2000b; Suzuki y col., 2000; Lu y col., 2006).

Este Ag se lo ha ensayado mediante las técnicas ELISA indirecto (Aubert y col., 2000; Babaie y col., 2011; Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005; Li y col., 2000a y 2000b), ELISA doble sandwich (Lu y col., 2006; Suzuki y col., 2000), ensayo de avidéz y westernblot (Pfrepper y col., 2005).

En la figura 11 se muestran las regiones de la secuencia nucleotídica del gen de P35 que han sido expresadas para evaluarlas como Ag, y los autores responsables.

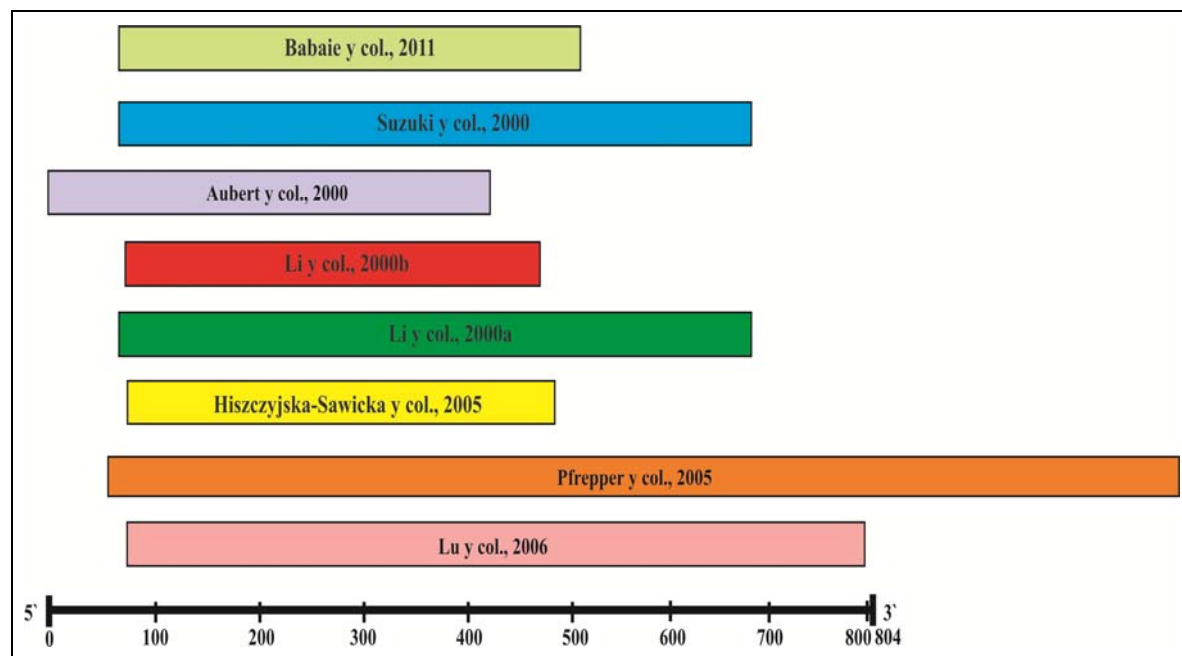


Figura 11: Esquema de las diferentes regiones de P35 que fueron expresadas y evaluadas por diferentes autores. Abajo se encuentra una escala en pb reenumerada, de la secuencia +139 a +943 de número de acceso AF150729 en el NCBI, "ARN mensajero de la proteína de gránulo denso GRA8 de *Toxoplasma gondii*, secuencia codificante completa".

Cabe mencionar el trabajo de Pfrepper y col., quienes clonaron y expresaron una secuencia de P35 que posee una región carboxi terminal repetida (región sobresaliente en la figura 11) de 333 pares de bases (pb). Dichos autores fueron los únicos que analizaron la avidéz en los anticuerpos IgG contra P35, pero no observaron desarrollo diferenciado entre SIA y SIC (desgraciadamente no presentaron datos cuantitativos). También, fueron los únicos autores que evaluaron la detección de IgA con este antígeno, pero tampoco obtuvieron resultados satisfactorios, al igual que detectando anticuerpos IgG e IgM (Pfrepper y col., 2005).

Como se exployó anteriormente, la variedad de resultados empleando un mismo Ag es muy grande. Ellos se ven influidos por las diferentes condiciones en la obtención de la proteína, principalmente la región génica seleccionada. Por lo tanto, en un Ag prometedor para diferenciar fases de la infección, es muy importante evaluar diferentes secuencias para encontrar la mejor para el diagnóstico (Kotresha y col., 2012). Paralelamente, es importante analizar las otras condiciones de obtención de antígeno, y finalmente todos estos parámetros deberían ser ensayados con sueros de individuos pertenecientes a la población sobre la que se emplearan los futuros nuevos tests diagnósticos.

3. Bioinformática

La bioinformática en las ciencias asociada a "trabajos de campo", se puede llevar a cabo antes o después de los ensayos. El desarrollo previo permite planificar los experimentos a desarrollar, ya sea mediante predicciones o análisis *in silico* que permitan escoger las pruebas o variables a ensayar (Parmley y col., 1992; Kotresha y col., 2012). Pero cuando la bioinformática es utilizada como herramienta después de los ensayos experimentales, permite analizarlos e inferir hipótesis, como por ejemplo, mecanismos que suceden a nivel molecular (Kato y col., 2007; Valiente Gabioud y col.; 2011). En esta instancia, dichas herramientas permiten elaborar conclusiones que dirijan los diseños de futuros experimentos y/o predigan fenómenos biológicos.

3.1. Bioinformática en la selección de antígenos

Como se mencionó anteriormente, la selección de la secuencia proteica es el factor más importante dentro de los referidos al antígeno. Debido principalmente a que según que regiones se escojan, el antígeno preparado contendrá o no epitopes inmunodominantes. Para esto, la bioinformática puede contribuir directa e indirectamente:

Contribución directa: hay diversos programas que permiten predecir epitopes lineales y conformacionales (Jens y col., 2012; Ponomarenko y col., 2008; Chang y col., 2006). En el diagnóstico de toxoplasmosis, en diversos trabajos, ya se han empleado estas herramientas (Maksimov y col., 2012)

Contribución indirecta: Mediante el análisis de las secuencias o estructuras del Ag se puede obtener amplia información sobre la proteína en general y sobre zonas específicas de la misma (Punta y col., 2012; Letunic y col., 2012; Hunter y col., 2009). Buena parte de esta información puede ser empleada para inferir sobre la antigenicidad de las diferentes regiones. Un ejemplo es la obtención de la estructura molecular del Ag; que se puede conseguir de bases de datos de acceso libre desde internet (Parasuraman, 2012), o construyendo un modelo conformacional del antígeno cuando su estructura terciaria es desconocida (Valiente Gabioud y col.; 2011), para lo cual se necesitan diversos programas. Luego, analizando que regiones se encuentran sobre la superficie y cuáles no, se puede definir que secuencias están disponibles para unir Acs. Por otro lado, la predicción de epitopes estructurales también requiere, como información de entrada, las estructuras tridimensionales de las proteínas (Jens y col., 2012; Sweredoski y Baldi, 2008; Ansari y Raghava, 2010). Al mismo tiempo, una secuencia que sea antigénica pero que se encuentre repetida en proteínas de otros parásitos, ofrecerá reactividad

cruzada en los ensayos de diagnóstico; información que se obtiene mediante programas que comparan la secuencia de interés con las provistas en bases de datos (Yu y Zhang, 2013).

A continuación se profundizará sobre todas estas herramientas.

3.2. Bases de datos

Un gran número de sitios de internet ofrecen acceso a bases de datos ampliamente utilizados en biología. Normalmente, estos sitios ofrecen programas para buscar datos específicos dentro de estas bases. Además cuando se obtienen los resultados, también brindan información relacionada, muchas veces proveniente de otras bases de datos que fácilmente se pueden consultar. Mediante estas herramientas se puede, por ejemplo, conocer exactamente secuencias de ADN o proteínas, que posibilita definir parámetros que permitan purificar el gen de un Ag específico, comparar si una secuencia obtenida al azar es idéntica a la obtenida por otros investigadores, y comparar secuencias de Ags entre diferentes parásitos, entre otros. Cabe mencionar dos de ellas.

NCBI (National Center for Biotechnology Information): el propio sitio se define como ..."Centro nacional para información biotecnológica de avances en ciencias y salud, que provee acceso a información genómica y biomédica"... Es una de las principales bases internacionales de secuencias génicas y proteicas. Es una importante fuente de información de biología molecular, ofreciendo todas las referencias bibliográficas concernientes a los datos que provee y actualizándose constantemente. Cuando algún investigador referencia una secuencia, lo hace normalmente mediante un número de acceso a esta base de información. Además ofrece programas para la manipulación de sus secuencias u otros datos (Woodsmall y Benson, 1993; Yu y Zhang, 2013).

PDB (Protein Data Bank - Banco de Datos de Proteínas): es una base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleídos. Sus conformaciones fueron obtenidas principalmente mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. También ofrece herramientas para abrir y trabajar sus archivos. Continuamente se están subiendo estructuras de nuevas proteínas. Si la conformación molecular de un antígeno fue resuelta experimentalmente, se encontrará en esta base de datos. Además también posee las conformaciones definidas de complejos de interacción antígeno-anticuerpo, que es el mejor método para definir con precisión epitopes estructurales (Parasuraman, 2012).

3.3. Programas de búsqueda de dominios proteicos

Un dominio proteico es una secuencia que tiene ciertas características definidas por las propiedades y/u orden de los AA de la región en estudio. De esta manera un dominio puede estar

repetido en varias proteínas. Se puede hablar de dominios de estructura primaria como de dominios de estructura tridimensional o terciaria. Los dominios pueden tener diferentes características: ser sitios activos de enzimas, ser regiones tendientes a reaccionar químicamente, o pueden definir la estructura tridimensional de la proteína, entre otros. A su vez los dominios se pueden clasificar en grupos. (Punta y col., 2012; Letunic y col., 2012; Christian y col., 2013).

Los dominios ofrecen información sobre las secuencias. Y a partir de esta información se puede inferir si una secuencia debería ser o no incluida en el antígeno a ser expresado. Por ejemplo, una región transmembrana no puede estar expuesta a la interacción de Acs, una región péptido señal que normalmente es escindida tampoco debería tener epitopes importantes, ciertas regiones hidrofóbicas al retirarlas de la proteína pueden facilitar su solubilización, entre otros. Además, si se requiere construir el modelo tridimensional de una proteína, la información provista por los dominios puede ser muy útil para la construcción de la estructura.

Vía internet hay sitios que ofrecen buscadores de dominios. Se diferencian por la manera de encontrar y clasificar los dominios en las proteínas. Cada uno emplea algoritmos diferentes. A continuación se describirán brevemente algunos:

Pfam y SMART son programas que utilizan el modelo estadístico Cadenas Ocultas de Markov, para construir perfiles de secuencias a partir de los cuales las clasifican. Estos dos programas se diferencian entre sí principalmente en la manera de ordenar los dominios (Punta y col., 2012; Letunic y col., 2012).

El programa FPScan emplea lo que denomina “huellas”, que es un conjunto de motivos separados dentro de una secuencia, donde cada motivo es una secuencia con alto porcentaje de identidad con las de otras proteínas. Todas las secuencias similares pertenecen al mismo motivo. (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.htm91>).

Algunos programas buscan dominios empleando algoritmos y bases de datos combinadas, por ejemplo InterProScan (Hunter y col., 2009).

También cabe mencionar al programa PSIPred que ofrece varias herramientas para el análisis de estructuras primarias, como predicción de sus estructuras secundarias o topologías celulares (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

3.4. Modelado molecular

Como se mencionó en el punto 3.1. de esta sección, los programas de predicción de epitopes estructurales requieren proveerles la estructura tridimensional de la proteína. Además, poseer la conformación de la proteína permite responder importantes cuestiones estructurales sobre las regiones seleccionadas para ser expresadas: ¿Están en zonas expuestas sobre la

superficie de la proteína *in vivo*? ¿Los epitopes lineales predichos se encuentran accesibles a los Acs? ¿Tienen estructura terciaria flexible o rígida?

Cuando se precisa la estructura de alguna proteína, lo primero que debe fijarse es si se encuentra en el PDB. En caso contrario, se debe modelar la estructura tridimensional, proceso denominado "modelado molecular".

3.4.1. Etapas del modelado molecular:

El proceso de modelado molecular de proteínas es complejo y requiere de una serie de pasos, empleando diferentes programas:

1) Reconocimiento del molde: se requiere como mínimo una proteína patrón cuya estructura tridimensional se encuentre resuelta experimentalmente. La manera en que se encuentre definirá si haremos un modelado por homología o mediante "fold-recognition". En el primer caso es cuando empleamos proteínas patrones cuyos porcentajes de identidad de secuencia con la proteína a modelar es igual o superior a 25 % (Venselaar y col, 2010). Se emplean programas de alineamientos de secuencias sobre bases de datos como Swiss-Model Workspace-Template Identification (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_targetidentification1), BLAST (Altschul y col., 1990), u otros. Cuando no se encuentra ninguna estructura patrón con un porcentaje igual o mayor a 25 %, ya no se observa la identidad de secuencia y se buscan estructuras que, aplicadas a la secuencia en estudio, tengan la menor energía conformacional de interacción. Luego, estas estructuras se emplean como patrón. Este procedimiento se denomina fold-recognition (Yang y col., 2011).

2) Ajuste del alineamiento: se escogen las proteínas moldes a usar y su combinación para realizar inicialmente varios modelos. Se hacen ajustes de los alineamientos manualmente o empleando programas de algoritmos de alineamientos más precisos como el Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970) o el Smith-Waterman (Smith y Waterman, 1981).

3) Generación de la estructura: Se arma la nueva estructura a partir de las estructuras moldes seleccionadas. El nuevo modelo deberá satisfacer requerimientos energéticos y estructurales definidos por las estructuras patrón. Este procedimiento se puede realizar mediante el programa Modeller (Eswar y col., 2006). Se tendrán diferentes modelos derivados de diferentes alineamientos. Entonces se debe escoger el mejor. Hay varios programas que permiten evaluar las calidades de los modelos: ANOLEA (Melo y Feytmans, 1997), Verify3D (Lüthy y col., 1992), What_check (Hooft y col., 1996), ProSA (Wiederstein y Sippl, 2007), entre otros. Luego se puede volver a ajustar el alineamiento del modelo que mejores resultados arrojó y observar si puede mejorarse la estructura aún más (Venselaar y col., 2010).

4) Modelado de los loops: La generación de la estructura del paso anterior construye buenas regiones de estructuras α -hélice y hoja plegada β . Pero los loops deben ser refinados

(Venselaar y col., 2010). Diferentes programas pueden realizar este paso, Modeller (Eswar y col., 2006), LOBO (Tosatto y col., 2002) u otros.

5) Refinado del modelo: Una vez construidas las α -hélice, hoja plegada β y los loops, se debe ajustar con precisión la conformación de la cadena de los átomos de carbonos α , la red de los puentes hidrógenos y las conformaciones de los grupos R de los AAs. Este refinado se puede realizar mediante procesos extendidos de dinámica molecular (Krieger y col., 2004) o Monte Carlo (Misura y col., 2006), o mediante una simple minimización de energía. El problema de los primeros dos mencionados es que la estructura puede modificarse bastante, alejándose de la real. La minimización de energía es sencilla y más segura. Se calcula la energía de interacción de los átomos y se los mueve de a poco, siempre minimizándola (Venselaar y col., 2010).

6) Validación del modelo: A lo largo de la construcción del modelo se debe "vigilarlo" mediante los programas de evaluación antes mencionados y cuando en un paso obtenemos un modelo peor que antes, se debe repetir ese paso reajustando los parámetros. Para la validación final se construye un mapa de Ramachandran, con el cual se constata los ángulos diedros de los AAs. Si demasiados AAs poseen ángulos poco frecuentes, el modelo se descartará (Ramachandran y col., 1963).

Hay programas de acceso vía internet de modelado automático, por ejemplo, I-TASSER (Zhang, 2008), ROBETTA (Leaver-Fay y col., 2011), RaptorX (Peng y Jinbo, 2011), Sparks X (Yang y col., 2011), entre otros. Se carga la secuencia de AAs y el programa predice la estructura. Suelen ofrecer algunas opciones para que el usuario pueda dirigir un poco el modelado, por ejemplo, indicar que estructura patrón emplear. Se pueden tomar los resultados de estos programas sin modificar, o se los puede introducir en el paso 3) del procedimiento descrito.

La visualización de las estructuras se puede realizar mediante programas como Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey y col., 1996), Swiss-PDB Viewer (Guex y Peitsch, 1997), UCSF Chimera (Pettersen y col., 2004), u otros. Programas que además ofrecen herramientas para trabajar sobre la conformación, como calcular minimización de energías, parámetros estructurales, o realizar ajustes manuales.

Es importante contar con toda la información accesible sobre la proteína en estudio, como la que se obtiene al buscar dominios en la misma, ya que todos estos datos guiarán las decisiones que se tomen durante el modelado.

¿Cual es la precisión de estas predicciones? Depende principalmente del molde disponible. Cuanto mayor sea el porcentaje de identidad de secuencia con nuestra proteína de estructura incógnita, mayor será la precisión. Una identidad de secuencia del 50 % puede ofrecer una precisión en el plegado del modelo de más de 90 %. Inclusive una identidad de secuencia del

30 % puede alcanzar una precisión de 80 % (Eswar y col., 2006). De tal modo, cuando se realiza fold-recognition es probable que se predigan exitosamente las estructuras secundarias que tiene la proteína, su cantidad y posición aproximada, permitiendo responder preguntas como las planteadas inicialmente y complementar resultados experimentales (Venselaar y col., 2010; Sali y Blundell, 1993).

3.5. Predicciones de epitopes

El mapeo de epitopes experimental de una proteína no es una tarea sencilla ni rápida (Sobolev y col., 2005; Tomar y De, 2010), por lo cual se han desarrollado herramientas *in silico* para detectar rápidamente las regiones antigénicas de las proteínas (Eric y col., 2006; Parker y col., 1986; Saha y Raghava, 2004 y 2006; Davydov y Tonevitsky, 2009).

La predicción de epitopes previo al trabajo experimental permite conocer las principales regiones antigénicas de una proteína, para luego obtenerlas aisladas mediante ingeniería genética (ver punto 2.2.2. de esta sección). Después estos segmentos pueden utilizarse, por ejemplo, para desarrollar ensayos de diagnóstico clínico. Por otro lado, la predicción de epitopes posterior al desarrollo experimental permite complementar y explicar los resultados en los que se observen diferentes reactividades sobre distintas zonas del Ag, y estos datos podrían dirigir futuros ensayos.

Existen dos clases de programas: programas predictores de epitopes lineales y programas predictores de epitopes estructurales.

3.5.1. Programas de predicción de epitopes lineales

Los programas de predicción de epitopes lineales contra anticuerpos emplean solamente la información de la estructura primaria de la proteína.

Se han observado las propiedades características que debe tener un AA para pertenecer a un epitope y se construyeron escalas en las que a cada AA se le asigna un valor numérico para definir un grado de la propiedad en cuestión (flexibilidad, exposición a la superficie, polaridad u otras) con respecto a los demás AAs. A estos patrones se los llamó escalas de propensión y a partir de ellas se desarrollaron la mayoría de los algoritmos de predicciones de epitopes lineales (Kolaskar y Tongaonkar, 1990; Emini y col., 1985; Janin y col., 1978; Pellequer y col., 1993; Parker y col., 1986; Karplus y Schulz, 1985; Ponnuswamy y col., 1980). Posteriormente, con la masificación de las computadoras se desarrollaron algoritmos más complejos, pero la mayoría empleando aun escalas de propensión (Saha y Raghava, 2004; Jens y col., 2006).

Actualmente, existe una amplia variedad de programas predictores de epitopes lineales de Acs que se pueden agrupar según su similitud: BcePred (Saha y Raghava, 2004), Antigenic

(Kolaskar y Tongaonkar, 1990) y LEPDs (Chang y col., 2006) emplean simples combinaciones de las mismas escalas de propensión. AAPPred (Davydov y Tonevitsky, 2009), BCpreds (Chen y col., 2007), FBCpred (El-Manzalawy y col., 2008), LEPs (Wang y col., 2011) y COBEpro (Sweredoski y Baldi, 2009) usan métodos sustentados por vectores empleando también escalas de propensión junto con información de pares de AA antigénicos. Otros programas, como el ABCpred y el Bepipred, emplean redes neuronales (Saha y Raghava, 2006) o Cadenas Ocultas de Markov (Jens y col., 2006), respectivamente.

Algunos de los programas más utilizados son:

AAPPred (Davydov y Tonevitsky, 2009): Es un programa que halla la antigenicidad de los AAs individuales evaluando la frecuencia con que aparecen pares de AAs, junto con las escalas de propensión de hidrofobicidad (Parker y col., 1986), flexibilidad (Karplus y Schulz, 1985), accesibilidad en la proteína (Emini y col., 1985), ubicación en “turn” (Pellequer y col., 1993), antigenicidad (Kolaskar y Tongaonkar, 1990) y polaridad (Ponnuswamy y col., 1980). Emplea métodos sustentados por vectores. Permite hacer el análisis mediante SVM1 (análisis mediante pares de AAs junto a escalas de propensión) o SVM2 (análisis mediante pares de AAs solamente).

ABCpred (Saha y Raghava, 2006): Con este programa es posible determinar epitopes de linfocitos B de un largo predefinido de 10, 12, 14, 16 o 20 AAs. El análisis lo realiza un sistema de redes neuronales que fue entrenado con una base de datos de epitopes conocidos.

BCEpred (Saha y Raghava, 2004): Este programa emplea metodologías desarrolladas por otros autores para asignar valores de antigenicidad a cada AA individualmente a partir de las escalas de propensión de hidrofobicidad (Parker y col., 1986), flexibilidad (Karplus y Schulz, 1985), accesibilidad en una proteína (Emini y col., 1985), ubicación en “turn” (Pellequer y col., 1993), exposición a la superficie (Janin y col., 1978), polaridad (Ponnuswamy y col., 1980) y antigenicidad misma (Kolaskar y Tongaonkar, 1990). Si se realiza el análisis con todas las propiedades al mismo tiempo el servidor calcula un consenso de los valores de antigenicidad.

Bepipred (Jens y col., 2006): Es un programa que define valores de antigenicidad para cada AA aplicando el Modelo Oculto de Markov a una escala de hidrofobicidad (Parker y col., 1986).

Antigenic (Kolaskar y Tongaonkar, 1990): Con este programa se determinan epitopes de largos variables mediante el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar. Combina información de determinantes antigénicos conocidos con valores de flexibilidad, hidrofobicidad y accesibilidad hallados por Parker y col. (Parker y col., 1986).

A pesar de los avances logrados desde que se comenzó a desarrollar este tipo de predictores, desafortunadamente la eficiencia de los programas no es óptima, tal como lo

describen los propios autores (Saha y Raghava, 2004; Kolaskar y Tongaonkar, 1990; Davydov y Tonevitsky, 2009; Sweredoski y Baldi, 2009; Saha y Raghava, 2006; Jens y col., 2006).

Al mismo tiempo, otros inconvenientes surgen en las estrategias de validación de los programas y en la heterogeneidad de la información experimental de la que se dispone para el mismo fin. Cuando se presentaron estos programas, en general se evaluaron cada uno sin compararlo con los otros, sino solo con sencillos algoritmos empleando escalas de propensión (métodos simples de comparación de promedios de valores). Esto se realizaba utilizando diferentes combinaciones de bases de datos de epitopes reales (*BciPep*: Saha y col., 2005; *HIV database*: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/editors.html>; *Immune epitope Database*: Vita y col., 2008; *Antijen*: McSparron y col., 2003; *SEDB*: Sharma y col., 2012; *IMGT*: Lefranc y col., 2012). En dichas bases, muchas de las proteínas almacenadas sólo muestran un único epitope por limitantes en los experimentos originales, dejando dudas si realmente no hay más determinantes antigénicos en su secuencia. Sin embargo, en los trabajos mencionados se ha considerado igual esa información, por lo que es posible que se haya incorporando al grupo control negativo (no epitopes) regiones que sí podrían tener epitopes. Por otro lado, en el modo de evaluación de los programas, las proteínas fueron divididas en péptidos cortos (epitopes y no epitopes) y no se consideraron las proteínas en su integridad. Finalmente, cada AA se categorizó aisladamente como antigénico o no, sin tener en cuenta que la presencia de un solo AA antigénico no puede ser por sí solo un epitope aislado (Saha y Raghava, 2004; Kolaskar y Tongaonkar, 1990; Davydov y Tonevitsky, 2009; Saha y Raghava, 2006; Jens y col., 2006). Todo esto arroja dudas sobre las evaluaciones de estos programas.

Los algoritmos que emplea cada predictor son diferentes, y sumado a la falta de trabajos publicados donde comparen estos programas entre sí, dificulta seleccionar cuales realizan las mejores predicciones.

3.5.2. Programas de predicción de epitopes estructurales

El proceso más preciso para definir los epitopes estructurales experimentalmente es mediante cristalización de los complejos Ag-Ac unidos y resolución de la interacción de sus estructuras mediante difracción de rayos X (Tomar y De, 2010). Éste es un proceso complejo que normalmente permite determinar un sólo epitope por cristalización. Si bien la determinación de epitopes lineales no es sencilla, es más fácil que la de epitopes estructurales. Por ello, hay menos información de epitopes estructurales que de epitopes lineales en las bases de datos (*CED*: Huang y Honda, 2006; *Epitome*: <http://www.rostlab.org/services/epitome/index.html>; *BciPep*: Saha y col., 2005; *Immune epitope Database*: Vita y col., 2008; *Antijen*: McSparron y col., 2003; *SEDB*: Sharma y col., 2012; *IMGT*: Lefranc y col., 2012). Esto complica desarrollar algoritmos de

predicción, por lo que hay menos programas, encontrándose entre ellos: Discotope (Jens y col., 2012), Epitopia (Rubinstein y col., 2009a y 2009b), Ellipro (Ponomarenko y col., 2008), Pepitope (Bublil y col., 2007; Mayrose y col.; 2007a y 2007b), BEpro (Sweredoski y Baldi, 2008), B-Pred (Giacò y col., 2012) y CBTOPE (Ansari y Raghava, 2010).

Varios de dichos programas utilizan escalas de propensión (Discotope, Epitopia, etc). Pero, a diferencia de los programas de predicción de epitopes lineales, los programas de predicción de epitopes estructurales generalmente requieren de la estructura de la proteína en estudio. Por ello, estos programas tienen una selección negativa basal altamente eficiente, dado el descarte de las regiones que no se encuentran expuestas sobre la superficie y que son incapaces de unir Acs.

Uno de los programas más interesante en su desarrollo es el Discotope. Primero, selecciona los AAs expuestos sobre la superficie de la proteína. Luego, los divide en grupos según su cercanía espacial y sobre cada grupo aplica un algoritmo sencillo con una escala de propensión de antigenicidad. Este algoritmo requirió ser entrenado con bases de datos de epitopes determinados experimentalmente (Jens y col., 2012).

La bibliografía sobre la eficiencia de estos programas es menor que sobre los predictores de epitopes lineales. Si se desean evaluar, hay menos programas que considerar, pero también es menor la información disponible en las bases de datos siendo, además, más complejo de procesarlas. Por otra parte, varios de estos programas han sido entrenados empleando esta misma información, reduciendo aún más los datos experimentales útiles para el análisis.

La importancia de definir con exactitud las secuencias antigénicas que unan con alta especificidad los Acs deseados, es poder diseñar futuro antígenos que solo posean estas secuencias y ninguna otra que pueda generar complicaciones en la producción, purificación y técnica diagnóstico (Hughes y col., 1986; Montoya y col., 2004; Pietkewicz y col., 2004), por ejemplo, insolubilidad de las proteínas o reacción inespecífica.

Objetivos

1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es lograr una optimización del diagnóstico de la fase aguda en toxoplasmosis en la embarazada que permita una real prevención de la infección feto-materna, a través del tratamiento precoz y, alternativamente, que evite dicho tratamiento en los casos innecesarios.

2. Objetivos específicos

a) Obtener como proteínas recombinantes los antígenos completos y/o regiones parciales de P22, P30 y P35.

b) Optimizar técnicas inmunoquímicas empleando los antígenos obtenidos, para definir con un mayor grado de certeza la infección de la fase aguda del paciente, respecto de lo que permiten las técnicas utilizadas actualmente.

c) Analizar los antígenos empleados mediante herramientas bioinformáticas para profundizar el estudio de los mismos.

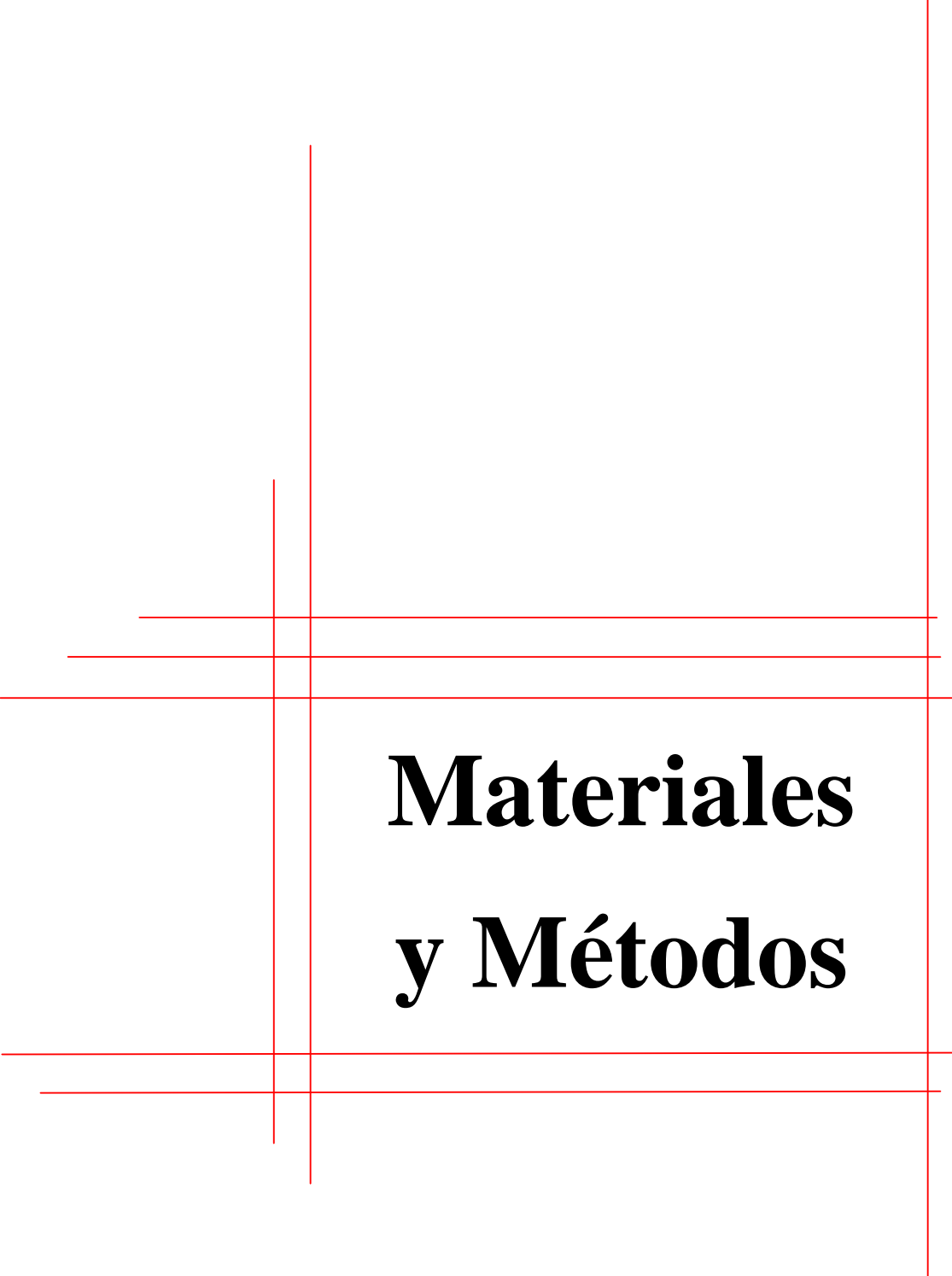
2.1. Desarrollo de los objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo general se plantearon ensayar diferentes regiones de P22, P30 y P35, para encontrar las más eficientes para la diferenciación SIA de SIC. En todas las proteínas se propuso determinar la influencia en el diagnóstico de seleccionar secuencias diferentes dentro de cada una. Específicamente en P35, se dividió la proteína en varias regiones superpuestas pero que cubrían la totalidad de la proteína. Las mismas fueron clonadas y evaluadas por separado. En P30 se analizaron 2 secuencias de extensiones diferentes, una de las cuales fue evaluada por Nigro y col., pero con la cual no obtuvieron buena discriminación entre las fases (Nigro y col., 2003). En nuestro trabajo se la cambió de vector de expresión y se analizó si se modificaban los resultados en la diferenciación de las fases. Para P22 también se evaluaron 2 regiones de extensiones diferentes, donde solo una de ellas poseía las regiones amino y carboxi terminal, pudiendo observar la influencia de estas regiones que normalmente se extraen (Li y col., 2000a; Parmley y col., 1992; Prince y col., 1990; Hisczyjska-Sawicka y col., 2005; Béla y col., 2008). De esta forma, entre los 3 Ags, se evaluaron diferentes aspectos que se proponen que influyen los resultados de los ensayos. A su vez este estudio se llevó a cabo en dos partes principalmente, mediante ensayos inmunoquímicos y mediante análisis bioinformático.

Ensayos Inmunoquímicos: P22, P30 y P35 se ensayaron para la detección de anticuerpos específicos de los isotipos IgG, IgA e IgM. El anticuerpo IgE solo es reconocido por proteínas de Roptrías (Kumolosasi y col., 1994) por lo que no se evaluó este isotipo ya que ninguno de los antígenos evaluados pertenece a esa familia de antígenos. Los ensayos se realizaron principalmente mediante la técnica ELISA indirecto, técnica que resultó eficiente en varios trabajos para diferenciar las fases de toxoplasmosis (Araújo y Ferreira, 2010; Li y col., 2000a y 2000b; Parmley y col., 1992). Además, se evaluó avidéz relativa de anticuerpos en suero de pacientes con secuencias de P22 y P35, tal como fuera descrito por Hedman y col. (Hedman y col., 1989). Finalmente, con P35 se propuso y evaluó un nuevo procedimiento experimental para diferenciar las fases de la infección.

Análisis bioinformático: Este estudio constó principalmente de tres etapas: Un análisis de secuencias, el modelado molecular y la predicción de epitopes. En el análisis de secuencia se obtuvo información (de las proteínas) que luego fue empleada para la construcción de los modelos estructurales. Los modelos estructurales luego fueron empleados para poder predecir los epitopes conformacionales. Independientemente de la información obtenida para avanzar en este proceso, las 2 primeras etapas también generaron otros datos que complementaron los resultados experimentales (Parmley y col., 1992). A su vez, los epitopes lineales fueron determinados a partir de la estructura primaria de los Ags (Kato y col., 2007). Pero la finalidad principal del desarrollo con estas herramientas *in silico*, fue construir hipótesis que expliquen los resultados de los inmunoensayos.

Para desarrollar este proyecto también se requirió profundizar ensayos y análisis que por tener un carácter accesorio a los temas tratados en esta tesis, se muestran en secciones aparte: Anexos A y B del apartado Resultados y Discusiones.



Materiales y Métodos

1. Experimentos de laboratorio

Todos los reactivos empleados fueron provistos por Merck o Cicarelli Laboratorios, de calidad para biología molecular cuando así se requirió. Otros reactivos específicos de las técnicas aquí desarrolladas, en los que se utilizaron otras marcas, se irán indicando en particular.

1.1. Clonado de genes de los antígenos P22, P30 y P35 de *Toxoplasma gondii*

1.1.1. Purificación de ADN genómico

Para obtener las secuencias codificantes de las proteínas se requirió purificar el ADN genómico total del parásito, empleando un kit de purificación (marca y clase empleada, myce: Promega, Wizard Genomic DNA Purification Kit), siguiendo las especificaciones indicadas por el proveedor.

1.1.2. Armado de gel de agarosa, electroforesis y visualización de ADN

La visualización de ADN se realizó sembrando las muestras en geles de agarosa, realizando corridas electroforéticas y finalmente exponiendo los geles a un transiluminador, lámpara de emisión de radiación electromagnética de longitud de onda ultravioleta. Se confirmó la presencia de ADN en las muestras luego de cada reacción sobre el mismo, a lo largo de todo el proceso.

Para estimar el tamaño molecular de los fragmentos de ADN se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) (myce: PB-L Productos Bio-Lógicos - Ladder 100 pares de bases). Éste posee una serie de segmentos de ADN diferenciados en tamaño uno de otro por 100 pb. El segmento más concentrado tiene 500 pb y el primero (el de más abajo) 100 pb.

El volumen de gel que se preparó en cada ensayo dependió de la cantidad de muestras de ADN a correr y del tiempo de duración de la electroforesis. En todos los casos, el gel de agarosa se compuso de 4,84 g/L de TRIS (myce: Genbiotech); 0,114 % v/v de ácido acético glacial; 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); 0,75-2 % m/v de agarosa (myce: Genbiotech - LE-Agarose 1200) (a mayor tamaño de la secuencia de ADN a correr, menor porcentaje de agarosa) y 10 mg/ml de bromuro de etidio (myce: Sigma-Aldrich). Este último compuesto se agregó al final y luego de calentar la solución para disolver completamente la agarosa. Finalmente, se colocó en un molde de la forma necesaria y, con el enfriamiento la agarosa

gelificó. El gel se colocó en una cuba electroforética (myce: Labnet), con solución conteniendo 4,84 g/L de TRIS, 0,114 % v/v de ácido acético glacial y 1 mM de EDTA.

Se sembró el ADN en el gel luego de mezclarlo con Buffer de Muestra en relación 5:1 muestra - buffer. El volumen a sembrar dependió de la muestra en cuestión, siendo desde 1 μ L cuando era un vector plasmídico hasta 6 μ L cuando era una secuencia genómica purificada.

Se desarrolló la corrida electroforética empleando una fuente de alimentación eléctrica (myce: BIO-RAD - Model 3000Xi Computer Controlled Electrophoresis Power Supply) trabajando a 100 volts.

La presencia de ADN en las muestras se visualizó exponiendo el gel al transiluminador (myce: Fotodyne).

Buffer de Muestra: 0,25 % m/v de bromofenol blue (myce: Sigma-Aldrich) y 20 % v/v de glicerol.

1.1.3. PCR de ADN

Para aislar y/o amplificar secuencias de ADN se empleó la técnica de PCR. Se utilizaron dos enzimas comerciales: Taq ADN polimerasa y pfu ADN polimerasa (myce: PB-L Productos Bio-Lógicos), empleándose una u otra dependiendo de las complicaciones para la obtención de secuencias amplificadas fieles a las secuencias originales.

Temperatura	Tiempo
95 °C	60 seg.
***	60 seg.
72 °C	90 seg.

Tabla 2: Pasos de temperaturas y tiempos de las PCRs realizadas

Para desarrollar la reacción de PCR se requirió: buffer de reacción (viene junto con la enzima) hasta dejarlo 1X en el volumen total de reacción; 3 mM de MgCl₂ (no es necesario cuando se emplea pfu ADN polimerasa); 0,25 mM de dNTP (mezcla en iguales cantidades de desoxiadenin trifosfato, dATP; desoxicitidin trifosfato, dCTP; desoxiguanidin trifosfato, dGTP; y desoxitimidin trifosfato, dTTP); 1 μ M de cada cebador; 1,5 o 1 unidad de reacción de enzima, Taq ADN polimerasa o pfu ADN polimerasa respectivamente y 0,5 ng de ADN molde; todo en un volumen final de 50 μ L. Se sometió la mezcla a cambios de temperatura como se indican en la tabla 2 empleando un termociclador (myce: Boeco Germany - Thermal cycler BioCycler TC-S). Cada ciclo se realizó 35 veces, excepto para P35T que fue 30. La temperatura ***, es la temperatura de hibridación y dependió de los cebadores empleados en cada PCR. Antes de comenzar todos los ciclos se sometió la mezcla a 95 °C durante 180 segundos (seg.) y al finalizar a 72 °C durante 10 minutos (min.).

Se empleó como ADN molde el ADN genómico total purificado de *T. gondii*.

A continuación se muestran los cebadores utilizados. Entre paréntesis se indica la temperatura de hibridación empleada.

P35A (51 °C): directo: 5`-GAATTCATGGCTTTACCATTGCGTG-3`
 reverso: 5`-AAGCTTCGTTGGCGGGGGATGCTG-3`

P35B (53 °C): directo: 5`-GAATTCGGAATGCCCAAGCCAGAG-3`
 reverso: 5`-AAGCTTTGGAGTGCCCACTGGATACG-3`

P35C (55 °C): directo: 5`-GAATTCCCGCCAACGGGTTCCCC-3`
 reverso: 5`-AAGCTTTGGCACTGGAGGAGCACG-3`

P35D (49 °C): directo: 5`-GAATTCCCCCAGCCGGAGATAC-3`
 reverso: 5`-AAGCTTTGCCATTGCAGCCACTACC-3`

P35E (46 °C): directo: 5`-GAATTCGCTCCTCGTGTGCTGG-3`
 reverso: 5`-AAGCTTATTCTGCGTCGTTACGG-3`

P35T (45 °C): directo: 5`-GAATTCATGGCTTTACCATTGCGTG-3`
 reverso: 5`-AAGCTTATTCTGCGTCGTTACGG-3`

P22c (59 °C): directo: 5`-GGATCCACCACCGAGACGCCAGC-3`
 reverso: 5`-GAATTCTTGCCCGTGAGAGACACAG-3`

P22L (53 °C): directo: 5`-GGATCCAATCTTTGTCTTGTCGGAAC-3`
 reverso: 5`-GAATTCTTACACAAACGTGATCAACAAA-3`

Adelante de cada cebador se subrayó la secuencia incorporada, blanco de enzimas de restricción, para poder traspasar el gen de un vector a otro por corte y ligación. Las enzimas de restricción empleadas fueron:

- *Bam*H I: GGATCC.
- *Eco*R I: GAATTC.
- *Hind* III: AAGCTT.

Los cebadores utilizados fueron sintetizados por Invitrogen life technologies.

Se obtuvieron 8 secuencias genómicas denominadas: P35A, P35B, P35C, P35D, P35E, P35T, P22c y P22L. En el único cebador que se incluyó un codón stop fue en el reverso de P22L, propio de la secuencia original.

1.1.3.1. Agregado de cola de dAMP (desoxiadenin monofosfato) en los extremos romos:

La pfu ADN polimerasa genera extremos romos en lugar de cohesivos. Para poder ligar el gen al vector de clonado, se generó un extremo cohesivo empleando la Taq ADN polimerasa. Se requirió para esta reacción 6 o 7 µL de producto de PCR; 3 mM de MgCl₂; 1 µL de buffer de reacción de la Taq ADN polimerasa; 0,2 mM de dATP y 3 unidades de reacción de la enzima Taq ADN polimerasa; todo en un volumen final de 10 µL. Finalmente se incubó 30 min. a 70 °C.

1.1.3.2. Obtención del ADN de P30:

Las secuencias de P30c y P30L fueron obtenidas a partir de clones de *Escherichia coli* CTX M15, en el vector pQE (myce: Qiagen), cedidos gentilmente por el Dr. Sergio Oscar Ángel.

Se extrajeron los vectores de las bacterias y luego los genes de interés mediante cortes con las enzimas de restricción *Bam*H I y *Hind* III.

1.1.4. Vectores plasmídicos

Los genes obtenidos se transfirieron primero a un vector de clonado y luego a un vector de expresión (Terpe, 2006). El vector de clonado empleado fue T Easy Vector (myce: Promega - pGEM®-T Easy Vector System I). Los vectores de expresión utilizados fueron pRSET B (myce: Invitrogen life technologies), pRSET C (myce: Invitrogen life technologies), pET-24a₍₊₎ (myce: Novagen), pET-32a₍₊₎ (myce: Novagen) y pMal-c2X (myce: New England Biolabs). Todos los vectores de expresión poseen una secuencia nucleotídica repetida de CAC (excepto el pMal-c2X), que codifica una "cola" de varios aminoácidos contiguos de histidina. Ésta se expresa junto a la proteína y facilita su purificación (ver el punto 2.2.2. en Introducción y 1.2.3. de Materiales y Métodos). Todos estos plásmidos expresan constitutivamente la proteína β -lactamasa que confiere a la bacteria que los contiene resistencia al antibiótico ampicilina, excepto el pET-24a₍₊₎ que expresa el gen KanR otorgando resistencia al antibiótico kanamicina. Esto permite la selección de la bacteria que contiene el plásmido. Particularmente el vector pET-32a₍₊₎ expresa también unido a la proteína de interés otra proteína, la Tiorredoxina A (TrxA) de 109 AAs. El vector pMal-c2X expresa Maltose Binding Protein de 462 AAs, que a su vez facilita la purificación del polipéptido de interés. Ambas proteínas pueden expresarse solas cuando el vector no tiene ningún inserto génico extra (LaVallie y col., 1993).

La tabla 3 muestra que genes se introdujeron en cada vector plasmídico.

Vectores	Proteínas									
	P35A	P35B	P35C	P35D	P35E	P35T	P22c	P22L	P30c	P30L
pRSET B	X									
pRSET C										X
pMal-c2X						X				
pET-24a₍₊₎	X	X	X	X	X					
pET-32a₍₊₎	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

Tabla 3: Combinación de secuencias génicas y vectores plasmídicos de expresión ensayados.

El éxito en cada construcción vector-gen siempre fue confirmado definitivamente mediante secuenciación del plásmido. Aunque también se desarrollaron controles previos antes de realizar este control final, mediante por ejemplo: liberación del inserto con enzimas de restricción, amplificación del mismos mediante la técnica de PCR, inducción de la proteína cuando se trabajó con vectores de expresión, entre otros.

Las muestras de ADN provenientes de una PCR o de un proceso de corte siempre fueron purificadas antes de seguir utilizándolas, para asegurar que la secuencia a ligarse al vector fuera sólo el gen de interés. Para ello, toda la muestra de ADN se corrió en gel de agarosa. Se extrajo la región de gel conteniendo la secuencia de interés y se procesó siguiendo el protocolo de un kit comercial (myce: Promega, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System), obteniendo así el ADN purificado y listo para ser ligado.

1.1.5. Ligación de secuencias de ADN

Para ligar secuencias de ADN se empleó la enzima ligasa (myce: Promega) según:

- 0,5 μ L de ligasa
- 1 μ L de buffer ligación (viene junto con la ligasa)
- ADN del vector y del inserto a ligar. Los volúmenes deben ser tales que la relación de masas entre inserto y vector sean 3:1.

Volumen final de reacción, 10 μ L.

El preparado se incubó a 4 °C toda la noche o a 20 °C durante 4 horas (hs.).

1.1.6. Cepas bacterianas

Se emplearon tres cepas bacterianas diferentes de *E. coli*.

E. coli DH5 α [genotipo: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1]: Apropia para tomar plásmidos, y además contiene los genes que complementan al vector T Easy Vector de manera que cuando se introduzca el gen de interés, la colonia sea color azul, en vez de blanca.

E. coli BL21 (DE3) [genotipo: F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm (DE3)]: Permite la expresión del gen cuando se encuentra en los vectores empleados, al agregar al medio de cultivo lactosa o Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

E. coli Rosetta (DE3) [genotipo: F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm (DE3) pRARE6 (CamR)]: Posibilita la expresión del gen cuando se encuentra en los vectores empleados, al agregar al medio de cultivo lactosa o IPTG. Además tiene vectores que transcriben ácido ribonucleico (ARN) de transferencia de poca frecuencia en *E. coli*. Además, estos vectores confieren a la bacteria resistencia al antibiótico cloranfenicol.

Todos los genes se clonaron en las cepas de *E. coli* DH5 α y BL21 (DE3). Los genes P35C, P35E y P35D se clonaron también en la cepa Rosetta (DE3), cuando estuvieron dentro del vector pET-32a₍₊₎.

1.1.7. Cultivos e incubaciones

Todo el trabajo con bacterias y medios de cultivo se realizó con elementos estériles y dentro del equipo de flujo laminar (myce: Forma Scientific - Laminar Flow Work Station).

Las bacterias siempre se cultivaron en el medio de cultivo Luria Bertani (L.B.); 5 g/L de NaCl, 10 g/L de peptona de carne (myce: Merck - Mikrobiologie - Peptone water buffered) y 5 g/L de extracto de levadura (myce: Britania Laboratorios); con una agitación de 200 revoluciones por minuto (r.p.m.) en shaker (myce: Sontec).

Cuando se requirió, se emplearon los antibióticos ampicilina, kanamicina y cloranfenicol en concentraciones 1 µg/mL, 12,5 µg/mL y 30 µg/mL, respectivamente.

1.1.8. Transformación

Se transformaron células bacterianas introduciéndoles los plásmidos que tenían los genes de interés incorporados, según el siguiente protocolo:

Los cultivos se incubaron en medio líquido L.B. a 37 °C, toda la noche. Luego se diluyeron 1/100 con L.B. nuevo, siguiéndose la incubación a 37 °C entre 2 a 3 hs., hasta que la densidad óptica fue entre 0,4 y 0,6. Se tomó del cultivo un volumen de 1 mL, tantas veces como diferentes plásmidos se tenían. Se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 5 min., descartando el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 500 µl de solución ST1. Luego se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 5 min., descartando el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 500 µL de solución ST2. Se enfrió el cultivo en baño de hielo durante 20 min., y se volvió a centrifugar a 5000 r.p.m. durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 100 µL de solución ST2. Se agregó el vector plasmídico, 1 µL cuando provenía de una purificación y 5 µL cuando era vector recién ligado. El cultivo se enfrió en baño de hielo durante 60 min. Luego se calentó a 42 °C durante 45 seg. Inmediatamente se agregó 1 mL de medio de cultivo L.B. e incubó durante 1 hora a 37 °C. Se centrifugó a 4200 r.p.m. durante 5 min. Se retiró 1 mL del sobrenadante para luego resuspender el pellet en los 100 µL restantes. Esa solución se distribuyó homogéneamente sobre medios de cultivo L.B. con antibiótico y gelificados con agar en placas de Petri. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

ST1: 10 mM de sal de MOPS (myec: Genbiotech) y 10 mM de KCl, ajustado a pH 7 y utilizando la solución a 4°C.

ST2: 100 mM de sal de MOPS, 10 mM de KCl y 50 mM de CaCl₂, ajustado a pH 6,5 y utilizando la solución a 4°C.

Cuando se empleó el vector T Easy Vector, sólo aquellas colonias que poseían el vector crecieron en medio de cultivo con ampicilina y fueron de color azul cuando contuvieron el inserto genómico de interés. Siempre se confirmó la presencia del gen purificando el plásmido de

las colonias, liberándolo del vector mediante corte a los costados del inserto y observando finalmente la presencia del gen liberado. Los protocolos de purificación y corte de ADN se presentan a continuación.

1.1.9. Purificación de plásmido de ADN

Se emplearon dos protocolos diferentes de purificación. Cuando se debió obtener plásmidos de varias colonias bacterianas, sin tener la certeza de que todos los vectores purificados tuviesen los genes introducidos, se empleó un protocolo tradicional. Cuando se debió purificar plásmidos de pocas bacterias con la certeza de que todos los vectores tenían secuencias de ADN útiles, se empleó un kit comercial, asegurando mayor rendimiento del procedimiento.

1.1.9.1 Protocolo tradicional:

Las bacterias con el plásmido de interés se incubaron en un cultivo líquido de 3 mL de L.B. a 37 °C toda la noche, con el antibiótico que correspondía. El cultivo se centrifugó a 6000 r.p.m. por 5 min. para luego remover el sobrenadante. Se agregó 200 µL de SOLUCIÓN I y se mezcló hasta resuspender el pellet. Luego se agregó 300 µL de SOLUCIÓN II, mezclando suavemente, para luego incubar en hielo durante 5 min. Posteriormente, se neutralizó la solución con 300 µL de SOLUCIÓN III, mezclando de nuevo suavemente e incubando en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 13000 r.p.m. por 10 min. y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, descartando de este modo los restos celulares. Luego se agregó la SOLUCIÓN IV, un volumen igual al que quedaba en la solución del paso anterior, y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 13000 r.p.m. por 5 min. a 4 °C, transfiriendo la fase superior a un tubo limpio. Se adicionó 400 µL de cloroformo y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó 1 min. a 13000 r.p.m., recuperando la fase superior al transferirla a un tubo limpio. Se repitieron luego los pasos desde la adición de cloroformo. A la fase acuosa recuperada, se le agregó igual volumen de isopropanol y luego se mezcló invirtiendo. La mezcla se colocó en el freezer 15 min., mínimamente. Luego, se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 10 min., se extrajo el sobrenadante y se lavó el pellet con 80 µL de etanol al 70 %. Se centrifugó a 13000 r.p.m. por 3 min. y se retiró el sobrenadante, dejando secar el tubo 15 min. a 37 °C. Luego se resuspendió el ADN en 32 µL de agua estéril, se agregó ARNasa (myce: Sigma-Aldrich) de modo que la concentración final fuera 20 µg/mL y se incubó a 37 °C durante 30 min.

SOLUCIÓN I: 50 mM de glucosa, 25 mM de TRIS y 10 mM de EDTA, ajustada a pH 8.

SOLUCIÓN II: 0,2 N de NaOH y 1 % de dodecil sulfato de sodio (SDS; myc: Promega), preparada al momento de ser utilizada.

SOLUCIÓN III: acetato de potasio 3 M ajustada a pH 4,8.

SOLUCIÓN IV: Mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1.

1.1.9.2. Kit comercial:

Se empleó el kit de Promega, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, como lo indica su protocolo.

Los vectores purificados se corrieron en electroforesis de geles de agarosa para confirmar sus presencias, como todas las otras muestras de ADN.

1.1.10. Corte de ADN

Se emplearon las enzimas de restricción comerciales, *BamH* I, *EcoR* I y *Hind* III, según que gen se trabajó (como se especifica en el punto 1.1.3. de esta sección; myce: Promega). Para todas se empleó el mismo protocolo:

- 2 μ L de buffer de corte.
- 0,5 μ L de albúmina sérica bovina.
- 3 μ L de ADN a cortar en concentración de 0,3 μ g/ μ L.
- 0,5 μ L de enzima de restricción.
- 14 μ L de agua estéril.

Se incubó en estufa a 37 °C durante 2 hs.

Luego de confirmar la presencia del gen en el vector de clonado, se procedió a secuenciar utilizando el servicio de la Unidad de Genómica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Las Cabañas y De los Reseros S/N° (1686) Hurlingham, Bs. As., Argentina. De este modo se confirmó que el gen incorporado fuera el correspondiente y se controló que no hubiera mutaciones en la secuencia que la inhabiliten para su posterior empleo.

Se traspasó el gen desde el vector de clonado al vector de expresión mediante corte, purificación y ligación (empleando el plásmido según lo indicado en el punto 1.1.4. de esta misma sección). La construcción gen-vector se insertó en la cepa de *E. coli* (según punto 1.1.6. de esta misma sección) mediante transformación. En la placa de Petri sólo crecieron las colonias que tenían el vector. En función de controles internos de la técnica de transformación, se seleccionaron colonias para ensayar la expresión de las proteínas de interés. Finalmente, se purificaron los plásmidos de estas colonias y se volvieron a secuenciar los genes insertados.

1.2. Inducción y purificación de proteínas

1.2.1. Inducción de proteínas

El clon aislado de bacterias con la construcción plasmídica deseada se repicó desde la placa de Petri a un medio líquido de L.B. con los antibióticos correspondientes y se cultivó a 37 °C toda la noche. El medio crecido se diluyó 1/50 con nuevo medio líquido también de L.B. Los volúmenes finales dependieron de la cantidad de proteína requerida. Luego se incubó 3 hs. a 37 °C. Se agregó el inductor IPTG (myce: Promega) al medio de cultivo en concentración final de 0,1 mM y se dejó expresando la proteína a 20 °C toda la noche. Finalmente, se recolectaron las células centrifugando 8 min. a 8000 r.p.m., descartando el sobrenadante.

Todos los Ags provenientes del gen de P35 (solamente cuando estuvieron clonados en *E. coli* BL21 DE3) y P30 también se indujeron cruzando las siguientes condiciones (Terpe, 2006):

- Inductores (concentraciones): IPTG (0,1 o 1 mM) o Lactosa (2,5 o 5 g/L).
- Tiempos de inducción: 3 hs. o toda la noche.
- Temperaturas durante la inducción: 20 o 37 °C.

1.2.2. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida (PAGE)

Para visualizar proteínas en las muestras, se sembraron en geles de poliacrilamida al 15 %, se sometieron a una electroforesis y finalmente se colorearon. Para corroborar el peso molecular de las proteínas, se corrió en paralelo un marcador de peso molecular. A lo largo del trabajo se emplearon dos distintos, uno de la marca *Bio-RAD* con bandas a las alturas de 14; 20,5; 31; 45; 66,2 y 97,4 KDa y otro de la marca Thermo Scientific con bandas a las alturas de 14,4; 18,4; 25; 35; 45; 66,2 y 116 KDa.

El gel se construyó con dos regiones de geles distintos, denominadas gel de apilamiento y gel de separación

Gel de apilamiento: 4,68 % m/v de acrilamida (myce: Promega - Acrylamide Molecular Grade); 0,13 % m/v de bisacrilamida (myce: Amersham Biosciences - Plusone Methylenebisacrylamide); 12,5 % v/v de TRISA; 0,1 % m/v de SDS; 0,1 % v/v de TEMED (myce: Sigma-Aldrich) y 0,05 % m/v de persulfato de amonio.

Gel de corrida: 14,6 % m/v de acrilamida; 0,4 % m/v de bisacrilamida; 37,5 % v/v de TRISB; 0,1 % m/v de SDS; 10 % v/v de glicerol, 0,06 % v/v de TEMED y 0,05 % m/v de persulfato de amonio.

Los geles se prepararon en moldes-soportes que luego se sumergieron en Buffer de Corrida dentro de una cuba electroforética (myce: Amersham Biosciences, Multiple Gel Caster). En el gel de apilamiento se sembraron 15 µL de muestra, luego de mezclarlas en igual volumen con Buffer de Muestra y hervirlas 5 min. Cuando la muestra fue medio de cultivo con células inducidas, primero se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 8 min., luego el pellet se resuspendió en

la tercera parte del volumen tomado de medio de cultivo y de ahí se sacó la muestra para mezclarlo con Buffer de Muestra. La electroforesis se desarrolló con una fuente eléctrica (myce: Bio-rad, Porwer Pac 300) a 150 volts para gel de apilamiento y a 200 volts para gel de corrida.

La visualización de las proteínas se logró tiñendo el gel con Solución Colorante y decolorando primero con Solución Decolorante I y segundo con Solución Decolorante II.

TRISA: 1 M de TRIS-HCl (myce: NCN Biomedicals - TRIS hydrochloride ultra pure) ajustado a pH 6,8.

TRISB: 1 M de TRIS-HCl ajustado a pH 8,8.

Buffer de Corrida: 0,025 M de TRIS-HCl; 0,192 M de Glicina y 0,1 % m/v de SDS ajustado a pH 8,3.

Buffer de Muestra: 12,5 % v/v de TRISA, 10 % v/v de glicerol, 2 % m/v de SDS, 5 % v/v de β -mercaptoetanol y 0,05 % m/v de azul de bromofenol.

Solución Colorante: 0,1 % m/v de Coomassie blue G-250; 45 % v/v de etanol y 10 % v/v de ácido acético.

Solución Decolorante I: 50 % v/v de etanol y 10 % v/v de ácido acético.

Solución Decolorante II: 10 % v/v de etanol y 7 % v/v de ácido acético.

1.2.3. Purificación de proteínas

El clonado de todos los genes se diseñó para que las proteínas que se traduzcan posean regiones de poli-histidina (ver el punto 2.2.2. en Introducción y 1.1.4. de Materiales y Métodos). Este aminoácido se une a Ni mediante su átomo de nitrógeno del grupo R, formando un enlace de coordinación. Por lo tanto una cadena de histidinas se une con fuerza a este metal. Aprovechando esta propiedad, se emplearon columnas de purificación comerciales que tienen Ni inmovilizado (myce: Invitrogen, Ni-NTA Agarosa), para purificar las proteínas clonadas del resto de los contaminantes de la bacteria (Gaberc-Porekar y col., 2001; Charlton y Zachariou, 2008; Sørensen y Mortensen, 2005).

1.2.3.1. Protocolo basal: Primero se lisó el pellet de células inducidas. Para lo cual se resuspendieron las células en Solución Madre con 20 mM de imidazol (grupo R de la histidina) y se sometió la suspensión a ondas de ultrasonido con un equipo sonicador (myce: Sonics and Materials - Vibra-cell). Luego se centrifugó 5 min. a 10000 r.p.m. El pellet se descartó y el sobrenadante se filtró por papel de filtro para eliminar impurezas insolubles. La solución se congeló y descongeló 2 veces, favoreciendo la precipitación de impurezas y se volvió a filtrar. La solución se pasó por una columna de purificación de 1 mL a 0,5 mL/seg., quedando retenida la proteína. Luego se pasó Solución Madre con concentraciones crecientes de imidazol: 50, 100, 250 y 500 mM, 4 mL de cada una. Las más diluidas limpiaron la columna de las impurezas

bacterianas y las últimas eluyeron la proteína recombinante. Se recolectaron los eluatos de a 1 mL y se corrió una fracción de cada uno en un gel de poliacrilamida, para encontrar en cual eluyó la proteína de interés.

Para verificar si la proteína es soluble, precipita y/o forma cuerpos de inclusión, luego de someter a ondas de ultrasonido y centrifugar las células inducidas (y antes de comenzar el propio proceso de purificación), se realizó un PAGE con el precipitado y el sobrenadante de estos pasos, observando en que fracción se encuentra la proteína. Si precipita y forma cuerpos de inclusión, los mismos se observarían al lavar el pellet con detergente tritón 1 % v/v 5 veces (que solubiliza todo menos cuerpos de inclusión), centrifugando a 10000 r.p.m. durante 10 min. y descartando el sobrenadante entre cada lavado (Vallejo y Rinas, 2004).

Para la purificación de TrxA, P35B y P22c sólo se empleó el protocolo basal. En el caso de otros Ags, se ensayaron además variantes de este protocolo para mejorar la eficiencia de purificación, según:

1.2.3.2. P35A: A todas las soluciones del proceso se les agregó urea hasta una concentración final 4 M, para desnaturalizar la proteína y exponer mejor la región de polihistidina.

1.2.3.3. P22L: Luego de sonicar se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 min. Ese pellet se lavó 5 veces con detergente tritón 1 % v/v, centrifugando entre lavados. Luego, se solubilizaron los cuerpos de inclusión mediante Solución Madre 20 mM de imidazol, 1 % m/v de SDS, 4 M de urea y sonicando esta solución final. Luego, se siguió el protocolo basal pero agregando a todas las soluciones SDS y urea, 0,1 % m/v y 4 M, respectivamente (Sørensen y Mortensen, 2005; Vallejo y Rinas, 2004).

1.2.3.4. P30c: Se ensayaron diferentes metodologías (los fundamentos de cada paso son explicados en el punto 2.1.3.1 de Resultados y Discusiones):

- Agregado de urea hasta concentración final 4 M a todas las soluciones del proceso.
- Agregado de urea hasta concentración final 4 M a todas las soluciones del proceso, utilizándose volúmenes de 2,5 mL de recolección y columna de Ni.
- Agregado de urea y EDTA a todas las soluciones del proceso, hasta concentraciones 4 M y 0,5 mM, respectivamente. También se elevó la concentración de imidazol de la solución de sonicado de pellet a 35 mM y se utilizó volúmenes de 2,5 mL de recolección y columna de Ni.

1.2.3.5. P30L: Se ensayaron diferentes metodologías (con iguales fundamentos que en P30c):

- Agregado de urea a todas las soluciones del proceso, hasta una concentración final 4 M.
- Agregado urea a todas las soluciones del proceso hasta concentración final 4 M, utilizándose volúmenes de 2,5 mL de recolección y columna de Ni.

Solución Madre: 0,3 M de NaCl y 0,05 M de NaH₂PO₄.

Un proceso de purificación se consideró aceptable cuando al correr la fracción de la purificación en un PAGE, hubo como máximo 3 bandas bien definidas de otras proteínas inespecíficas y su intensidad de color/concentración fue de la mitad de intensidad de la banda de la proteína de interés. Cuando algunas fracciones de la purificación resultaron con buena concentración de la proteína de interés pero tuvieron bastante contaminación, se pasaron todas las fracciones "mal purificadas" juntas por la columna, en idénticas condiciones que la anterior vez.

1.2.4. Cuantificación de proteínas

Para las fracciones de las proteínas purificadas, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en paralelo a muestras de albúmina pura en concentraciones crecientes y conocidas. Por comparación visual del tamaño e intensidad de color de la bandas en el gel, se estimaron las concentraciones incógnitas de las muestras de interés.

1.3. Ensayos inmunoquímicos

A todos los antígenos obtenidos se los sometió a diferentes ensayos inmunoquímicos para determinar cuál es el más apropiado para diferenciar entre fase aguda y crónica de la infección de toxoplasmosis. También se buscó determinar cual Ac es el más apropiado para cada uno.

1.3.1. Panel de sueros

La seroteca empleada para los ensayos de este trabajo se armó en nuestro laboratorio a partir de sueros provistos por los responsables de los servicios de tres centros de salud:

- Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán (laboratorio clínico de referencia en el control de la infección por *T. gondii* durante el embarazo en la Argentina). Responsables: Bioq. Liliana Carral y Bioq. Federico Kaufer.

- Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe. Responsable Bioq. I. Dalla Fontana.

- Centro de Salud de la Universidad Nacional del Litoral. Responsable: Dr Jorge Roldán.

Todas las muestras provenientes del Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán y del Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe fueron clasificadas antes de ser enviadas, empleando las siguientes técnicas específicas para Acs contra *T. gondii*: IFI para IgG, ensayo de Sabin-Feldman, ISAGA para detección de IgM e IgA, ELISA de Avidéz para IgG y HAI para

IgG. Los sueros provenientes del Centro de Salud de la Universidad Nacional del Litoral no contaban con clasificación serológica previa, por lo tanto se evaluaron en nuestro laboratorio mediante HAI, ELISA contra homogenato total del parásito para detección de IgG específica e ISAGA para detección de IgM específica. Todos los sueros fueron ensayados por un mínimo de 3 y un máximo de 6 técnicas para su clasificación.

En total se obtuvieron 242 sueros que se clasificaron en los siguientes grupos:

1.3.1.1. SIN: 73 sueros de individuos no infectados por *T. gondii*. Estos sueros dieron reacción negativa para, al menos, 2 de las siguientes técnicas: ELISA para IgG, IFI para IgG, ensayo de Sabin-Feldman, HAI e ISAGA para IgM.

1.3.1.2. SIC: 84 sueros de individuos con infección crónica por *T. gondii*. Estos sueros dieron reacción positiva en al menos dos de las siguientes técnicas: ELISA para IgG, IFI para IgG, HAI y/o ensayo de Sabin-Feldman. Además paralelamente dieron reacción negativa en ISAGA para IgM, o avidéz mayor a 41 % en ELISA de avidéz.

1.3.1.3. SIA: 85 sueros de individuos con toxoplasmosis presumiblemente en la fase aguda de la infección. Estos sueros dieron reacción positiva en, al menos, 2 de los siguientes ensayos: ELISA para IgG, IFI para IgG, HAI y/o ensayo de Sabin-Feldman. Paralelamente dieron reacción positiva en ISAGA para IgM, ISAGA para IgA y/o avidéz menor a 41 %. Cabe aclarar que todos los sueros que tuvieron avidéz entre 30 y 41 % siempre dieron positivos en ISAGA (IgM o IgA).

1.3.1.4. SIAS: 23 sueros de individuos con toxoplasmosis y sobre los que se tuvo un alto grado de certeza que cursaban infección aguda. SIAS es un subgrupo dentro de SIA. Estos sueros dieron reacción positiva en al menos 2 de los siguientes ensayos: ELISA para IgG, IFI para IgG y/o ensayo de Sabin-Feldman. Además presentaron IgM específica por ISAGA y cumplieron con al menos 2 de los siguientes criterios: Avidéz menor al 30 %, título de ISAGA IgM igual o mayor a 4000 y/o ISAGA IgA positiva.

1.3.1.5. SIP: 169 sueros de individuos con toxoplasmosis. Son los grupos combinados SIA y SIC.

1.3.2. ELISA indirecto con proteínas recombinantes

Se evaluaron las proteínas P35A, P35B, P22c y P22L para la detección de anticuerpos específicos IgG, IgA e IgM; y P30c y P30L para la detección de anticuerpos específicos IgG e IgA.

Se trabajó con placas de 96 pocillos (poc.) para ELISA (myce: Greiner bio one - ELISA-plate, microton, 96 W; flat-bott., high binding). Cada par de Ags pertenecientes a la misma proteína se evaluaron en la misma placa para cada suero, y cada suero se ensayó por duplicado.

Protocolo empleado:

Sensibilización: El Ag de interés se sembró en un volumen de 100 µL por poc. diluido en Buffer Carbonato (ver tabla 4), incubando toda la noche a 4 °C. Se lavaron tres veces todos los poc. llenándolos completamente de PBS-Tween, dejando la solución durante 30 seg. cada vez.

Bloqueo: Se colocó 200 µL de PBS-bloqueo por poc., y se incubó la placa 30 min. a 37 °C. Los pocillos se lavaron con PBS-Tween de igual manera que antes.

Inmunoensayo: El suero diluido en PBS-Leche (ver tabla 4) se colocó en un volumen de 100 µL por poc. y se incubó la placa 60 min. a 37 °C. Los pocillos se lavaron como antes con PBS-Tween. Se colocó 100 µL por poc. del Ac anti-Ac humano conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Ac conj.; myce para detectar IgG: Jackson Immunoresearch - Peroxidase-Specific Conjugated Affinity Ghost-Human IgG, Fc, Fragment Pure; myce para detectar IgA: Abcam - Rb pAb to Hu IgA, HRP; myce para detectar IgM: Abcam - Rb pAb to Hu IgM, HRP), diluido en PBS-Leche (ver tabla 4) y se incubó la placa 60 min. a 37 °C. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS-Tween de igual manera que antes. Se agregó 2 gotas por poc. de cromógeno (myce: Invitrogen - TMB Single Solution; 3,3',5,5'-tetrametilbencidina), incubando 10 min. a 20 °C. Finalmente se agregaron 2 gotas por poc. con gotero de 0,5 M de H₂SO₄ y se leyó la densidad óptica (D.O.) en espectrofotómetro (myce: BioTeK - ELx808) a una longitud de onda 450 nm.

Se evaluaron diferentes cantidades de antígeno, suero y Ac conj. para cada ensayo. Estos ensayos se realizaron con 3 mezclas de sueros armadas cada una por combinación de 8 a 10 sueros que tuvieron señales representativas del grupo (SIA, SIC y SIN) en anteriores ensayos. En la tabla 4 se describen las condiciones óptimas encontradas y empleadas para evaluar todo el panel de sueros.

ELISA Indirecto		Ac detectado	Cantidad de Ag/poc.	Dilución del Suero	Dilución del Ac conj.
Antígenos	P35	IgG	0,5 µg	1/100	1/3000
		IgA	0,25 µg		1/500
		IgM	1 µg		
	P22	IgG	0,25 µg	1/200	1/3000
		IgA		1/25	1/500
		IgM	1,5 µg	1/10	1/2000
	P30	IgG	0,5 µg	1/50	1/1000
		IgA	1 µg	1/100	1/250

Tabla 4: Cantidades óptimas de antígeno, suero y Ac conj. empleadas para cada ensayo.

Buffer Carbonato: 15 mM de Na₂CO₃ y 35 mM de NaHCO₃ a pH 9,6.

PBS (Buffer de fosfato salino): 137 mM de NaCl, 2,7 M de KCl, 10 M de Na₂HPO₄ y 1,8 mM de KH₂PO₄, ajustado a pH 7,4.

PBS-Tween: PBS con 0,05 % v/v de detergente Tween 20 (myce: Sigma-Aldrich).

PBS-bloqueo: PBS con 5 % m/v de leche en polvo descremada (myce: Sancor, San Regim).

PBS-Leche: PBS con 1 % m/v de leche en polvo descremada.

1.3.3. Ensayo de avidéz

Se midió la avidéz de los anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii* en SIAS de avidéz baja, determinada con el kit provisto por Platelia en el Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán y en SIC de avidéz desconocida. Se ensayó separadamente con los antígenos P35B y P22c (los que mejores resultados arrojaron en los ELISAs indirectos, ver puntos 1.1.4. y 3.1.5. de Resultados y Discusiones).

La avidéz de los Acs contra P22c y P35B se comparó con aquella obtenida con el kit por 2 razones, utilizar sueros sobre los que se tengan certeza que tenían avidéz baja y observar si se podía obtener valores de avidéz similares a los obtenidos en laboratorios de diagnóstico clínico.

Protocolo empleado:

Sensibilización: El Ag diluido en buffer carbonato se sembró en un volumen de 100 µL por poc., incubando toda la noche a 4 °C. Se colocó 0,25 µg/poc. de P22c y 0,5 µg/poc. de P35B. Se lavó tres veces todos los poc. llenándolos completamente de PBS-Tween, dejando la solución durante 30 seg. cada vez.

Bloqueo: Se colocó 200 µL por poc. de PBS-bloqueo y se incubó la placa 30 min a 37 °C. Se lavaron todos los poc. con PBS-Tween de igual manera que antes.

Inmunoensayo: Por cada suero se realizaron sobre la placa diluciones seriadas en PBS-Leche, colocando un volumen de 100 µL por poc. Para P22c se inició en 1/100, finalizando en 1/12800; y para la P35B se comenzó en 1/50, finalizando en 1/6400. Cada suero se sembró por duplicado y se incubó la placa 60 min. a 37 °C. Se lavaron todos los poc. con PBS-Tween de igual modo que antes. Se agregó 200 µL de PBS a una serie de los duplicados de cada suero y PBS-Urea a la otra serie, incubando 20 min. a 37 °C. Otra vez, se lavaron todos los poc. con PBS-Tween de igual manera que la anterior. El Ac conj. diluido en PBS-Leche (se diluyó 1/20000 cuando se trabajó con P22c y 1/17000 cuando se trabajó con P35B) se colocó en un volumen de 100 µL por poc., incubando la placa 60 min. a 37 °C. Se volvió a lavar con PBS-Tween todos los poc. de igual manera que antes. Se agregó 2 gotas de cromógeno por poc., incubando 10 min. a 20 °C. Se agregó 2 gotas por poc. de 0,5 M de H₂SO₄ y se leyó D.O. en espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Finalmente, se graficó los títulos de las diluciones contra D.O. para cada suero, incubados con PBS-Urea y con PBS, separadamente. La avidéz se calculó como el cociente entre los títulos de los sueros incubados con y sin urea, a una D.O. igual al 30% de la máxima obtenida para dicho suero sin urea. Los títulos se obtuvieron interpolando en las gráficas. Esta metodología se basó en la técnica original de determinación de avidéz de Hedman y col. (Hedman y col., 1989).

PBS-urea: PBS con urea en concentración final de 6 M.

1.3.4. Dot blot

Se empleó esta técnica para detectar IgG específica anti-*T. gondii* sobre membrana de nitrocelulosa (myce: GE Healthcare, Amersham Hybond-ECL) y confirmar una reacción específica sin emplear un espectrofotómetro. Se realizó con P35A, P35B, lisado del parásito y TrxA.

Protocolo empleado:

Sensibilización: Se sembró 1 μ L del antígeno (con 0,3 mg/mL de proteína o 10 mg/mL de lisado de *T. gondii*) sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejó secar.

Bloqueo: Se sumergió completamente la membrana en PBS-bloqueo y luego se incubó en agitación (myce del agitador empleado: Rock - 321B) durante 60 min. Se lavó tres veces sumergiendo la membrana completamente en PBS-Tween durante 1 min. cada vez.

Inmunoensayo: Se sumergió la membrana en suero diluido en PBS-Leche (1/50 para el Dot Blot simple y 1/100 para el semicuantitativo) y se incubó en agitación durante 60 min. Se lavó la membrana tres veces con PBS-Tween igual que antes. Luego, se sumergió la membrana completamente en Ac conj. diluido en PBS-Leche (1/1000 para el Dot Blot simple y 1/1500 para el semicuantitativo), incubando en agitación durante 60 min. Se lavó tres veces de nuevo con PBS-Tween. Finalmente, se reveló sumergiendo la membrana completamente en el cromógeno (3, 3'-diaminobenzidina; myce: Sigma-Aldrich) hasta que aparecieron las manchas, no más de 20 min. y cortándolo también si la membrana completa comenzaba a tomar color.

1.3.4.1. Dot blot semicuantitativo: Se elaboró una cuantificación del ensayo Dot blot para P35A y P35B. Para ello, se realizó la técnica de Dot blot pero, en lugar de sembrar un sólo punto por proteína, se sembró una serie de 5 puntos de 1 μ L con las concentraciones de 0,7; 0,35; 0,14; 0,07; 0,014 y 0,007 mg/mL para cada Ag. Los 5 puntos se expusieron al mismo suero. Cuando se reveló, se asignó un puntaje a los puntos que aparecieron: 4 si fue de mucha intensidad, 2 si es fue de baja intensidad y 1 si no ofreció señal (figura 12). Para cada suero se multiplicaron los valores de los 5 puntos obteniendo así un puntaje final.



Figura 12: Ejemplo de los puntajes asignados en función de la intensidad de los puntos.

2. Análisis bioinformático

2.1. Programas de procesamiento de datos experimentales

Para el análisis, procesado, gráfico y presentación de datos experimentales se emplearon los siguientes programas: Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Office Word 2007, Microsoft Office Power Point 2007, OriginLab 9.0, Paint 6.1, Medcalc 12.3, Corel Graphics Suite 11, GraphPad Prism 6, ProtParam (Gasteiger y col., 2005; <http://web.expasy.org/protparam/>) y Translate (<http://web.expasy.org/translate/>). También se emplearon otros programas específicos que se mencionarán a continuación cuando se detallen sus aplicaciones.

2.1.1. Parámetros de evaluación

La capacidad de los ensayos de diagnóstico evaluados en este trabajo depende de un valor umbral a partir del cual se clasifica un suero como perteneciente a un grupo o a otro. Considerando que este valor puede definirse por diferentes criterios, para evaluar los ensayos se utilizó un procedimiento independiente de esta línea de corte: construcción de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic; Metz, 1978) para cada clase de ensayo y comparación de sus áreas bajo las curvas.

Para construir una curva ROC de un ensayo se requiere definir sensibilidad y especificidad de la técnica (Metz, 1978). Para lo cual se utilizaron las siguientes definiciones:

Verdaderos positivos: número de sueros que la técnica detectó como positivos cuando fueron realmente positivos.

Falsos positivos: número de sueros que la técnica detectó como positivos cuando fueron realmente negativos.

Verdaderos negativos: número de sueros que la técnica detectó como negativos cuando fueron realmente negativos.

Falsos negativos: número de sueros que la técnica detectó como negativos cuando fueron realmente positivos.

En función de esto, se definieron sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) según:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{N^{\circ}\text{verdaderos positivos}}{N^{\circ}\text{verdaderos positivos} + N^{\circ}\text{falsos negativos}} \cdot 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{N^{\circ} \text{verdaderos negativos}}{N^{\circ} \text{verdaderos negativos} + N^{\circ} \text{falsos positivos}} \cdot 100$$

$$\text{VPP} = \frac{N^{\circ} \text{verdaderos positivos}}{N^{\circ} \text{verdaderos positivos} + N^{\circ} \text{falsos positivos}} \cdot 100$$

$$\text{VPN} = \frac{N^{\circ} \text{verdaderos negativos}}{N^{\circ} \text{verdaderos negativos} + N^{\circ} \text{falsos negativos}} \cdot 100$$

Para que la técnica pueda ofrecer verdaderos y falsos tanto positivos como negativos se necesita definir un valor umbral para clasificar como positiva o negativa cada muestra. Por lo tanto hay tantos valores de sensibilidad y especificidad como valores umbrales puedan definirse. La curva ROC se construye graficando en ejes cartesianos ortogonales todos los valores de sensibilidad y especificidad que presentan un grupo de muestras ensayadas con la misma técnica, a medida que la línea de corte se va moviendo desde 0 hasta el máximo posible. Se grafica "sensibilidad" en el eje de las ordenadas y "100 - especificidad" en el eje de las abscisas. El área bajo esta curva indica la probabilidad de acierto de diagnóstico de la técnica. Cuando ésta es "1" la técnica tiene 100 % de eficiencia (100 % de sensibilidad y 100 % de especificidad). Cuando ésta es "0,5" la técnica ofrece un 50 % de éxito clasificando las muestras, de igual manera que una clasificación azarosa (Metz, 1978). Los ensayos se pueden definir según sus áreas bajo las curvas como: test *malo* (0,5 - 0,6), test *débil* (0,6 - 0,7), test *aceptable* (0,7 - 0,8), test *bueno* (0,8 - 0,9) y test *excelente* (0,9 - 1) (Tape, 2013).

Las curvas ROC y sus áreas fueron construidas empleando el programa Medcalc 12.3. el cual, además, arrojó el valor umbral óptimo. A partir de éste, se calculó una única sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de cada técnica.

Las áreas bajo las curvas ROC se emplearon para comparar los ensayos entre sí de este proyecto. En efecto, prácticamente ningún autor empleó curvas ROC para evaluar sus ensayos. Por lo tanto, para comparar sus resultados con los obtenidos en este trabajo, se emplearon los valores de sensibilidad y especificidad presentados en la tabla 1. Esos valores dependieron del umbral definido por cada autor, el cual si fuera superior disminuiría la sensibilidad y aumentaría la especificidad, y al contrario si fuera inferior. Por lo tanto, para comparar los resultados se observó la sumatoria de la sensibilidad y especificidad de cada ensayo. Este análisis cuantitativo fue interno y no será mostrado.

2.1.1.1. Análisis estadístico: Mediante el GraphPad Prism 6 se calcularon los intervalos de confianza para las D.O. promedio de cada grupo de sueros y para las áreas bajo las curvas

ROC, con una confianza del 90 %. Cuando los intervalos no se superponen, hay significancia estadística de que esos parámetros (D.O. promedio y áreas bajo las curvas) son diferentes con una confianza del 90 %.

2.1.2. Estudio de secuencias

Para alinear secuencias entre sí o con las provenientes de bases de datos del NCBI se empleó el programa Blast (Altschul y col., 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las secuencias aminoacídicas de P22, P30 y P35 fueron analizadas mediante programas de búsqueda de patrones o dominios característicos:

- Pfam (Punta y col., 2012; <http://pfam.sanger.ac.uk/>): se buscó dominios similares a los denominados familias del Pfam en sus 2 bases de datos, Pfam A y Pfam B.

- SMART (Letunic y col., 2012; http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1). Se lo empleó en lo que denomina "Modo Normal" (que es para análisis de proteínas) para encontrar péptidos señales, regiones repetitivas internas y regiones desordenadas intrínsecas.

- FPsCan (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.htm91>): fue utilizado sin modificar los patrones de búsqueda definidos por defecto.

- InterProScan (Hunter y col., 2009; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>): Se buscó patrones en todas las bases de datos de dominios que ofrece.

- PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>): Se empleó sus herramientas para predicción de estructura secundaria (PSIPRED v3.0) y predicción de topología transmembrana (MEMSAT3 y MEMSAT-SVM).

Se adoptó como cierto un dominio al ser predicho por varios programas simultáneamente.

2.2. Modelado molecular

2.2.1. Búsqueda de patrones

Para la búsqueda de estructuras molde con porcentajes de identidad superiores al 25 % se emplearon los programas online Swiss-Model Workspace-Template Identification (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_targetidentification1) y Standard Protein BLAST (Altschul y col., 1990; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome); para encontrar estructuras resueltas por Difracción de Rayos X y NMR, respectivamente. Cuando no se

encontraron estructuras patrón mediante esos programas, se empleó el programa online PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) para encontrar moldes mediante threading, utilizando sus aplicaciones denominadas pGenThreader y pDomThreader.

2.2.2. Generación de la estructura

Se empleó el programa Modeller9v3 (Eswar y col., 2006) para generar 5 estructuras tridimensionales resultado, a partir de cada alineamiento diferente de las estructuras patrón. También se empleó el servidor online de modelado automático I-TASSER (Zhang, 2008; <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para generar cinco modelos más. En este último caso nunca se cargaron proteínas patrón ni se definieron restricciones estructurales.

2.2.3. Evaluación y refinado del modelo

Los modelos se visualizaron mediante el programa VMD (Humphrey y col., 1996) y la calidad de cada uno se analizó mediante 2 programas online:

ANOLEA (Melo y Feytmans, 1997; <http://protein.bio.puc.cl/anolea/>): calcula un valor Z de energía normalizada promedio de toda la estructura. Mientras menor sea el valor, mejor es la estructura obtenida. Comparando estos valores Z, se puede evaluar diferentes modelos.

Verify3D (Lüthy y col., 1992; http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/): desarrolla un gráfico de energía relativa en función de la posición espacial de cada AA. Mientras mayor sea, es mejor la posición de ese AA en la estructura de la proteína. Comparando las gráficas de diferentes modelos, para una misma región se puede observar cual posee mayor energía y cuál es la más probable.

De la mejor estructura obtenida se corrigió el alineamiento y estructura mediante el programa Swiss-PDB Viewer 4.10 (Guex y Peitsch, 1997). Los loops se ajustaron mediante el programa online LOBO (Tosatto y col., 2002; <http://protein.bio.unipd.it/lobo/>). También se empleó el programa UCSF Chimera 1.6.2 (Pettersen y col., 2004) para realizar minimizaciones de energía de entre 50 y 150 pasos antes y después de ajustar los loops. La estructura final fue evaluada también analizando su mapa de Ramachandran generado mediante el programa de red Rampage (Lovell y col., 2002; <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

2.2.3.1. Mapa de Ramachandran: La cadena de carbonos α ($C\alpha$) de una proteína posee 3 ángulos diedros diferentes por cada AA (excepto el del extremo carboxi-terminal). Los ángulos se miden entre los enlaces químicos de los átomos de N- $C\alpha$, $C\alpha$ -Cc (átomo de carbono del grupo carboxilo de la proteína) y Cc-N. Estos 3 enlaces siempre se encuentran en este orden en una cadena polipeptídica y repetidos tanta cantidad de veces como AAs tiene la cadena (excepto el Cc-N, que es uno menos). El ángulo diedro es el que forman los 2 enlaces no contiguos, tomando

como eje el enlace intermedio (figura 13). Todos los AAs de una cadena peptídica tienen 3 ángulos diedros. Uno de ellos, el N-C α , que es el compartido entre cada par de AAs diferentes y contiguos tiene un ángulo diedro fijo de 180° para 19 de los 20 AAs (la prolina queda exceptuada). Los otros dos ángulos tampoco pueden adoptar cualquier valor dentro de una proteína, sino que tienen un rango de ángulos comunes. Cuando el eje del ángulo es el enlace N-C α se denomina ψ y cuando es el enlace C α -C, ϕ . Se pueden

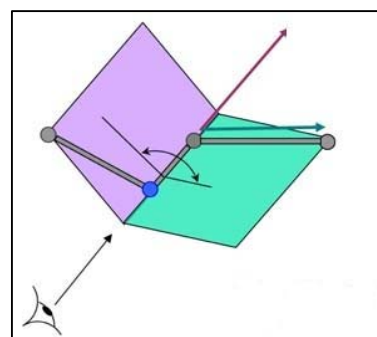


Figura 13: esquema de un ángulo diedro donde el eje del ángulo es el enlace N-C α (el N es la esfera azul) (Burkowski, 2008).

representar en ejes cartesianos ortogonales, ϕ en el eje de abscisas ψ en el eje de ordenadas, resultando para cada AA un punto. Realizando este procedimiento para todos los AAs de una proteína, se tendrá un mapa de puntos, llamado mapa de Ramachandran. Se conocen cuáles son las zonas más probables donde deben caer los AAs de las estructuras de proteínas. Si en un modelo muchos AAs caen fuera de estas zonas probables es porque hay muchos errores en la conformación de la estructura y hay que rehacerla (Ramachandran y col., 1963).

2.2.4. Evaluación de las regiones expuestas sobre la superficie

Se empleó el programa Swiss-PDB Viewer 4.10 (Guex y Peitsch, 1997) para predecir las regiones de las estructuras primarias de las proteínas que se expusieron sobre las superficies en los modelos tridimensionales predichos. El programa considera que son aquellos AAs que tienen un área superficial igual o mayor al 30 % expuesta sobre la superficie de la proteína (Guex y Peitsch, 1997). A este grupo de AAs, se les agregaron aquellos que tenían una superficie expuesta menor que 30 % y que no pertenecieron a una secuencia lineal de 4 AAs contiguos o más en las mismas condiciones. La razón de ello se debió a que Rubinstein y col. encontraron que segmentos de hasta 3 AAs pueden estar dentro de un segmento de la estructura primaria en un epítopo conformacional y no participar de la interacción con el Ac (Rubinstein y col., 2008), por lo que no necesitarían estar expuestos en la superficie. Como el motivo de detectar los AAs expuestos sobre la superficie fue para poder o no considerarlos pertenecientes a epítopes, también se incluyeron estos AAs "no superficiales".

2.3. Evaluación de los programas predictores de epítopes lineales

2.3.1. Programas evaluados

Para predecir epitopes lineales a partir de las secuencias de AAs de las proteínas se emplearon programas gratuitos y de uso desde internet. A menos que se indique lo contrario se los empleó con sus parámetros por defecto (que son los óptimos recomendados por los autores). Los programas empleados fueron:

- AAPPred (Davydov y Tonevitsky, 2009; <http://www.bioinf.ru/aappred/>): Se empleó el algoritmo SVM1 del programa.
- ABCpred (Saha y Raghava, 2006; <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>): Se configuró el programa para que los resultados sean epitopes de 20 AAs de largo.
- BCEpred (Saha y Raghava, 2004; <http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>): se utilizó el programa de manera que diera resultados consenso del empleo de todas las escalas de propensión al mismo tiempo.
- Bepipred (Jens y col., 2006; <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>).
- Antigenic (Kolaskar y Tongaonkar, 1990; http://bioinfo.bgu.ac.il/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=antigenic).

2.3.2. Proteínas analizadas

Proteína (*)	Código de secuencia en NCBI	Extensión (AAs)	Número de epitopes experimentales
MPV70 (A)	NP_217391	193	2
MSP-1 (A)	BAF62280.1	1693	3
Exotoxina A (A)	NP_249839	638	8
GAG1 (A)	P20873	504	10
Gp160 (A)	NP_057856	856	13
Pr55 (B)	NP_579876	132	2
Rev (B)	NP_057854	116	4
VP1 (C)	ABC87248	781	12
Gliadina (D)	A27319	296	3
Proteína N (E)	AAP13445	422	6
Proteasa (B)	CAB66012	99	2

Tabla 5: cantidad de epitopes experimentales, extensiones y códigos de acceso a sus secuencias en la NCBI de las proteínas empleadas para evaluar los predictores. La información fue extraída de (*): A: BciPep, B: HIV database; C: Kaikkonen y col., 1999; D: Osman y col., 2000 o E: He y col., 2004.

Se seleccionaron once proteínas con un total de 65 epitopes lineales contra Acs, a partir de datos publicados (He y col., 2004; Kaikkonen y col., 1999; Osman y col., 2000) y las bases de datos online BciPep (Saha y col., 2005; <http://bioinformatics.uams.edu/mirror/bcipep/>) y HIV database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). Todos los epitopes fueron determinados detalladamente mediante la técnica experimental ELIspot y/o mediante el empleo de múltiples Ac monoclonales, procedimientos con alta eficiencia para encontrar epitopes lineales. Excepto la MPV70, todos estos antígenos generan una respuesta de Acs en el ser Humano y para todos se pudo definir con precisión las mínimas secuencias de AAs responsables del reconocimiento de Acs. Además, ninguna de las proteínas participa en una respuesta autoinmune. En la tabla 5 se detallan estas proteínas junto con sus números de epitopes experimentales, extensiones y códigos de acceso a sus secuencias en NCBI.

2.3.3. Selección de epitopes de los programas de predicción

El número de epitopes o de regiones antigénicas que los programas arrojan dependen del *puntaje antigénico* umbral que el usuario defina. Todos están configurados con un *puntaje antigénico* umbral óptimo por defecto, pero con ellos, los resultados con varias proteínas, mostraban toda la extensión de sus secuencias como antigénicas. Por ello, se seleccionaron individualmente los *puntajes antigénicos* umbral de cada programa que ofrezcan un número de epitopes por proteína similar al observado experimentalmente, esto es, un epitope cada 60 AAs de longitud de proteína aproximadamente.

Cada programa ofreció determinantes antigénicos de diferentes longitudes, desde uno hasta treinta AAs. El largo mínimo que debe tener una secuencia para ser reconocida por los anticuerpos es un tema que todavía está en discusión (Morris, 2008; Davidson y Watts, 1989; Moutsopoulos y col., 2000). Se conocen epitopes de unos pocos AAs de longitud como también de hasta 20 o más. Se tomó solamente aquellos epitopes predichos que tuvieron como mínimo 6 AAs de largo, porque es una longitud mínima suficiente para que se una un Ac (Alvarez y col., 2001), coincidente además con el criterio adoptado por varios autores (Kolaskar y Tongaonkar, 1990; Karplus y Schulz, 1985; Emini y col., 1985; Sollner y Mayer, 2006).

Los programas normalmente indican epitopes separados y de extensión aceptable, pero cuando los mismos se superponían se los contó a todos como una sola región antigénica.

También se evaluó separadamente las secuencias de 6 o más AAs en las que varios programas las indicaban como antigénicas. Se las clasificó en dos grupos:

Consenso débil: Secuencias indicadas como altamente antigénicas (epitopes con alto *puntaje antigénico*) por 2 programas, o señaladas como antigénicas pero con bajo *puntaje antigénico* por 3 programas.

Consenso fuerte: Secuencias indicadas como antigénicas por mínimamente 3 programas y al menos uno de ellos las indicó con alto *puntaje antigénico*, o secuencias señaladas como antigénicas con bajo *puntaje antigénico* por mínimamente 4 programas.

Además, se comparó los programas y consensos con un método de selección de secuencias potencialmente antigénicas al azar en las proteínas. Para ello se calculó el largo promedio de los epitopes predichos del mejor programa empleado, AAPPred, y se dividió cada proteína en segmentos de igual longitud (epitopes al azar), observando cuantos acertaban a los epitopes reales.

2.3.4. Parámetro de comparación

Para comparar los programas entre sí se calculó su VPP, es decir cuántos de los epitopes predichos son verdaderos epitopes:

$$VPP = \frac{N^{\circ} \text{ de epitopes predichos por el programa coincidente con los reales}}{N^{\circ} \text{ de epitopes totales predichos por el preograma}}$$

siendo el “N° de epitopes predichos por el programa coincidentes con los reales”, el número de epitopes predichos por cada programa o método y coincidentes con 6 AAs mínimamente con los epitopes reales (epitopes hallados experimentalmente), y correspondiendo el “N° de epitopes totales predichos por el programa” a el número de todos los que se consideraron como resultados de los programas o de los métodos.

Se calculó un VPP por programa y proteína. Luego se promediaron los VPP obtenidos de todas las proteínas con cada uno de los programas.

2.3.4.1. Análisis estadístico: Se estimaron intervalos de confianza para los VPP promedio, para cada programa o método, con nivel de significancia del 90 %. Como el espacio muestral empleado siempre fue el mismo, para determinar si los VPP eran diferentes o no, se calcularon los intervalos de confianza para las diferencias de cada par de VPP hallado, teniendo en cuenta que los datos fueron pareados. El nivel de significancia también fue de 90 %. Cuando el intervalo de confianza para la diferencia de los VPP del par de programas no incluyó el valor 0, se consideró que los VPP de esos programas no eran equivalentes.

2.4. Predicción de epitopes

En función de nuestros resultados (ver Anexo A en la sección Resultados y Discusiones) se decidió evaluar los epitopes lineales de los antígenos P22, P30 y P35 con el programa AAPPred. Se consideraron sólo aquellos epitopes de una longitud mínima de 6 AAs.

Se empleó el programa online Discotope (Jens y col., 2012; <http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) para predecir epitopes estructurales en los antígenos P22, P30 y P35. Se utilizó su configuración por defecto.

Los análisis *in silico* siempre se trabajaron con las proteínas completas y no separadamente con las regiones expresadas. Naturalmente, el parásito expone la proteína entera y el sistema inmune de los individuos genera Acs contra toda la proteína. Nosotros evaluamos los sueros provenientes de ellos. Si un epitope lineal se encuentra poco expuesto en la superficie de la proteína, éste nunca generará Acs, pero eso sólo lo sabemos analizando los epitopes dentro de la estructura completa de la proteína.



Resultados y Discusiones

1. Evaluación del antígeno P22

1.1. Resultados experimentales

La proteína P22 madura no contiene las secuencias extremo carboxi terminal ni péptido señal que se encuentran en el polipéptido traducido primariamente. Particularmente, el extremo carboxi terminal es escindido en la maduración postraduccional de P22 antes de anclar la proteína al GPI (Tomavo y col., 1989). Ocurre un evento similar con la proteína P30; aunque para este antígeno en algunas cepas, se mantiene el extremo carboxi terminal unido a la membrana del parásito (Kato y col., 2007). La presencia de este péptido en la estructura del microorganismo infectante indica que la misma está disponible en el curso de la infección para ser reconocida por el sistema inmune y en la práctica, en esta región de P30, se han encontrado numerosos epitopes (Kato y col., 2007; Maksimov y col., 2012; Siachoque y col., 2006; Cardona y col., 2009; Wang y col., 2013). Considerando la hipótesis de que lo mismo podría suceder en P22, se evaluaron experimentalmente 2 secuencias, una que está completa (P22L) y otra que carece de las regiones péptido señal y extremo carboxi terminal (P22c). En la figura 14 se muestra un esquema de las regiones aquí trabajadas sobre una secuencia nucleotídica de referencia (FJ825705 en el NCBI).

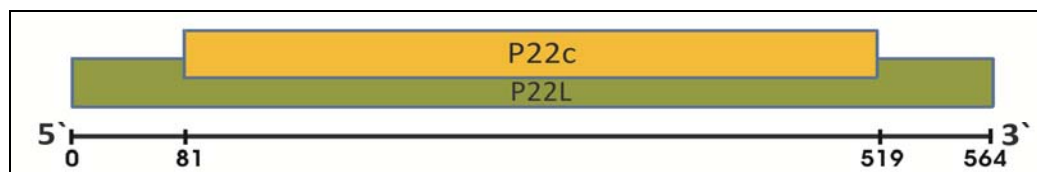


Figura 14: Esquema de las regiones de P22 obtenidas sobre una escala de pb referente a la secuencia de número de acceso FJ825705 en el NCBI.

1.1.1. Obtención de las secuencias de ADN

Se realizó la purificación de ADN genómico total de *T. gondii*, confirmando su éxito por la obtención de una única banda de intensidad fuerte en la electroforesis en gel de agarosa.

Los genes de P22c y P22L se obtuvieron amplificando por PCR a partir del ADN genómico del parásito. Estos se corrieron en electroforesis de geles de agarosa confirmando su presencia con la aparición de bandas del tamaño correspondiente a las de los genes (tabla 6). Por ejemplo, la figura 15 muestra la amplificación de P22c (calle derecha, flecha roja) que al

compararla con el MPM (calle izquierda) se corroboró el tamaño correcto. Si bien hubo amplificaciones inespecíficas, por sus concentraciones y tamaños se eliminaron fácilmente en el paso de purificación de ADN a partir del gel.

Antígeno	Extensión en pb	Extensión en AAs
P22c	438	146
P22L	561	186

Tabla 6: Extensión en pb y AAs de los Ags de P22 obtenidos

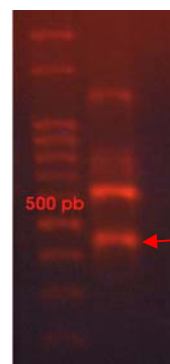


Figura 15: Gel de agarosa donde se observó la PCR de P22c (calle derecha) y un MPM (calle izquierda).

El gen de P22 sobre el que se trabajó en la cepa de *T. gondii* utilizada, coincidió 100 % con la secuencia de número de acceso FJ825705 en el NCBI, "ARNm del antígeno de superficie P22 (SAG2) de *Toxoplasma gondii*, cepa RH, secuencia codificante completa". La secuencia P22c es similar⁵ a la expresada por Li, Parmley y Hiszczyjska-Sawicka (Li y col., 2000a; Parmley y col., 1992, Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005). La secuencia de P22L es similar a la expresada por Lau y Fong (Lau y Fong, 2008).

1.1.2. Clonado e inducción de proteínas

Ambas secuencias nucleotídicas amplificadas por PCR se introdujeron mediante ligación enzimática en el vector de clonado T Easy Vector y luego las construcciones fueron introducidas en la cepa *E. coli* DH5 α mediante transformación. La figura 16 presenta, a modo de ejemplo, el resultado de una electroforesis en gel de agarosa con muestras del vector T Easy Vector con el gen de P22c insertado.

Las secuencias fueron cortadas del vector de clonado mediante enzimas de restricción y ligadas al vector de expresión pET-32a; plásmido diferente a los usados anteriormente por otros autores para expresar P22, quienes a su vez usaron diferentes vectores entre sí (Li y col., 2000a; Parmley y col., 1992; Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005; Lau y Fong, 2008; Béla y col., 2008; Prince y col., 1990).

Luego se introdujeron las construcciones en *E. coli* BL21 DE3. Finalmente, se indujeron las proteínas P22c y P22L utilizando 0,1 mM de IPTG durante toda la noche a 20 °C.

Las secuencias nucleotídicas finales introducidas en el vector de expresión se muestran a continuación:

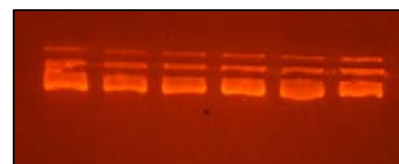


Figura 16: varias construcciones de vector T Easy Vector con el inserto P22c en un gel de agarosa.

⁵ De aquí en adelante, cuando se enuncie que una secuencia es similar a una empleada por otro autor, se referirá a que las posiciones donde comienzan y finalizan las secuencias difieren en no más de 10 pb. Se supuso que el polimorfismo entre las secuencias no es muy elevado. Este último punto no se estudiará con detalles en este trabajo porque escapa a los objetivos de la tesis.

P22c:

-----tc caccaccgag acgccagegc ccattgagtg cactgccggc gcaacgaaga ctgttgatgc accctccagt
 ggttccgttg tcttcaatg tggggataaa ctaacatca gtcccagtgg cgaaggtgat gtctttatg gcaaggaatg
 cacagactcg aggaagtga cgactgtcct tccaggtgcg gtcttgacag ctaaggtcca gcagcccgcg aaaggtcctg
 ctacctacac actgtcttac gacgttactc ccgagaaacc tcaggttctc tgttacaagt gcggtgccga agcaggtgct
 cccgctggtc gaaataatga tggttctagc gctccgacgc ctaaagactg caaactcatt gttcgcgttc cgggtgccga
 tggccgtgtc acatctgggt ttgacctgt gtctctcag ggcaag----

P22L:

atgagtttct caaagaccac gagcctagec tegctagegc tcacgggctt gtttgtgtg_ttcaagttcg ctcttgcgtc
 caccaccgag acgccagegc ccattgagtg cactgccggc gcaacgaaga ctgttgatgc accctccagt ggttccgttg
 tcttcaatg tggggataaa ctaacatca gtcccagtgg cgaaggtgat gtctttatg gcaaggaatg cacagactcg
 aggaagtga cgactgtcct tccaggtgcg gtcttgacag ctaaggtcca gcagcccgcg aaaggtcctg ctacctacac
 actgtcttac gacgttactc ccgagaaacc tcaggttctc tgttacaagt gcggtgccga agcaggtgct cccgctggtc
 gaaataatga tggttctagc gctccgacgc ctaaagactg caaactcatt gttcgcgttc cgggtgccga tggccgtgtc
 acatctgggt ttgacctgt gtctctcag ggcaag gttcttctcccgg tctcgcaggt ttgtgatca cgtttgta a-----

P22c tuvo una extensión polipeptídica de 335 AAs y una masa molar de 35,26 KDa, incluyendo las secuencias extras que se incorporaron por el sistema de clonado. En la figura 17 se observa un PAGE de proteínas obtenidas de células bacterianas que indujeron P22c (A) y un control negativo de proteínas de células que no la indujeron (B). La flecha roja señala la posición del Ag. Al observar el MPM se corroboró que el tamaño de la proteína correspondió al teórico. P22L tuvo una extensión polipeptídica de 351 AAs y una masa molar teórica de 36,68 KDa, cuando se consideran también las secuencias poli-peptídicas anexas del vector. En la figura 157 se muestran las proteínas de células que indujeron estos Ags, donde se observa como P22L corrió más retrasada que P22c, correspondiente a su mayor tamaño.

Las secuencias aminoacídicas que se expresaron se muestran a continuación. En color verde se detalla la secuencia correspondiente a la TrxA, en rojo la secuencia del Ag de interés y en amarillo la secuencia de poli-histidina. Se observa que en P22c, la secuencia polipeptídica que se expresó adjunta con el Ag fue de mayor extensión que para P22L. En ambos casos hubo una única secuencia de poli-histidina, ubicada en medio de las 2 proteínas (TrxA y Ag).

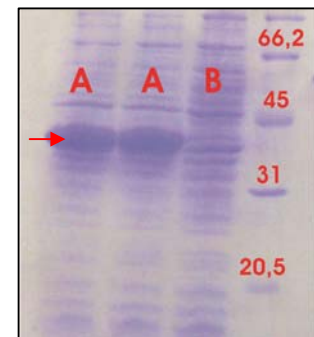


Figura 17: PAGE donde se observó bacterias que indujeron exitosamente P22c (A) y otras bacterias que no la indujeron, control negativo (B). En la última calle se corrió un MPM.

P22c:

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMI
 APILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFK
 NGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHHHHSSG
 LVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSST
 TETPAPIECTAGATKTVDAPSSGSVVFQCGDKLTISPSGEGDVF
 YGKECTDSRKLTTVLPGAVLTAKVQQPAKGPATYTLSYDGT
 P
 EKPQVLCYKCVAEAGAPAGRNDGSSAPTPKDCKLIVRVP
 GA
 DGRVTSGFDPVSLTGKEFELRRQACGRTRAPPPPLRSGC

P22L:

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMI
 APILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFK
 NGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHHHHSSG
 LVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSMS
 FSKTTSLASLALTGLFVVFKFALASTTETPAPIECTAGATKTVD
 APSSGSVVFQCGDKLTISPSGEGDVFYGGKECTDSRKLTTVLP
 G
 AVLTAKVQQPAKGPATYTLSYDGTPEKPQVLCYKCVAEAGAP
 AGRNDGSSAPTPKDCKLIVRVP
 GADGRVTSGFDPVSLTGKVL
 APGLAGLLITFV

Se realizó un PAGE del precipitado y del sobrenadante de las bacterias lisadas que indujeron las proteínas para observar en que fracción se encontraban los A_gs. Se observó que P22c es muy soluble permaneciendo mayoritariamente en la fracción del sobrenadante, mientras que P22L se encontró principalmente en el precipitado. Durante el proceso de solubilización de proteínas del pellet, se observaron los cuerpos de inclusión que formó P22L. Estos resultados concuerdan con los descriptos por Parmley y col., quienes afirmaron que el péptido señal y la región carboxi terminal son secuencias hidrofóbicas y vuelven a la proteína insoluble (Parmley y col., 1992). En dicho trabajo, si bien no se presentaron experimentos confirmatorios, se propuso que retirando sólo el péptido señal de la proteína, ésta no se plegaba correctamente volviéndose insoluble y poco inmunogénica. Por ello, también sacaron la región carboxi terminal afirmando que en esa situación, la proteína se plegaba correctamente, ya que la región determinante de la insolubilidad sería dicho extremo. Esto contradice lo informado por Prince y Béla, que trabajaron con secuencias que incluían la región carboxi terminal, pero no reportaron problemas de insolubilización de la proteína (Béla y col., 2008; Prince y col., 1990). En nuestro trabajo se

postuló que la diferencia de solubilidades por la inclusión del extremo carboxi terminal ocurrió por el empleo de proteínas de fusión, pero la información vuelve a ser contradictoria. Los vectores empleados por Parmley, Prince y Béla, fueron pGEX-2T, λ gt11 y pET28a, respectivamente (Parmley y col., 1992; Prince y col., 1990; Béla y col., 2008). De los tres plásmidos el único que incorpora una proteína de fusión reconocida por ayudar a la solubilización de proteínas es pGEX-2T, incorporando glutathion S-transferasa. El vector λ gt11, fusiona fracciones de β -galactosidasa, pero si bien esta proteína es común en ingeniería genética, no se han dado referencias de su utilidad para solubilizar proteínas, deduciéndose pues que no debió influir significativamente en la solubilidad de P22 (Terpe, 2006; Sørensen y Mortensen, 2005). El plásmido pET28a en cambio, no incorpora ninguna proteína de fusión. Por otro lado, Lau y Fong no informaron complicaciones empleando la proteína completa con ambas regiones hidrofóbicas, aunque ellos emplearon la levadura *Pichia. Pastoris* para la expresión del Ag, obteniendo la ventaja de que la proteína reciba glicosilaciones en la maduración postraduccional, como ocurre en *T. gondii* pero no en *E. coli* (Lau y Fong, 2008).

Si bien en el presente trabajo no se pudo corroborar que las regiones péptido señal o carboxi terminal en forma independiente vuelvan insoluble a P22, si pudimos comprobar que la combinación de ambas secuencias hidrofóbicas desencadenan la precipitación de P22 y formación de cuerpos de inclusión. Si se retiran estas 2 secuencias, 41 AAs en total (21,93 % de la secuencia de P22L y 11,68 % de toda la secuencia de P22 expresada en nuestro trabajo, incluyendo las secuencias que se le adjuntaron por el vector pET-32a), la proteína se vuelve soluble.

1.1.3. Purificación de los antígenos

Cada Ag debió purificarse mediante protocolos diferentes. P22c se expresó muy soluble, por lo que con el protocolo basal fue suficiente. En cambio, P22L precipitó formando cuerpos de inclusión, por lo que debió emplearse un protocolo diferente.

En la figura 18 se observa el resultado de un PAGE donde se corrió el producto de una purificación con P22c mediante el protocolo basal. La flecha roja señala la posición del Ag de interés. Se observó que todas las fracciones tuvieron una alta relación de concentraciones Ag/impurezas, excepto las fracciones 50-2⁶, 50-3 y 50-4. Todas las fracciones 100 y la 250-1 se re-purificaron para alcanzar la eficiencia deseada y detallada en el punto 1.2.3.2. de Materiales y Métodos.

⁶ El primer número indica la concentración en mM de imidazol de esa fracción y el segundo número el orden de elución.

En la figura 19 se observan los resultados de dos PAGE de las eluciones resultantes de una purificación de P22L mediante el protocolo alternativo (ver punto 1.2.3.3. en Materiales y Métodos). Las flechas rojas señalan la posición del Ag de interés. La

proteína se liberó en las eluciones de 50 y 100 mM de imidazol. Todas las fracciones se utilizaron tal como se obtuvieron, excepto 100-1 que se re-purificó en idénticas condiciones. En el PAGE de la muestra "S" (sobrenadante que se obtiene luego de la primera centrifugación para eliminar restos celulares sonicados y cuerpos de inclusión), se apreció que cierta cantidad de P22L se mantuvo soluble. Esta muestra también se purificó empleando el mismo protocolo que el utilizado cuando se obtienen cuerpos de inclusión, para que en todas las etapas la proteína se mantuviera soluble.

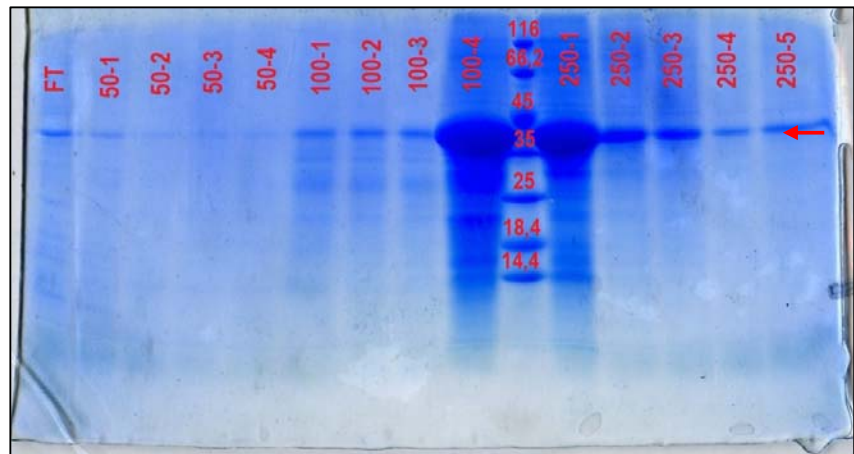


Figura 18: PAGE donde se observaron muestras resultado de la purificación de P22c. La flecha roja señala el Ag de interés. Entre las fracciones 100-4 y 250-1 se corrió un MPM.

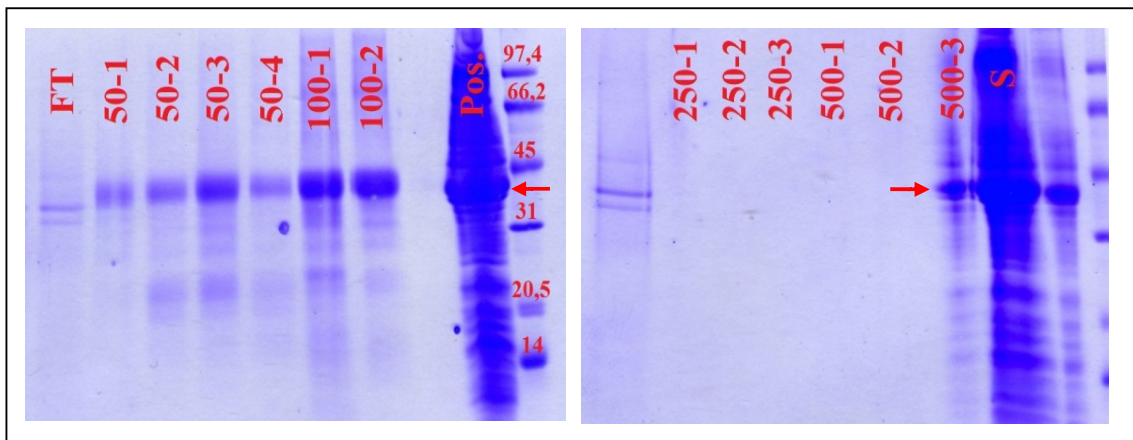


Figura 19: 2 PAGE donde se observan las eluciones resultados de la purificación de P22L. Las flechas rojas señalan la posición del Ag de interés. Donde "Pos." fue un control positivo del Ag y posición a la que corre, un lisado de células que indujeron exitosamente P22L; "FT": fue la solución que tuvo la proteína de interés, pero luego de ser pasado por la columna de purificación (no debiera tener nada del Ag de interés); y "S": fue el sobrenadante que se obtuvo luego de centrifugar al principio, eliminando restos celulares sonicados y cuerpos de inclusión.

En la figura 20 se muestra, a modo de ejemplo, un PAGE con las eluciones de P22L (las mismas muestras que del PAGE de la figura 19), al lado de una curva de albúmina que se empleó para cuantificar las muestras. Se determinó que sus

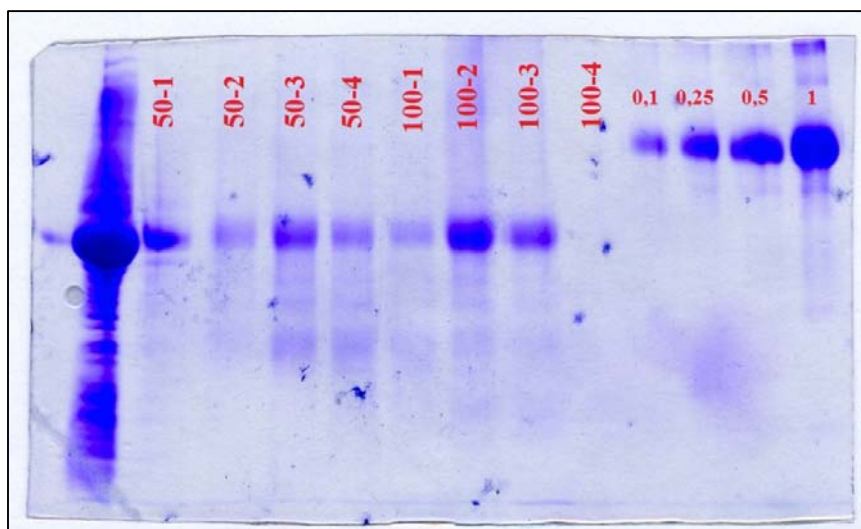


Figura 20: PAGE con eluciones resultado de la purificación de P22L al lado de una curva de albúmina. Los valores de la curva son en mg/mL.

concentraciones fueron: 0,2 mg/mL de 50-1; 0,08 mg/mL de 50-2; 0,15 mg/mL de 50-3; 0,08 mg/mL de 50-4; 0,06 mg/mL de 100-1; 0,5 mg/mL de 100-2 y 0,15 mg/mL de 100-3.

1.1.4. Evaluación de las diferentes secuencias de P22 mediante ELISAs

1.1.4.1. ELISA para detección de IgG

Se realizaron ELISAs indirectos para detección de anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii* empleando como antígenos P22c y P22L. Se ensayaron 56 SIA, 61 SIC y 61 SIN. Las D.O. promedios, los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 21 y 22, para P22c y P22L, respectivamente. Analizando sólo las D.O., se observó que P22c permitía una mejor discriminación entre los grupos de sueros porque los mismos tuvieron D.O. promedios diferentes, con significancia estadística. Extrañamente, con P22L la D.O. promedio de los SIN fue mayor que la de los SIC; aunque cuando se observó los intervalos de confianza (IC) de los 3 grupos no se pudo asegurar estadísticamente que tuvieron diferentes D.O. medias. Lau y Fong fueron los únicos que probaron una secuencia similar a P22L y obtuvieron también una mala discriminación entre SIA y SIC, inclusive obtuvieron mayores señales con el grupo de SIC que con el grupo de SIA, aunque sí tuvieron una buena discriminación entre SIP y SIN (Lau y Fong, 2008), contrariamente a lo obtenido en el presente trabajo. Comparando los Ags entre sí, P22L tuvo señales mayores que P22c con SIN y SIC, a la inversa que con el grupo de SIA, a pesar que las condiciones de los ensayo fueron las mismas para ambos Ags. Estos datos indican mayor inespecificidad empleando P22L.

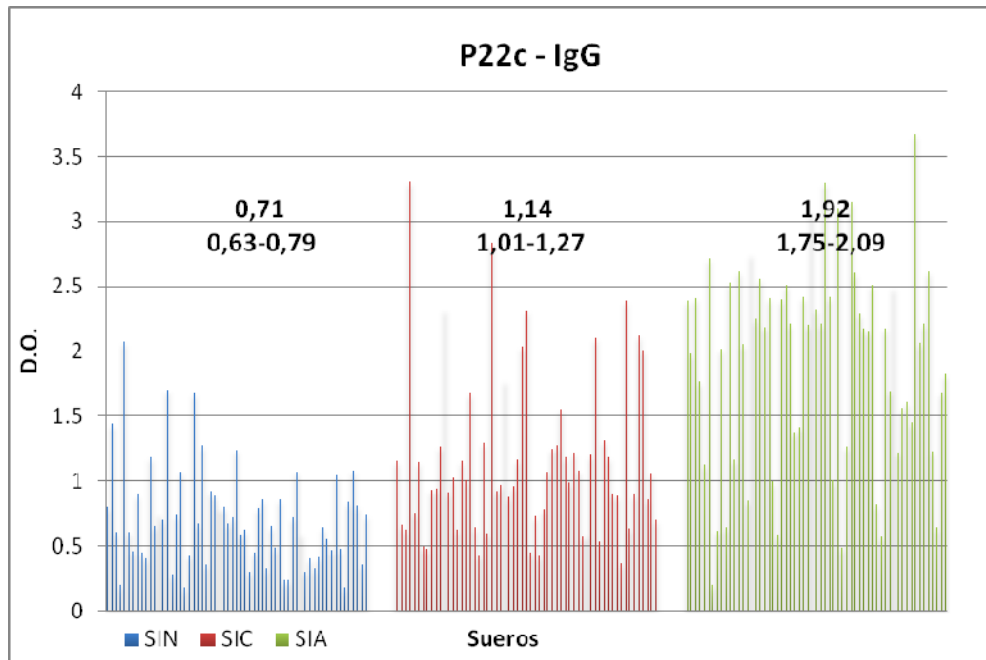


Figura 21: Se muestran D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto, detectando IgG específica y empleando el antígeno P22c. Arriba de cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza; correspondiendo a los grupos SIN, SIC y SIA las barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

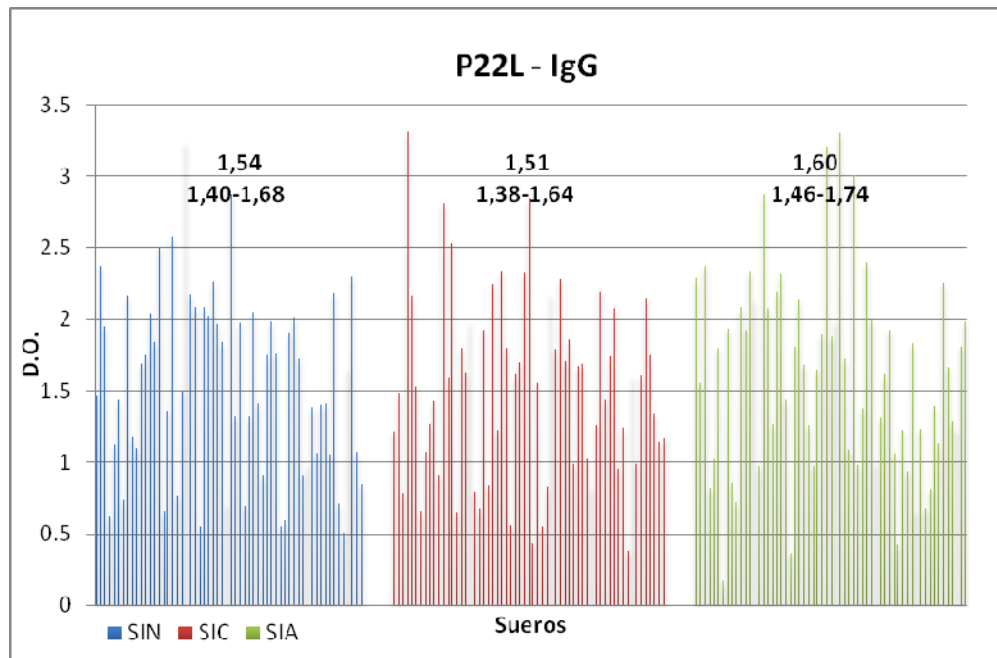


Figura 22: Se muestran D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto, detectando IgG específica y empleando el antígeno P22L. Arriba de cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza; correspondiendo a los grupos SIN, SIC y SIA las barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

Mediante desarrollo de curvas ROC, se evaluó la capacidad para discriminar "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 7 muestra diferentes parámetros de comparación para cada clase

de discriminación. El área bajo las curvas ROC (en letras rojas) fue el valor empleado principalmente para comparar los ensayos entre sí. P22c, siempre tuvo mayor valor que P22L. Además, se puede asegurar con un 90 % de confianza que las áreas bajo las curvas ROC entre los 2 Ags fueron diferentes (los IC entre los Ags nunca se superpusieron). P22L ofreció discriminaciones similares al azar, sus IC abarcaron el valor 0,5, con sensibilidades inferiores a 50 %. P22c generó mayor área media diferenciando "SIP de SIN" que "SIA de SIC", y su especificidad y VPN llegaron hasta 86,9 %. Según las valoraciones de Tape, empleando P22c la discriminación "SIA de SIC" fue *aceptable* y "SIP de SIN" fue *buena*; y empleando P22L el test siempre fue *malo* (Tape, 2013).

En función de los resultados de las dos primeras discriminaciones, se evaluó la diferenciación entre los grupos "SIAS contra SIC" (tabla 7) para P22c. Se recuerda que con el grupo SIAS se tuvo mayor seguridad de correspondencia a una infección reciente (ver punto 1.3.1.4. en Materiales y Métodos). Cuando se compararon los áreas bajo las curvas ROC de las diferenciaciones "SIA contra SIC" y "SIAS contra SIC", la primera fue mayor que la segunda, por lo que no se pudo afirmar que este ensayo permita mejor diagnóstico trabajando con sueros de fase aguda "más confiables".

Las figuras 23 y 25 muestran algunas curvas ROC obtenidas para P22c, y las figuras 24 y 26 para P22L, diferenciando "SIA de SIC" y "SIP de SIN", respectivamente. En dichas figuras puede apreciarse fácilmente la superioridad en capacidad de discriminación de P22c frente a P22L. En efecto, cuando la curva pasa por la diagonal del cuadrado, es porque el área bajo la curva es próxima a 0,5 y por ende su capacidad para diferenciar es azarosa, situación de P22L.

ELISA para IgG		Proteínas	
		P22c	P22L
SIA contra SIC	Valor umbral	1,30	1,80
	Sensibilidad	73,8	44,3
	Especificidad	80,3	72,1
	VPP	78,9	61,3
	VPN	80,3	72,0
	Área bajo la curva	0,778 0,701-0,85	0,545 0,459-0,631
SIP contra SIN	Valor umbral	1,30	1,80
	Sensibilidad	73,8	44,3
	Especificidad	86,9	66,9
	VPP	73,8	40,3
	VPN	86,9	70,4
	Área bajo la curva	0,82 0,769-0,871	0,502 0,427-0,578
SIAS contra SIC	Valor umbral	1,23	-
	Sensibilidad	72,7	-
	Especificidad	80,3	-
	VPP	57,1	-
	VPN	89,1	-
	Área bajo la curva	0,757 0,644-0,870	-

Tabla 7: Parámetros de discriminación entre los diferentes grupos mediante ELISA indirecto contra IgG específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indica primero el valor medio y abajo el IC del mismo con una confianza del 90 %.

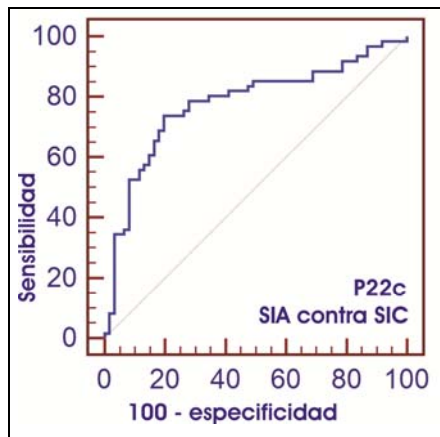


Figura 23: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P22c.

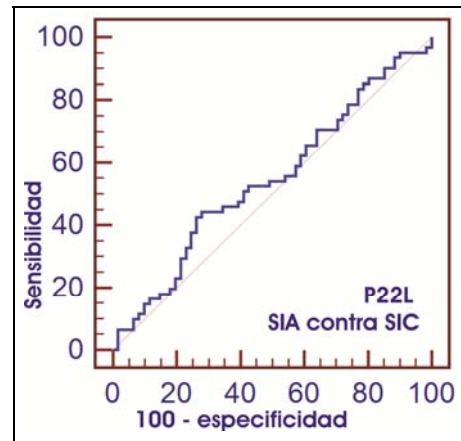


Figura 24: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P22L.

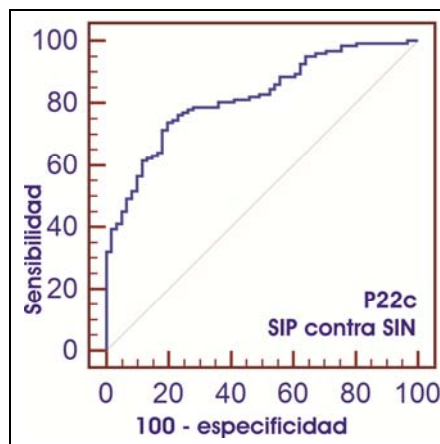


Figura 25: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P22c.

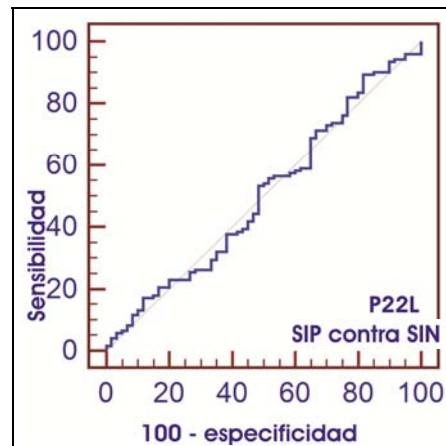


Figura 26: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P22L.

Se analizaron resultados de otros autores que detectaron anticuerpos específicos IgG con secuencias similares a P22c mediante ELISA indirecto o Western blot. Li y Parmley obtuvieron mejores resultados diferenciando SIA de SIC; alcanzando el primero sensibilidad y especificidad de 80 y 100 %, respectivamente (Li y col., 2000a); y el segundo 93,6 y 96,8 %, respectivamente (Parmley y col., 1992) (tabla 1). No obstante, en los trabajos mencionados los tamaños muestrales fueron inferiores a los que aquí utilizamos, hasta 10 SIA y 10 SIC en el trabajo de Li y col. (Li y col., 2000a; Parmley y col., 1992). Por otro lado, Hiszczyjska-Sawicka y col. obtuvieron resultados en los que no lograron diferenciar entre SIA y SIC, obteniendo 93,9 y 4,5 % de sensibilidad y especificidad respectivamente (Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005) (tabla 1). Similarmente, Lau y Fong obtuvieron 12,5 y 100 %, respectivamente, pero ensayando una secuencia similar a P22L (Lau y Fong, 2008).

Prince y Béla ensayaron 2 secuencias diferentes de P22 cada uno, detectando IgG mediante Western blot o ELISA indirecto respectivamente, pero abarcando regiones distintas a las del presente trabajo. Las discriminaciones que obtuvieron fueron inferiores a las aquí informadas, cuando se observan las sensibilidades y especificidades alcanzadas (ver tabla 1). No obstante, hay que resaltar que Prince y col. también emplearon bajo número de muestras, 7 SIA y 5 SIC. Además, ninguno logró cambios significativos cuando modificaron las extensiones de las secuencias. Pero a diferencia del presente trabajo, ellos no reportaron técnicas diferenciales para la obtención de Ags solubles. Béla y col. inclusive detectaron separadamente anticuerpos IgG totales e IgG1, pero tampoco obtuvieron cambios significativos en las discriminaciones (Prince y col., 1990; Béla y col., 2008).

1.1.4.2. ELISA para detección de IgA

Dada la utilidad de los anticuerpos IgA específicos para discriminar infecciones agudas de crónicas según se mencionó previamente, los antígenos P22c y P22L se evaluaron por ELISA indirecto para detección de este isotipo específico de inmunoglobulina contra *T. gondii*. Se ensayaron 61 SIA, 54 SIC y 69 SIN. Las D.O. promedio, los intervalos de las D.O. promedio, evaluados con 90 % de confianza, y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 27 y 28, para P22c y P22L, respectivamente. Observando los IC de las D.O. se apreció que las señales de los 3 grupos empleando P22L son similares y, además, estadísticamente no se pudo demostrar que fueran diferentes. A su vez, las D.O. medias de estos grupos dieron en un orden creciente inverso a lo esperado (D.O.: SIN > SIC > SIA). No obstante, P22c presentó una diferencia de señal media entre SIA y SIC con significancia estadística, pero no se pudo afirmar lo mismo entre SIC y SIN. Igualmente, se pudo asegurar con 90 % de confianza que las D.O. de todos los grupos empleando P22L fueron mayores que empleando P22c, lo cual confirma reacciones inespecíficas cuando se utiliza P22L.

Por medio de las curvas ROC, se evaluó la capacidad para discriminar "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 8 muestra los parámetros de comparación para cada clase de discriminación. Otra vez, se pudo afirmar con significancia estadística que P22c siempre tuvo valores promedio de áreas bajo las curvas ROC diferentes y superiores que la proteína completa. P22L volvió a ofrecer discriminaciones similares al azar, sus IC para las áreas bajo las curvas ROC abarcaron el valor 0,5, y sus valores de VPP y VPN en "SIA de SIC" fueron cercanos a 50%.

Considerando que sólo P22c demostró diferenciar entre los grupos estudiados, se calculó sólo con este Ag la capacidad de discriminación "SIAS contra SIC" (tabla 8). No obstante, no se obtuvieron mejores discriminaciones. Al emplear sueros de los cuales se tuvo mayor seguridad

de que pertenecían a pacientes con infección aguda, el ensayo tuvo menor valor del área media bajo la curva ROC.

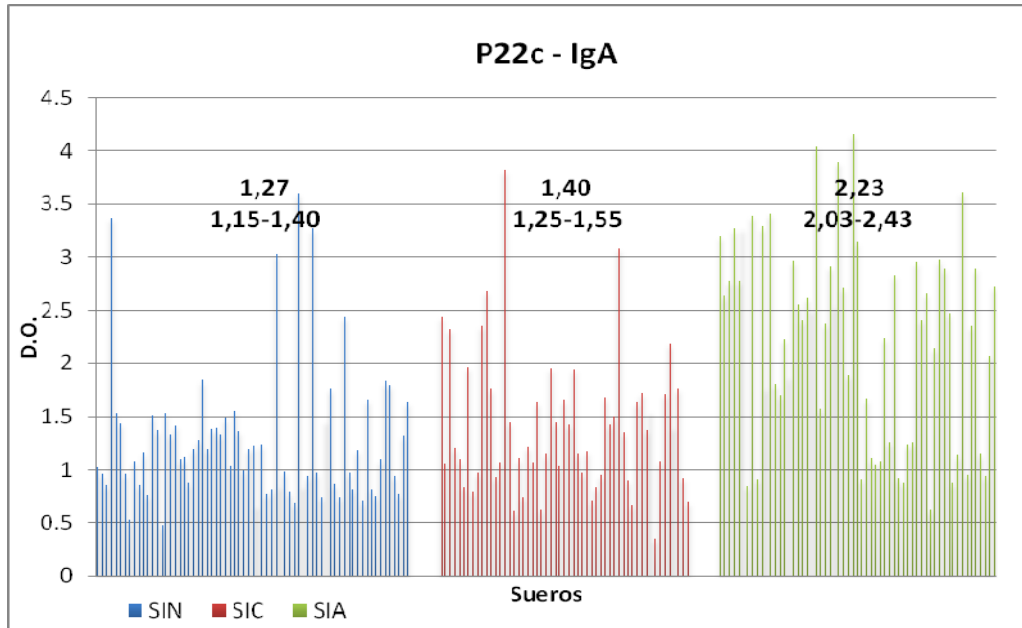


Figura 27: Se muestran D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto, detectando IgA específica y empleando el antígeno P22c. Arriba de cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza; correspondiendo a los grupos SIN, SIC y SIA las barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

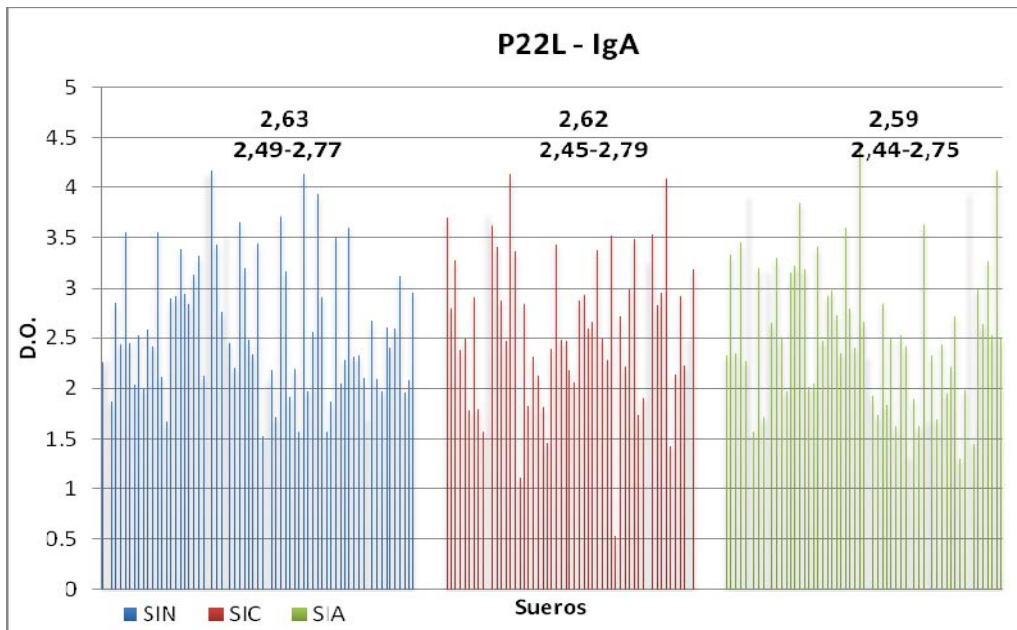


Figura 28: Se muestran D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto, detectando IgA específica y empleando el antígeno P22L. Arriba de cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza; correspondiendo a los grupos SIN, SIC y SIA las barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

Desafortunadamente, los IC para todas las discriminaciones empleando el antígeno P22c se superpusieron, por lo que no se pudo asegurar que sean diferentes. Sin embargo, los IC de los ensayos "SIA contra SIC" y "SIP contra SIN" no incluyeron el valor 0,5 por lo que se pudo afirmar con una confianza del 90 % que fueron superiores a una diferenciación al azar.

En este trabajo se obtuvieron 67,21 y 81,82 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente, con P22c discriminando "SIA de SIC"; que corresponde a un área bajo la curva ROC que define al test como *aceptable* según Tape (Tape, 2013).

En las figuras 29 y 31 se muestran curvas ROC utilizando P22c, y en las figuras 30 y 32 empleando P22L; diferenciando "SIA de SIC" y "SIP de SIN", respectivamente.

Nuevamente, es posible apreciar fácilmente que P22L no permitió diferenciación entre los grupos.

ELISA para IgA		Proteínas	
		P22c	P22L
SIA contra SIC	Valor umbral	1,77	2,71
	Sensibilidad	67,21	62,3
	Especificidad	81,82	47,3
	VPP	80,37	56,7
	VPN	69,21	53,1
	Área bajo la curva	0,751 0,675-0,827	0,528 0,439-0,617
SIP contra SIN	Valor umbral	1,56	1,84
	Sensibilidad	54,3	81,9
	Especificidad	84,1	8,7
	VPP	85,1	60,1
	VPN	52,1	22,2
	Área bajo la curva	0,688 0,624-0,753	0,502 0,430-0,574
SIAS contra SIC	Valor umbral	1,04	-
	Sensibilidad	50	-
	Especificidad	87,3	-
	VPP	63,2	-
	VPN	80	-
	Área bajo la curva	0,648 0,525-0,771	-

Tabla 8: Parámetros de la discriminación entre los diferentes grupos mediante el ELISA indirecto contra IgA específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indica primero el valor medio y abajo el IC del mismo con una confianza del 90 %.

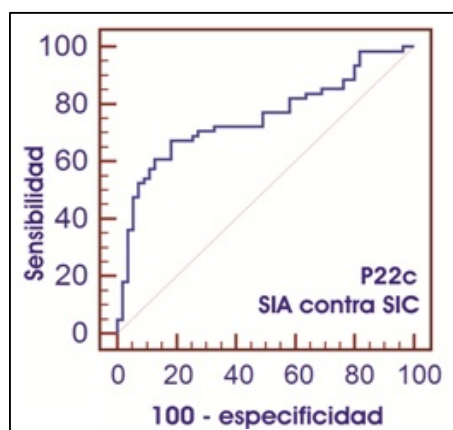


Figura 29: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P22c.

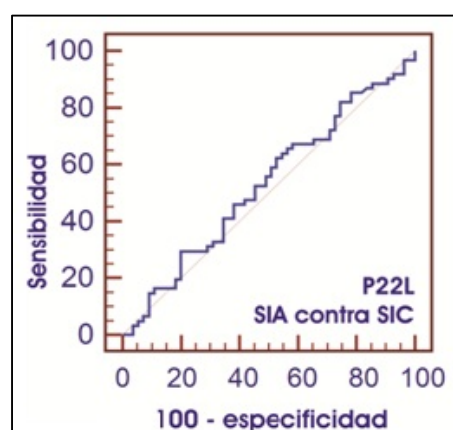


Figura 30: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P22L.

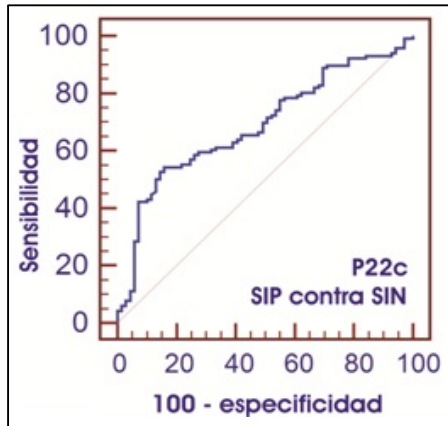


Figura 31: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P22c.

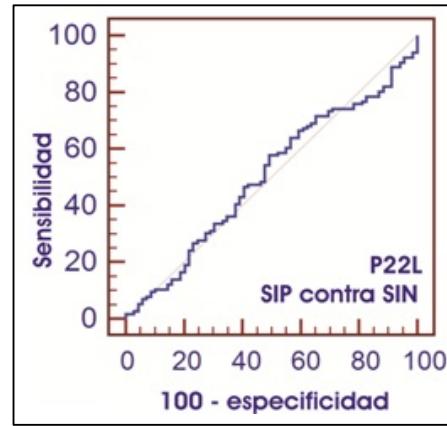


Figura 32: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P22L.

Parmley y col. ensayaron con una secuencia similar a P22c la detección de IgA para diferenciar entre las fases de la infección mediante ELISA indirecto y Western blot, pero no obtuvieron buenos resultados (Parmley y col., 1992). Fueron los únicos autores que probaron este isotipo contra P22 para detectar la fase aguda de toxoplasmosis y obtuvieron 15,4 y 100 %, de sensibilidad y especificidad respectivamente mediante ELISA (Parmley y col., 1992).

1.1.4.3. ELISA para detección de IgM

Finalmente, se realizaron ELISAs indirectos para detección de anticuerpos isotipo IgM específicos contra *T. gondii* empleando como antígenos P22c y P22L. Se ensayaron 44 SIA, 44 SIC y 60 SIN. Las D.O. promedios, los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 33 y 34, para P22c y P22L, respectivamente. En P22c, la D.O. media del grupo SIN fue mayor que la del grupo SIC. Con P22L el orden de las D.O. promedios otra vez resultó al revés de lo esperado. Además sus D.O. medias fueron mayores que con la P22c, con significancia estadística. Finalmente, al observar los IC, no se pudo asegurar que las D.O. de los 3 grupos fueran diferentes para cada Ag.

Mediante la construcción de curvas ROC, se evaluó la capacidad de las proteínas para discriminar entre "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 9 muestra los parámetros de comparación obtenidos para cada clase de discriminación. Los IC de las áreas bajo las curvas ROC para las 4 clases de ensayos se superpusieron, por lo que no se pudo afirmar que fueron diferentes. Observando únicamente el valor medio, el que mayor área obtuvo fue P22c en la diferenciación "SIA contra SIC". Además, fue la única discriminación cuyos valores predictivos (VPP y VPN) dieron iguales o superiores al 60 %.

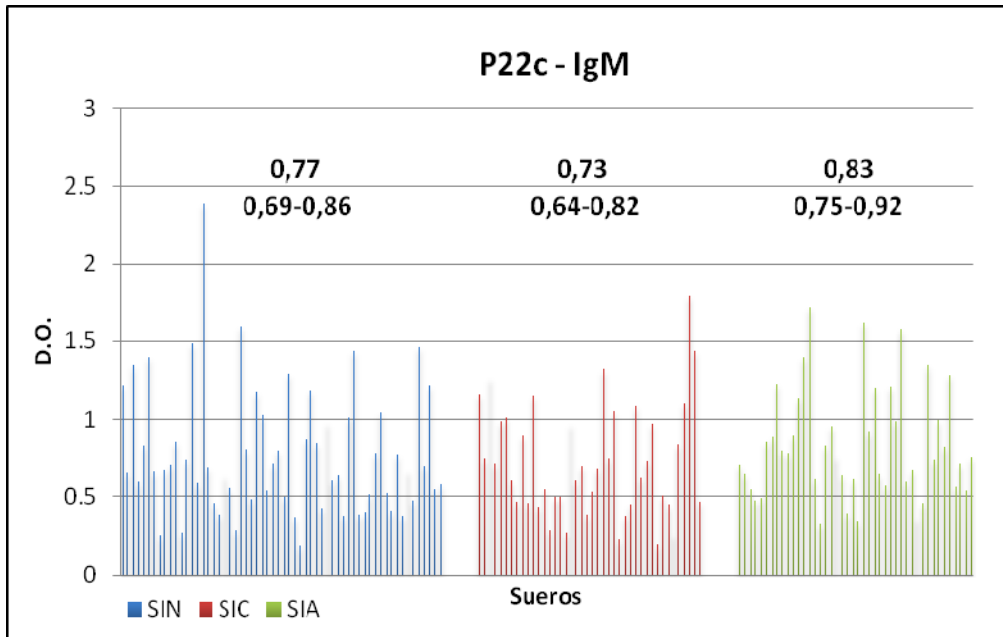


Figura 33: Se muestran D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto, detectando IgM específica y empleando el antígeno P22c. Arriba de cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza; correspondiendo a los grupos SIN, SIC y SIA las barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

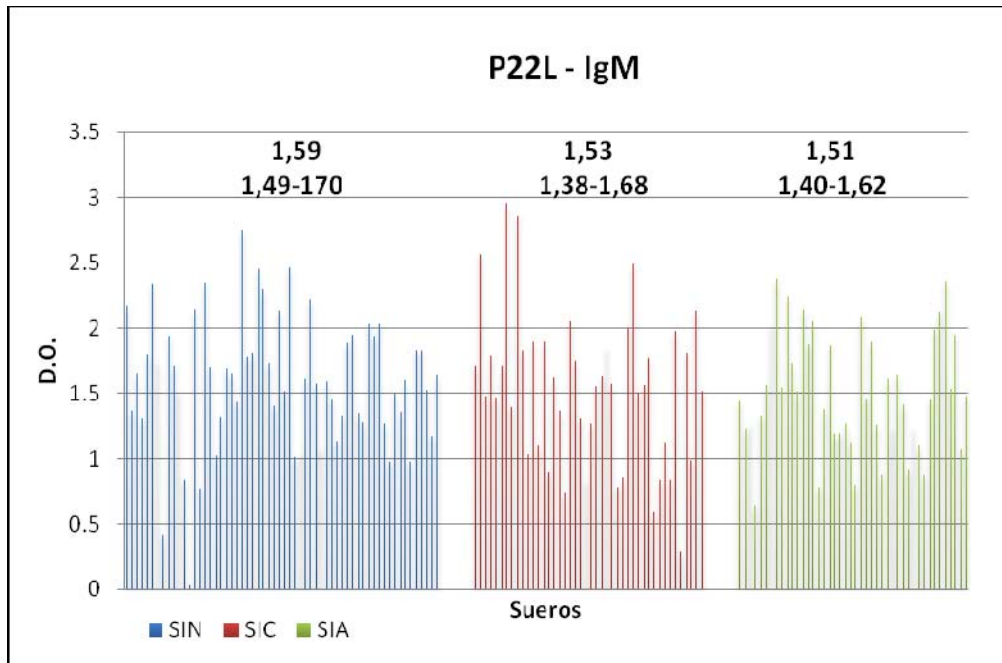


Figura 34: Se muestran D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto detectando IgM específica, empleando el antígeno P22L. Arriba de cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza; correspondiendo a los grupos SIN, SIC y SIA las barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

Los únicos que evaluaron P22 contra IgM para diferenciar la fase aguda de la fase crónica fueron Lau y Parmley, quienes probaron secuencias similares a P22L y P22c, respectivamente.

Los resultados de Lau y Fong se corresponden con los obtenidos en este trabajo (Lau y Fong, 2008). Parmley y col. desarrollaron ensayos ELISA indirecto y western blot. Los primeros mostraron similitudes con los aquí obtenidos, 46,2 y 100 % de sensibilidad y especificidad respectivamente, mientras que los western blots evidenciaron mejores valores, 60 y 100 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente. No obstante, esta diferencia podría deberse a la distinta cantidad de sueros analizados en cada situación, más que a las técnicas en sí. Efectivamente, se ensayaron 5 SIA y 5 SIC por western blot; y 13 SIA y 13 SIC por ELISA (Parmley y col., 1992).

Las curvas ROC se muestran en las figuras 35 y 37 para P22c y en las figuras 36 y 38 para P22L, para discriminar entre "SIA de SIC" y "SIP de SIN", respectivamente. Al igual que en el caso anterior, es posible observar que la detección de IgM con P22 mediante ELISA indirecto es similar al azar.

ELISA para IgM		Proteínas	
		P22c	P22L
SIA contra SIC	Valor umbral	0,55	1,47
	Sensibilidad	81,8	52,3
	Especificidad	42,9	61,4
	VPP	60,0	57,5
	VPN	69,2	56,3
	Área bajo la curva	0,597 0,495-0,699	0,512 0,409-0,615
SIP contra SIN	Valor umbral	0,70	1,58
	Sensibilidad	53,5	59,1
	Especificidad	55,0	55
	VPP	63,0	65,8
	VPN	45,2	47,8
	Área bajo la curva	0,521 0,441-0,602	0,554 0,476-0,633

Tabla 9: Parámetros de la discriminación entre los diferentes grupos mediante el ELISA indirecto contra IgM específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indica primero el valor medio y abajo el IC del mismo con una confianza del 90 %.

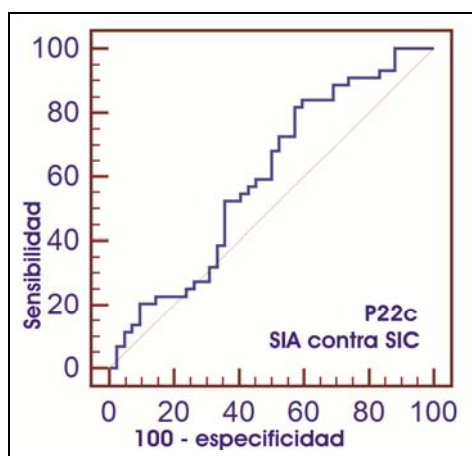


Figura 35: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgM y empleando P22c.

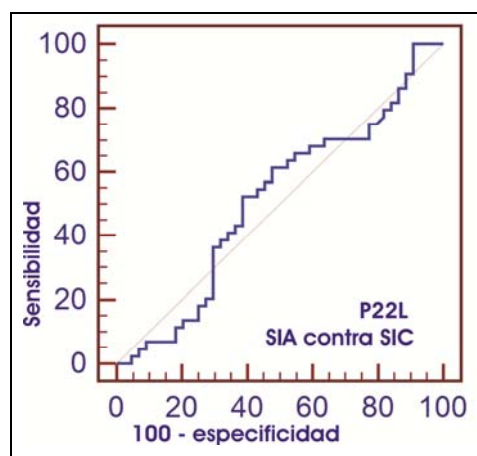


Figura 36: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgM y empleando P22L.

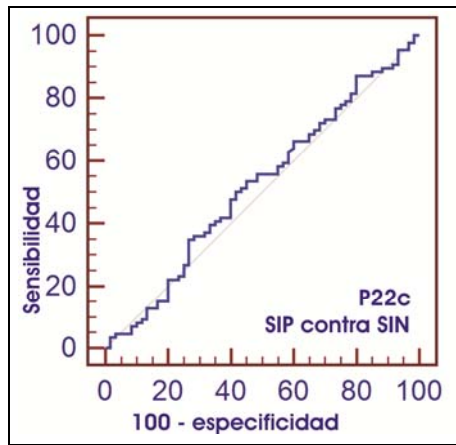


Figura 37: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgM y empleando P22c.

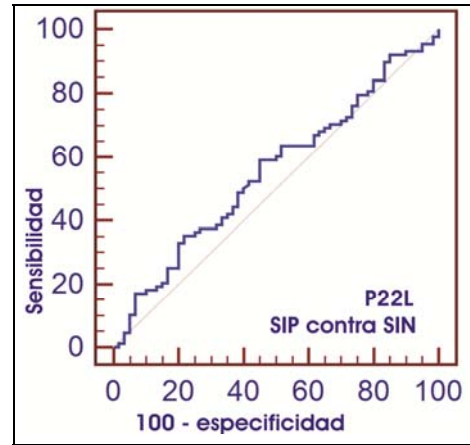


Figura 38: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgM y empleando P22L.

1.1.4.4. ELISA de avidez

Se evaluó el desempeño de P22c para discriminar entre anticuerpos específicos de alta y baja avidez. Para ello, se observó la correlación entre 5 sueros clasificados como de baja avidez para IgG (SIAS) por el Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán, con la avidez de anticuerpos IgG específicos contra P22c (el más promisorio de los Ags de P22), medida mediante el procedimiento descrito en el punto 1.3.3. de Materiales y Métodos. Además, se ensayaron 10 SIC al azar cuyos datos de avidez no eran conocidos pero, por la clasificación de los pacientes, se supuso que eran de alta avidez.

La avidez se computó como el cociente entre las diluciones de cada clase de incubación que presentaron una misma D.O., igual al 30 % de la D.O. máxima de dicho suero sin urea (ver punto 1.3.3. en Materiales y Métodos).

El procedimiento consiste en comparar el grado de disociación de anticuerpos específicos en presencia y ausencia de urea, un agente caotrópico que favorece la disociación del complejo Ag-Ac. Un Ac de alta avidez presentará menor disociación frente a la urea que un Ac de baja avidez. En las figuras 39 y 40 se muestran las curvas típicas obtenidas para un SIAS y un SIC, respectivamente. Ante la presencia de urea, para obtener la misma D.O. que presenta el complejo Ag-Ac sin urea, se requiere de mayor concentración de los Acs, es decir, menor dilución del suero o menor título del mismo suero (figura 39). A mayor avidez, menor es el efecto disociante de la urea. Por eso con los SIC, cuyos Acs tienen alta avidez, las curvas entre el suero con y sin urea fueron más parecidas que con los SIAS (figura 40).

En la figura 41 se muestra un diagrama de dispersión, la avidez promedio y los intervalos de avidez promedio con una confianza del 90 %, para cada grupo de sueros. Como los IC no se superpusieron, se pudo asegurar que la avidez promedio de cada grupo fue diferente, con significancia estadística. El área bajo la curva ROC de la diferenciación de SIAS de SIC fue de

0,92 (IC: 0,8-1).

Puede observarse que dos sueros de ambos grupos presentaron valores de avidéz similares a los del grupo contrario. Al trazar la línea de corte en 53 % se obtiene una sensibilidad de 100 %, especificidad de 77,88 %, VPP de 71,42 % y VPN de 100 %.

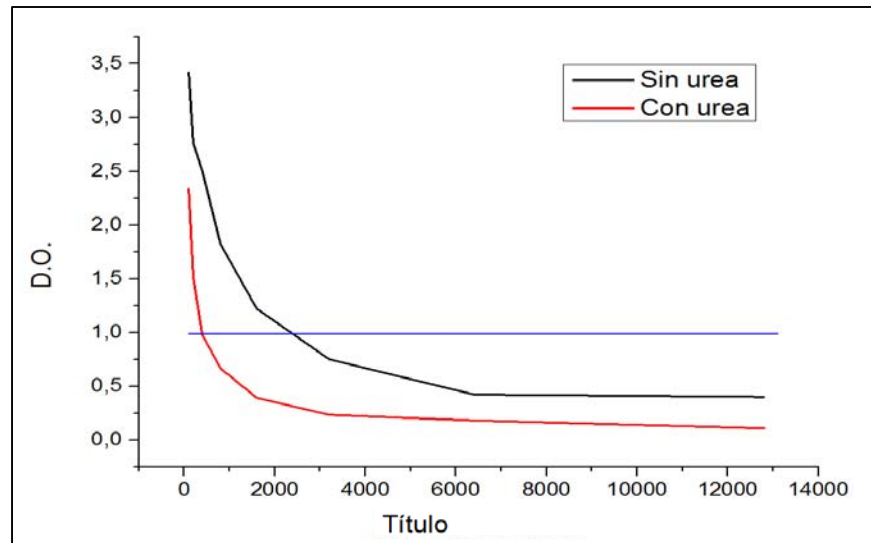


Figura 39: Curvas de los títulos de dilución del suero contra las D.O. obtenidas con un SIAS en presencia y ausencia de urea. La recta azul es la D.O. en la cual se compararon los títulos.

Si bien las mediciones de avidéz resultaron en valores diferentes para cada grupo, los SIAS no ofrecieron valores de avidéz tan bajos como los medidos en el Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán mediante el kit de Platelia.

Los únicos que reportaron una evaluación de avidéz con P22 fueron Béla y col. (Béla y col., 2008). Comparando sensibilidades y especificidades, la avidéz para IgG totales obtenida en nuestro trabajo fue superior: 100 y 77,88 %, contra 60 y 70 % (respectivamente) informado por ellos. No obstante, Belá y col. trabajaron con un mayor número de sueros (30 SIA y 30 SIC), habiendo utilizado además una región de P22 más corta que P22c (figura 8). En dicho trabajo, también se evaluó avidéz de anticuerpos IgG1, obteniendo mejores resultados: 83,4 y 86,7 % respectivamente (tabla 1).

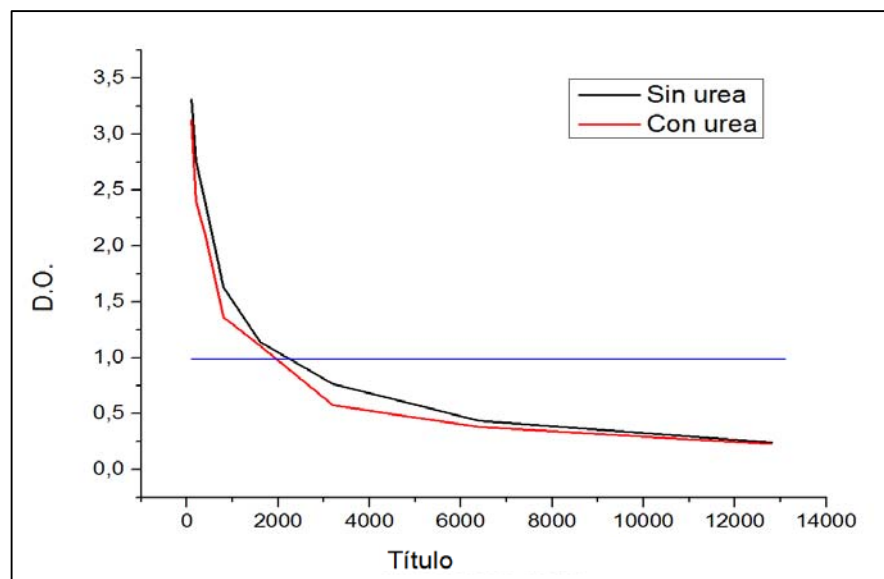


Figura 40: Curvas de los títulos de dilución del sueros contra las D.O. obtenidas con un SIC en presencia y ausencia de urea. La recta azul es la D.O. en la que se compararon los títulos.

Finalmente, Belá y col. evaluaron avidez de IgG contra una región de P22 más extensa que abarcó la región carboxi terminal (figura 8), pero no obtuvieron una buena discriminación (tabla1; Béla y col., 2008).

Los resultados de esta técnica ensayada con P22c, permitió clasificarla como *excelente* (Tape, 2013), aunque debería ensayarse con un mayor número de sueros y luego volver a calcular los parámetros estadísticos. Una limitación que probablemente presente se relaciona con que la proporción de sueros de pacientes infectados con *T. gondii* que reaccionaron con P22c no fue del 100 % (punto 1.1.4.1 de esta misma sección). Es decir, hay casos en que los pacientes no responden a este Ag, y en estos casos no podría realizarse el ensayo de avidez.

1.1.4.5. Comparación entre Inmunoensayos

Observando los ELISAs indirectos empleando P22 y detectando anticuerpos IgG e IgA, P22c siempre generó un área bajo la curva ROC diferente y superior que P22L (con 90 % de confianza). P22L nunca tuvo un desempeño muy diferente a una diferenciación al azar, ya que sus valores medios de áreas bajo las curvas ROC siempre fueron muy cercanos a 0,5 y sus IC siempre incluyeron este valor. No obstante, detectando anticuerpos IgM para ambos Ags, los IC de las áreas bajo las curvas siempre incluyeron el valor de 0,5. Además, los valores medios obtenidos siempre se acercaron a ese valor, excepto para P22c diferenciando SIA de SIC. La detección de IgM no discriminó prácticamente entre los diferentes grupos con ninguno de los 2 Ags.

Béla y Prince fueron los únicos que compararon cuantitativamente dos regiones diferentes de P22 al mismo tiempo, aunque fueron de extensiones diferentes a las aquí evaluadas. Béla y col. reportaron que detectando IgG, su región corta de P22 tuvo mayor reactividad que una secuencia más larga que evaluaron (Béla y col., 2008). Prince y col. no reportaron

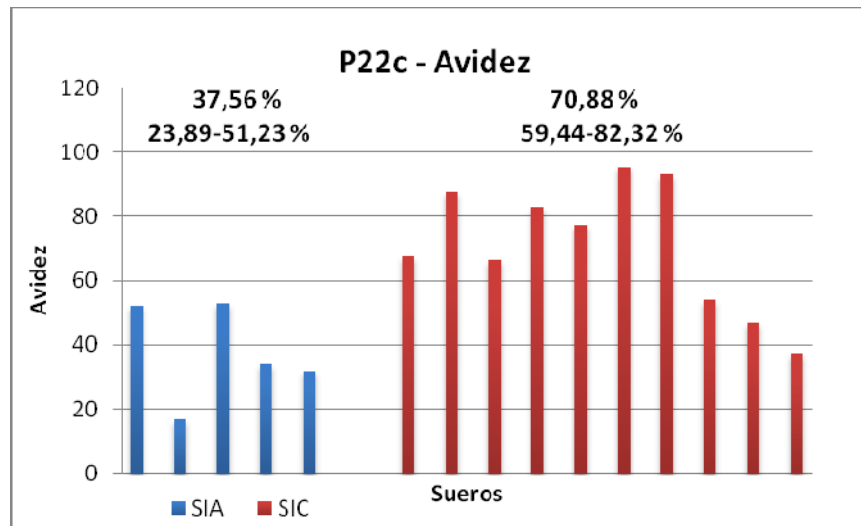


Figura 41: Diagrama de dispersión, avidez promedio e intervalo de la avidez promedio con una confianza del 90 % de los grupos de sueros obtenido en el ELISA de avidez empleando P22c como Ag.

diferencias en los resultados entre las 2 regiones que ensayaron primeramente analizando IgG (Prince y col., 1990). Sin embargo, en un trabajo posterior compararon cualitativamente una región similar a P22c con la secuencia completa, P22L, y describieron que al incorporar las regiones péptido-sígnal y carboxi terminal, la proteína perdía antigenicidad, además de volverse insoluble (Parmley y col., 1992). Resultados similares a los reportados por Lau y Fong, quienes lograron obtener P22L soluble pero sin lograr que discrimine entre las diferentes fases de la infección (Lau y Fong, 2008). Los resultados aquí presentados coinciden con estos reportes.

En la detección de anticuerpos totales IgG por ELISA indirecto, se alcanzó una sensibilidad de 73,8 % y una especificidad de 80,3 %, empleando P22c para la discriminación entre SIA de SIC. Comparados estos resultados con los reportados al evaluarse secuencias similares a P22c, fueron superiores a los informados por Hiszczyjska-Sawicka y col. (Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005) pero inferiores a los logrados por Li y Parmley (Li y col., 2000a; Parmley y col., 1992).

Analizando anticuerpos IgA por ELISA indirecto, en este trabajo se alcanzó una sensibilidad de 67,21 % y una especificidad de 81,82 %, con P22c entre SIA de SIC; resultados superiores a los precedentes bibliográficos (Parmley y col., 1992). Sin embargo, detectando IgM con P22c, discriminando entre SIA de SIC mediante ELISA indirecto, ocurrió lo contrario, habiendo logrado una sensibilidad de 81,8 % y una especificidad de 42,9 %, inferior a los resultados del mismo trabajo (Parmley y col., 1992).

El ELISA de Aidez se desarrolló con el mejor antígeno de P22, P22c. Para discriminar entre SIA de SIC, se obtuvo un área bajo la curva ROC (0,92) superior que aquella obtenida con ELISA indirecto detectando IgG (0,78). Además, se alcanzó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 77,89 %. Por lo cual ésta fue la técnica que mostró mejor capacidad para diferenciar SIA de SIC. Su sensibilidad y especificidad fueron similares al ELISA de aidez detectando IgG1 de Béla y col. (Béla y col., 2008) y al ELISA indirecto para IgG de Li y col. (Li y col., 2000a), habiendo superado a varias de las técnicas ensayadas por otros autores (Béla y col., 2008; Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005; Lau y Fong, 2008; Parmley y col., 1992; Prince y col., 1990), excepto a la detección de IgG mediante ELISA indirecto de Parmley y col. (tabla 1; Parmley y col. 1992).

En los ELISAs para detección de Acs, la mayor área bajo la curva ROC se obtuvo empleando P22c, detectando IgG y discriminando entre SIP y SIN (0,82). Esto podría indicar que P22c es mejor marcador de sueros de individuos infectados, antes que marcador específico de fase aguda de la infección.

P22L nunca arrojó buenos resultados, aunque esto no se debió a falta de reactividad sino a lo contrario. En efecto, las D.O. obtenidas con P22L en general fueron superiores a las

obtenidas con P22c. La reactividad aumentada probablemente se debió a la aparición de nuevos epitopes inespecíficos por 2 causas:

- a) las regiones polipeptídicas nuevas agregadas (región amino y carboxi terminal).
- b) la exposición de secuencias originalmente internas pero ahora ubicadas sobre la superficie por la desnaturalización de la proteína.

Probablemente, en el proceso de solubilización de P22L a partir de los cuerpos de inclusión, la proteína no alcanzó su conformación natural, exponiendo epitopes inespecíficos y perdiendo determinantes antigénicos específicos contra *T. gondii*. De tal modo, en los resultados aquí obtenidos, la sumatoria de las reactividades aumentó en P22L.

Prince y col. también evaluaron 2 regiones diferentes que se superponían sin obtener diferencias en la discriminación de fases, por lo que se podría inferir que los epitopes más antigénicos se encontraban en ambas secuencias, y por lo tanto, en la secuencia más corta (región aminoacídica: 100 a 188; figura 8; Prince y col., 1990). Finalmente, analizando con el mismo criterio los resultados en ELISA de avidéz y las reactividades descritas por Béla y col. que evaluaron diferentes secuencias, habría indicios que epitopes de interés se encuentran en la secuencia más corta por ellos empleada (región aminoacídica: 21 a 139; figura 8; Béla y col., 2008).

1.2. Bioinformática

Se analizó y modeló la secuencia de la proteína P22 completa de 186 AAs, es decir P22L (secuencia aminoacídica correspondiente solamente al Ag, sin secuencias del vector de expresión), mediante herramientas *in silico*, para profundizar los estudios sobre el Ag.

1.2.1. Análisis de la secuencia

Con el fin de obtener información que guíe el modelado molecular, se procedió a estudiar la secuencia primaria con diferentes programas: Pfam, InterproScan, SMART, PSIPred y FPsScan.

Mediante el programa PSIPred se predijeron las estructuras secundarias de la proteína (figura 42), para poder compararlas con el modelado tridimensional de la proteína (punto 1.2.3. de esta misma sección). Empleando el subprograma MENSAT-SVM del PSIPred, además se predijeron un péptido señal y una región transmembrana, ubicados en las posiciones aminoacídicas de 1 a 20 y de 167 a 183, respectivamente.

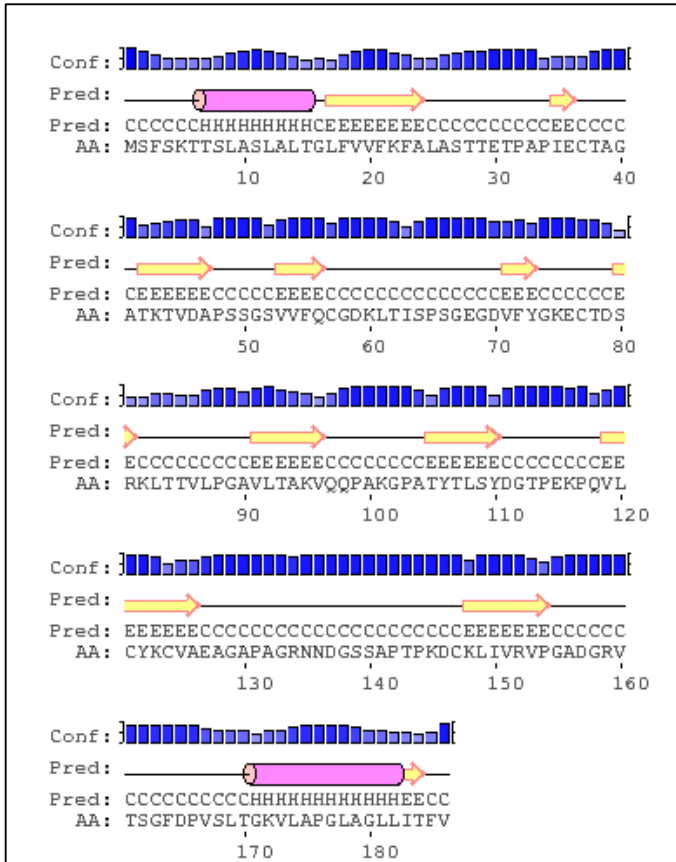


Figura 42: Estructuras secundarias de P22 predichas por el PSIpred. Donde Conf: confianza, Pred: predicción (C: cola, H: hélice α y E: hoja plegada β).



Figura 43: Esquema del dominio SRS encontrado dentro de P22.

tanto a *T. gondii* como a otros microorganismos apicomplexas, que se mantienen en la superficie del parásito porque se encuentran unidas al GPI de la membrana. Estas proteínas median la invasión a las células del hospedador y son a través de las cuales el sistema inmune ataca la infección. Estos hallazgos son concordantes con los reportados en la bibliografía (Lekutisa y col.; 2001; Boothroyd y col., 1998; Kim y Boothroyd, 2005). En P22 hay sólo un dominio SRS que va desde la posición del AA 39 al 153 (figura 43). P22c abarcó desde la posición 27 hasta la 173, comprendiendo casi todo el dominio SRS. Considerando que el sistema inmune responde a la infección reconociendo varias proteínas con SRS, es posible que haya epitopes específicos compartidos por microorganismos apicomplexas en el dominio SRS.

El programa FPScan no ofreció ningún resultado, es decir que en sus bases de datos no pudo hallar Huellas que se asocien con la secuencia de P22.

Los programas InterProScan y SMART localizaron una secuencia péptido señal que va desde la posición aminoacídica 1 a la 26.

Los resultados de las predicciones de los programas InterProScan, SMART y PSIPred confirmaron que las regiones amino y carboxi terminal no incluidas en P22c fueron la secuencia péptido señal y la región transmembrana.

Paralelamente, los programas Pfam e InterProScan encontraron un dominio SRS y reconocieron la identidad del Ag. Estos programas presentaron una descripción del SRS: es un dominio clásico en proteínas que recubren

1.2.2. Búsqueda de estructuras patrones para modelado

La construcción de un modelo tridimensional para una proteína requiere emplear estructuras terciarias de otras proteínas definidas experimentalmente, empleándolas como patrones. Utilizando el programa Swiss-Model se encontraron 2 modelos útiles para construir la estructura incógnita: SporoSAG, una proteína SAG específica de esporozoíto en *T. gondii*, (PDB: 2wnkA) y P30 (PDB: 1kzqB), con identidades de secuencia de 29 % y 23 %, respectivamente. También se buscó modelos mediante threading empleando una aplicación de PSIPred, encontrándose el Ag de bradizoíto BSR4 (P36) de *T. gondii* (PDB: 2jksA0) y nuevamente P30 (pero con un alineamiento diferente), con identidades de secuencia en este caso de: 11,3 % y 12,4 %, respectivamente. En las figuras 44, 45 y 46 se muestran las estructuras encontradas, donde puede apreciarse que las 3 guardan similitud en cuanto a las estructuras secundarias y terciarias. Todas son proteínas de la superficie de distintos estadios de *T. gondii*.

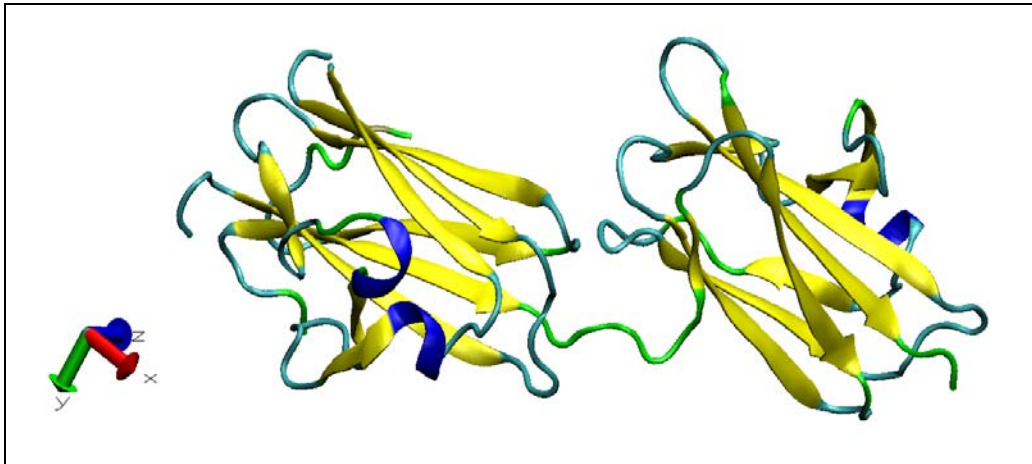


Figura 44: Estructura patrón SporoSAG. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

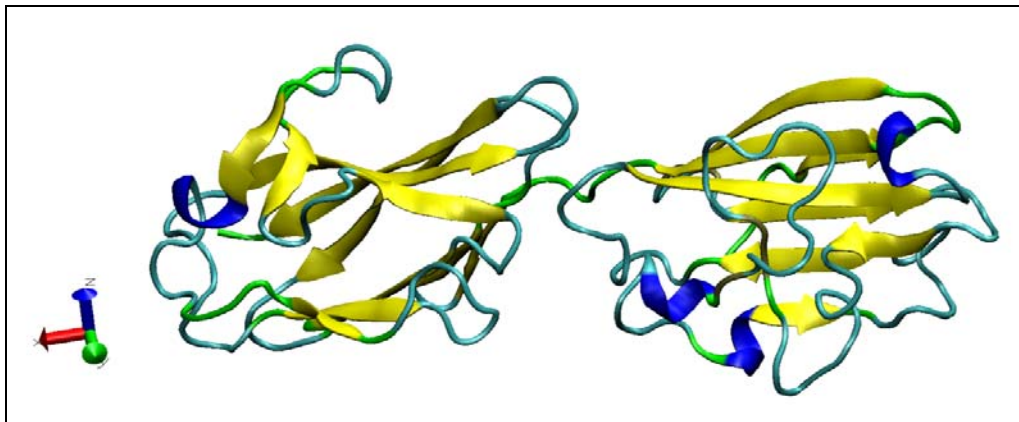


Figura 45: Estructura patrón P30. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

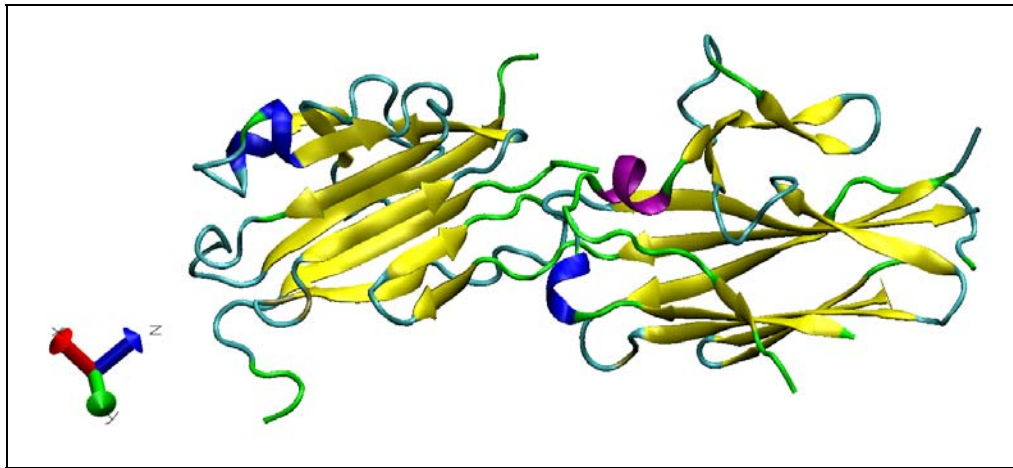


Figura 46: Estructura patrón BSR4. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

Cabe señalar como P30 fue encontrada para emplearse como molde mediante dos criterios de búsqueda diferentes. El primero examinando identidades de secuencias y el segundo observando en que estructura espacial P22 poseía la menor energía conformacional de interacción. Cada criterio de búsqueda generó alineamientos distintos entre P22 y P30, lo que provocó identidades de secuencias diferentes.

1.2.3. Modelado molecular

Para la construcción de diferentes modelos tridimensionales, se armaron los siguientes alineamientos (simples o múltiples) entre las secuencias de P22 y los patrones:

- 1) SporoSAG.
- 2) SporoSAG y P30 (con identidad de secuencia de 23 %).
- 3) BSR4.
- 4) BSR4 y P30 (con identidad de secuencia de 12,4 %).
- 5) SporoSAG, P30 (con identidad de secuencia de 23 %) y BSR4.

Para cada alineamiento se armaron 5 modelos diferentes mediante el programa Modeller. También se construyeron 5 modelos distintos mediante el programa online I-TASSER. Se evaluaron todos mediante ANOLEA y el mejor modelo se obtuvo al emplear como molde sólo la proteína SporoSAG a través de Modeller.

Se realizaron ajustes del alineamiento entre SporoSAG y P22 entre las posiciones aminoacídicas 26 y 139, luego se volvieron a construir 5 modelos. Se lograron mejoras locales analizadas mediante el Verify3D y los puntajes globales del ANOLEA en los modelos también mejoraron. Se escogió el mejor de los 5 modelos.

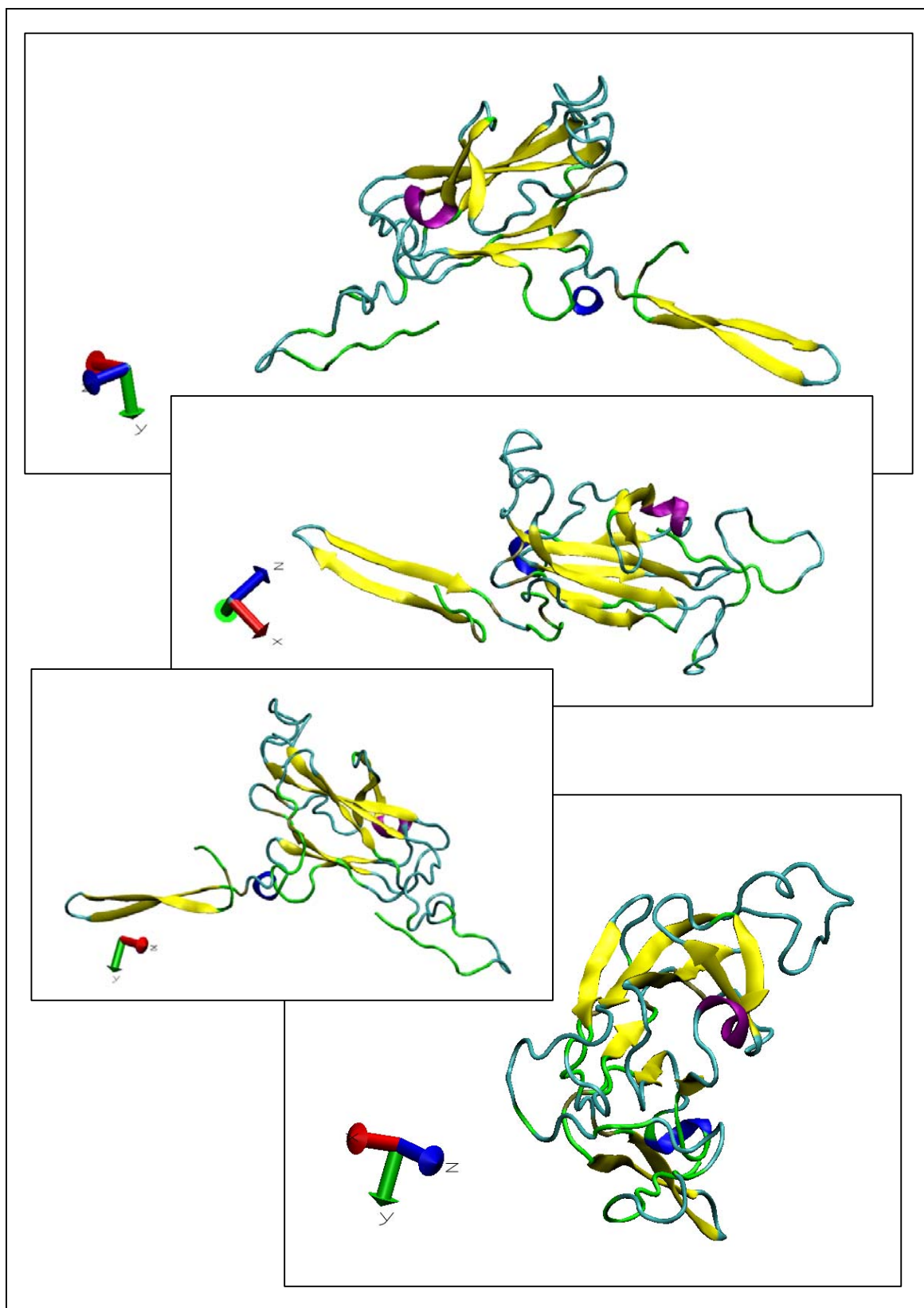


Figura 47: Diferentes perspectivas del modelo final de la estructura terciaria de P22. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

Del modelo seleccionado se realizó una minimización de la energía de interacción de la estructura de 66 pasos. Luego, se ajustaron los loops ubicados entre los AAs 95 a 104 y 128 a 144 empleando el programa LOBO, logrando mejoras tanto con Verify3D como con ANOLEA. Se ajustaron otros loops, pero según Verify3D no lograban mejoras locales, por lo que esos cambios se descartaron.

Finalmente se realizó una segunda ronda de minimización de energía de interacción de la estructura de 135 pasos.

Luego de todo el proceso de refinamiento, el modelo final tuvo un 75,27 % de los AAs con un valor de Verify3D superior a 0,15 y un valor Z de energía normalizada del ANOLEA de 1,62 E/kT. En la figura 47 se muestran diferentes perspectivas de la estructura terciaria final obtenida. Se pudo apreciar que la cantidad, clase y ubicación de las estructuras secundarias concordaron en su mayoría con las predichas por el PSIPred. Las mayores discrepancias correspondieron a las conformaciones hélices. En uno de los extremos de la estructura primaria, PSIPred predijo hélices que no se encontraron en el modelo determinado por Modeller. Y al contrario, Modeller construyó 2 hélices internas que no fueron predichas por PSIPred.

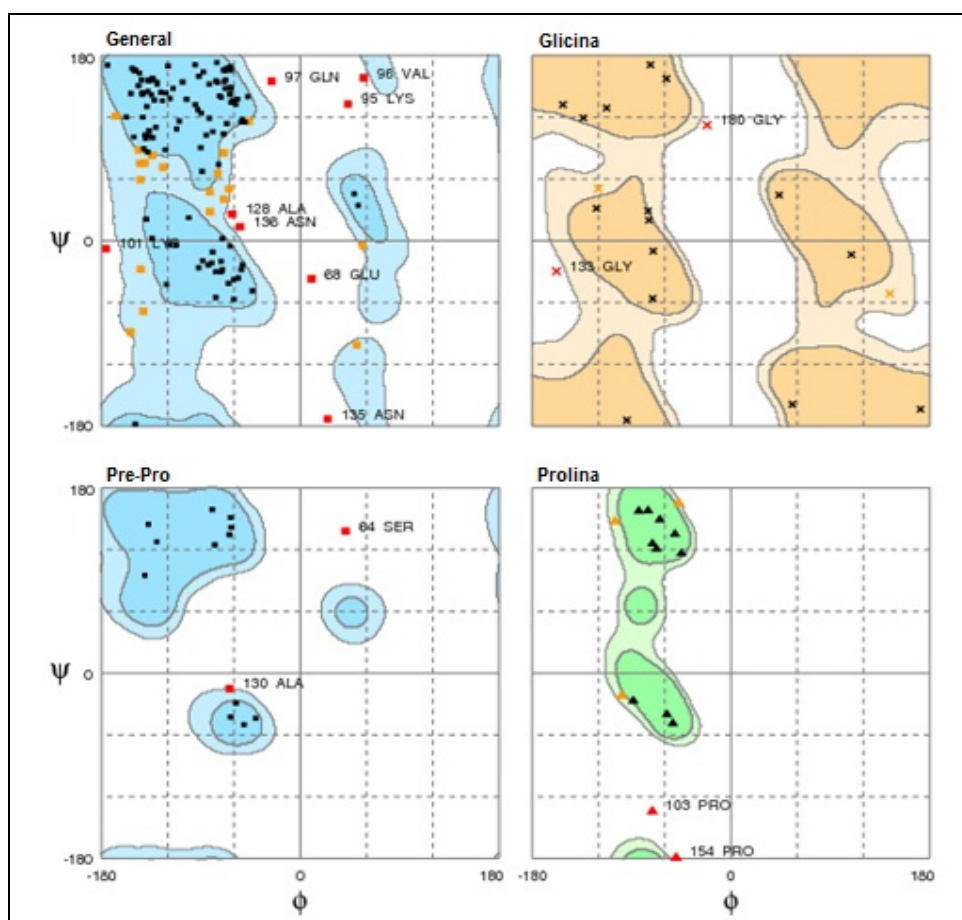


Figura 48: Mapa de Ramachandran del modelo final obtenido para P22. Está dividido en 4 submapas según los grupos de AAs que se consideran. Los puntos rojos fueron los AAs que se ubicaron en zonas del mapa prohibidas.

En la figura 48 se muestra el mapa de Ramachandran de la estructura terciaria, donde se pudo observar cuales AAs se ubicaron en zonas del mapa prohibidas (puntos rojos), es decir que esos AAs adoptaron combinaciones de ángulos diedros ϕ y ψ prohibidos (ver punto 2.2.3.1. en Materiales y Métodos; Ramachandran y col., 1963).

El mapa de Ramachandran está dividido en 4 submapas, cada uno considerando diferentes grupos de AAs. El submapa Glicina muestra solamente los AAs glicinas, el Pre-Pro muestra únicamente los AAs que anteceden a las prolinas, el Prolina muestra todos AAs prolinas y el General muestra el resto de los AAs. Estos mapas indican que se encontraron en zonas prohibidas 8 AAs en el grupo General y 2 en cada uno de los otros 3. Solo el 7,2 % de los AAs de P22 estuvieron en zonas del mapa prohibidas (Ramachandran y col., 1963; Lovell y col., 2002), porcentaje inferior al aceptado en la bibliografía (Danishuddin y col., 2011).

1.2.4. Ubicación de regiones en la estructura conformacional de P22

La figura 49 muestra la estructura tridimensional de P22 (P22L), donde se indicaron en negro las regiones de P22L que fueron retiradas en P22c. P22c tiene la secuencia final que adopta la proteína *in vivo* (Tomavo y col., 1989) y según nuestro modelo adquiriría una conformación globular.

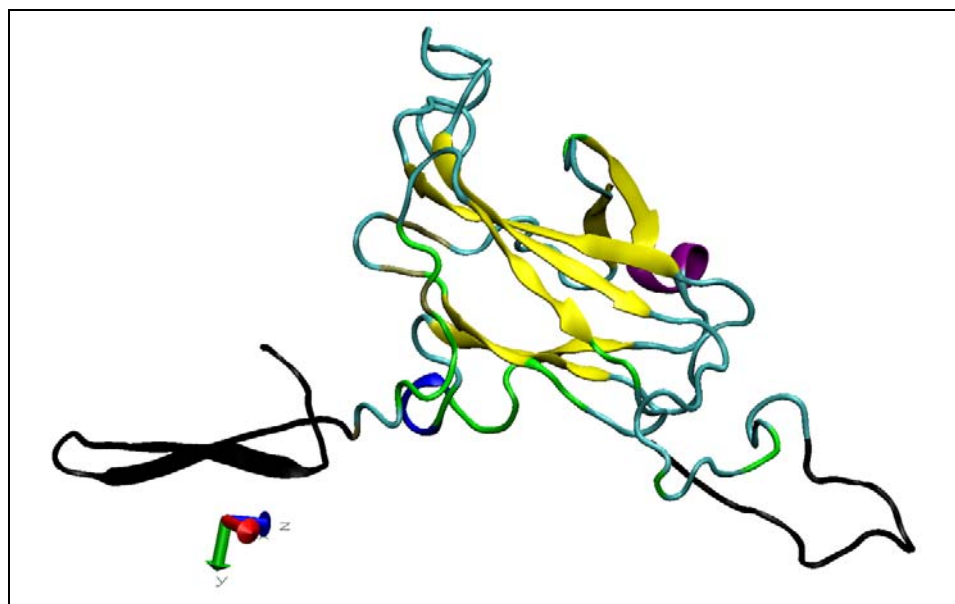


Figura 49: estructura terciaria de P22L con las regiones marcadas en negro que fueron eliminadas en P22c. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

La figura 50 muestra el dominio SRS encontrado en P22 (en color verde) sobre la estructura terciaria de P22L.

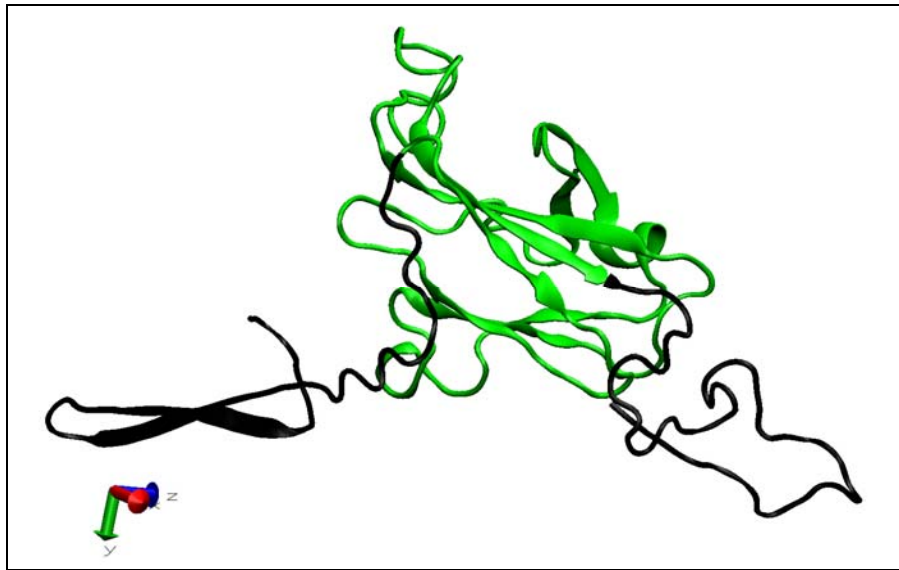


Figura 50: Dominio SRS, en color verde, marcado sobre la estructura terciaria de P22L.



Figura 51: Esquema de la estructura primaria de P22 donde se indican en anaranjado las regiones expuestas sobre la superficie de la estructura terciaria.

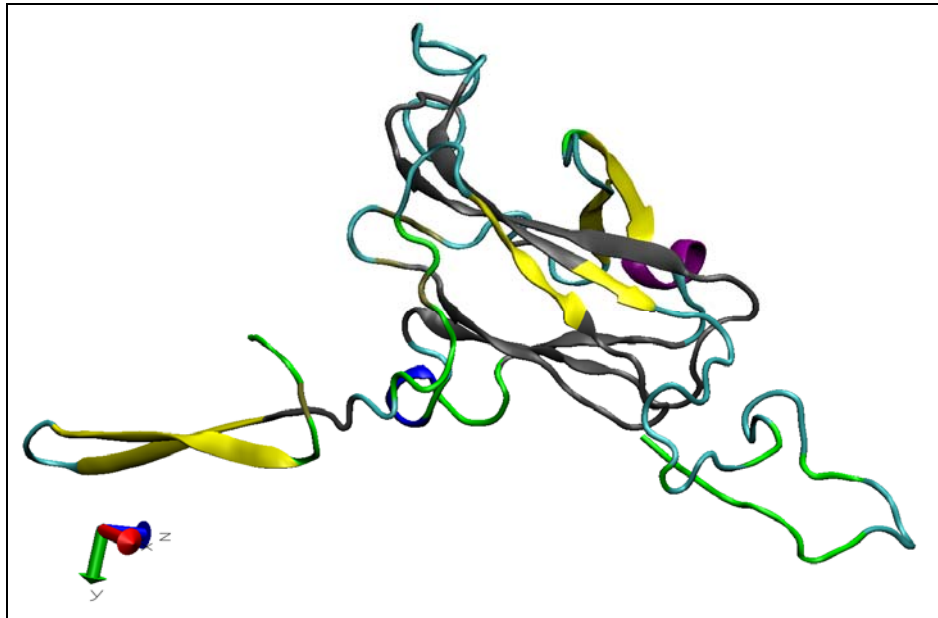


Figura 52: estructura tridimensional de P22L mostrando en color gris los AAs no expuestos en la superficie. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

Empleando el programa Swiss-PDB Viewer se buscaron todos los AAs que se encontraban expuestos en la superficie. Las secuencias encontradas estuvieron ubicadas en las posiciones de los AAs 1 a 24, 29 a 45, 59 a 66, 73 a 89, 95 a 103, 132 a 143 y 152 a 186. En la figura 51 se muestran las regiones expuestas sobre la superficie (en color anaranjado) sobre un

esquema representativo de la estructura primaria de P22. La figura 52 muestra la estructura conformacional de P22L señalando en color gris los AAs no expuestos en la superficie.

1.2.5. Predicción de epitopes

Empleando el mejor programa de predicción de epitopes lineales contra anticuerpos, el AAPPred (ver Anexo A de esta misma sección), se predijeron los epitopes para P22. Los epitopes lineales encontrados estuvieron en las posiciones aminoacídicas: 30 a 45, 93 a 99 y 115 a 145 (ver figuras 53 y 54). Es de resaltar que el último epitope tuvo los AAs con mayores puntajes antigénicos, alcanzando el puntaje máximo de 1,8 la lisina en la posición 122. Se tomó como puntaje antigénico umbral del programa el valor de 0,6. (Davydov y Tonevitsky, 2009). Todos esos epitopes se encontraron dentro de P22c.

Empleando el Discotope se predijo los AAs antigénicos de epitopes estructurales para Acs. Estos AAs estuvieron en las posiciones: 34 a 40, 52, 63, 65, 66, 69, 77, 80, 83 a 86, 95, 96, 98, 162, 163, 165, 166, 169 y 182 a 186 (figuras 55 y 56). Desafortunadamente el programa no los agrupó en epitopes.

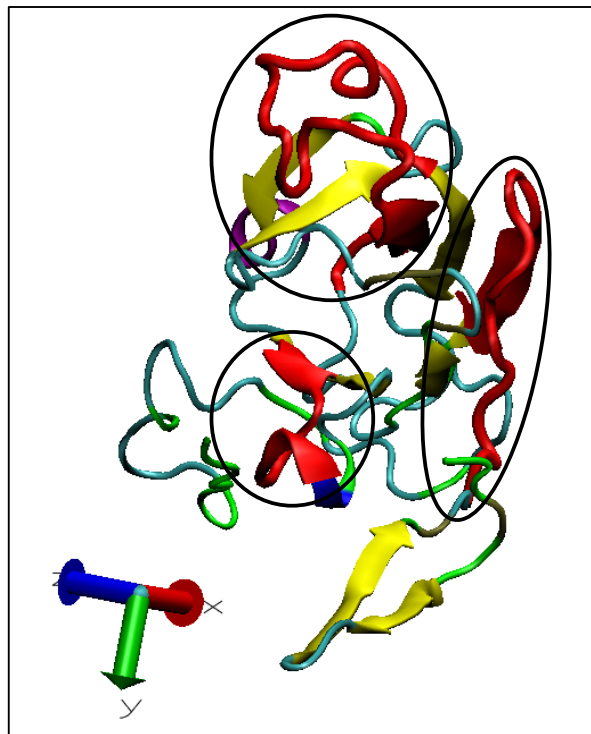


Figura 53: Ubicación de los epitopes lineales predichos sobre la estructura terciaria de P22, en color rojo. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde



Figura 54: Esquema de la ubicación de los epitopes lineales predichos sobre la estructura primaria de P22.



Figura 55: Esquema de la ubicación de los AAs pertenecientes a epitopes conformacionales sobre la estructura primaria de P22.

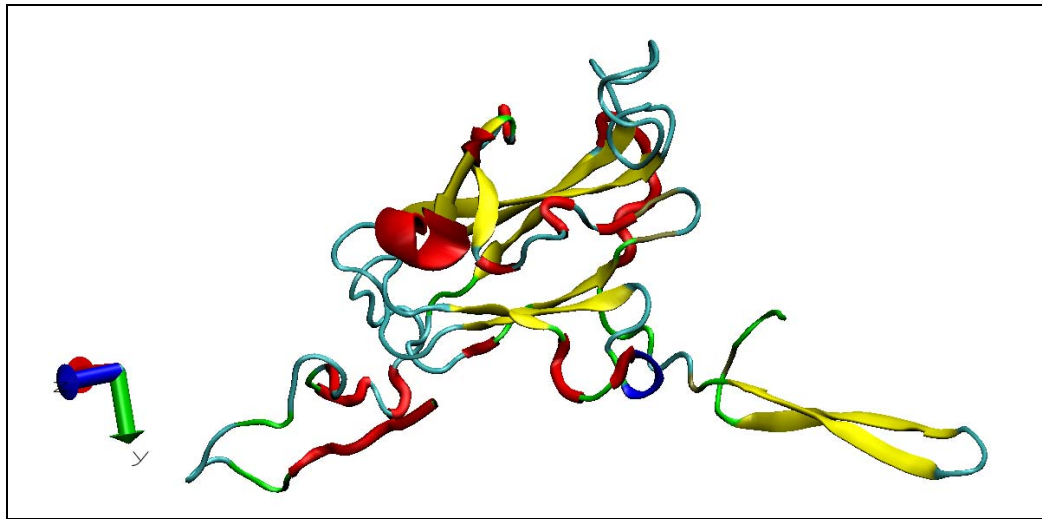


Figura 56: Ubicación de los AAs pertenecientes a epitopes estructurales predichos sobre la conformación de P22, en color rojo. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde

Cunha-Junior y col. identificaron un epítipo lineal empleando un Ac monoclonal en P22. Ensayaron este Ac en varias secuencias polimórficas, verificando que se unía con diferentes afinidades. Definieron una secuencia consenso, con la cual nuestro Ag tubo un 66,67 % de identidad de secuencia y se encontró ubicado en la región 137 a 143 (Cunha-Junior y col., 2010). En la figura 57 se muestra el epítipo (en color rojo) dentro de la estructura tridimensional. Cabe resaltar que dicho epítipo se encontró en una de las regiones más expuesta de la estructura.

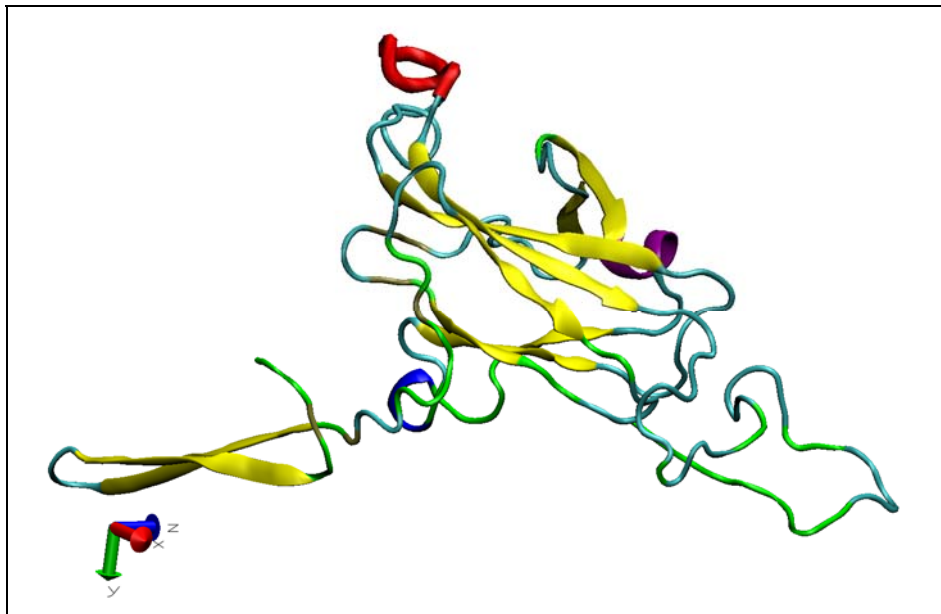


Figura 57: Ubicación del epítipo lineal hallado experimentalmente sobre la estructura terciaria de P22, en color rojo. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde

1.2.6. Hipótesis sobre la ubicación de los epitopes

En función de los análisis *in silico*, de los datos experimentales y de la información bibliográfica, se postularon hipótesis sobre la ubicación de las diferentes regiones antigénicas específicas para *T. gondii*. Se supuso que cada una podría incluir entre 1 y 2 epitopes diferentes. En la figura 58 se presenta un esquema de todas las regiones de interés para ubicar epitopes, sobre la estructura primaria de P22: dominio SRS (SRS), las regiones expuestas sobre la superficie (*Superficie*), los epitopes lineales predichos (*E. lineales*), los epitopes estructurales predichos (*E. estructurales*), la posible región antigénica según los resultados de Prince y col. (*Prince y col.*; Prince y col., 1990), la posible región antigénica según los resultados de Béla y col. (*Béla y col.*; Béla y col., 2008), la secuencia de P22c (*P22c*), la secuencia de P22L (*P22L*) y el epitope lineal hallado experimentalmente (*Experimental*, Cunha-Junior y col., 2010).

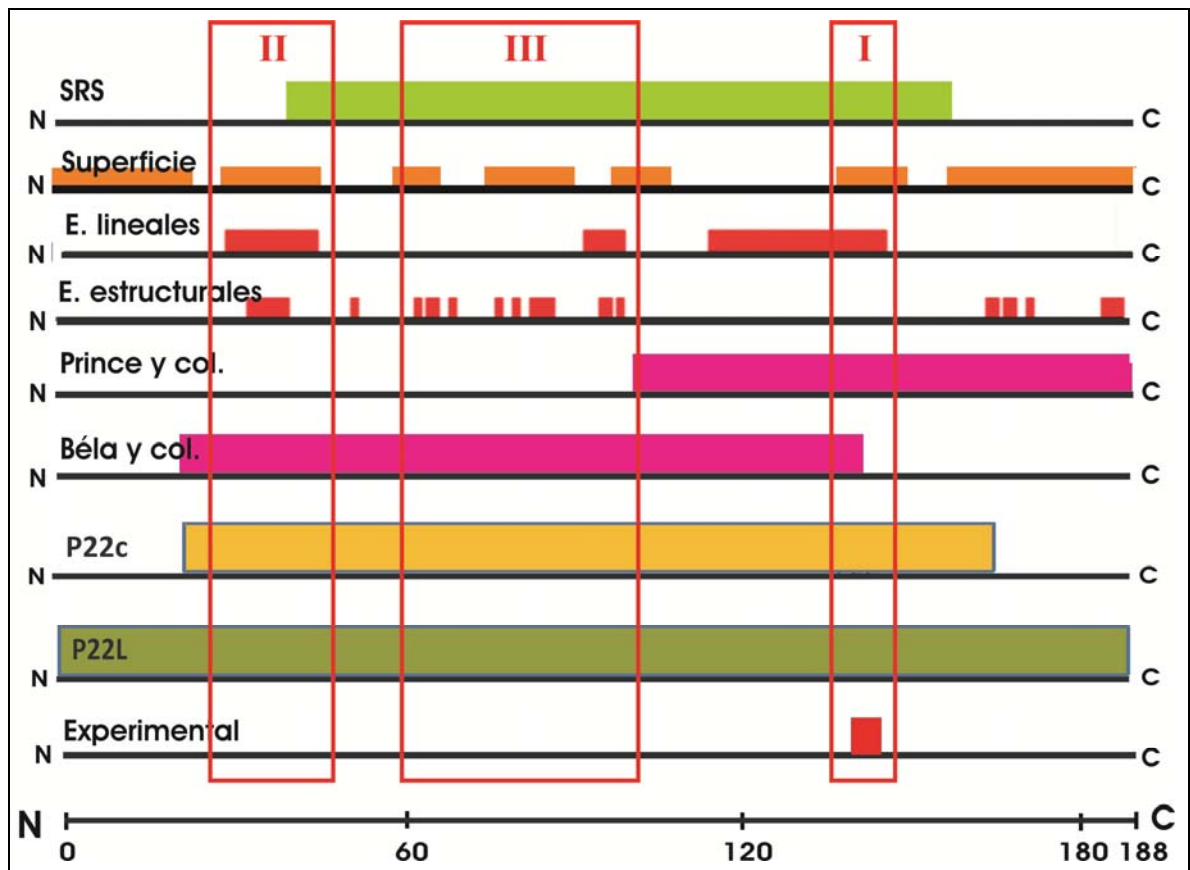


Figura 58: Esquema donde se muestra en color verde claro la ubicación del dominio SRS (SRS), en color anaranjado las regiones expuestas sobre la superficie (*Superficie*), en color rojo los epitopes predichos lineales (*E. lineales*), los epitopes predichos estructurales (*E. estructurales*) y el epitope lineal hallado experimentalmente (*Experimental*, Cunha-Junior y col., 2010), en color fucsia la posible región antigénica según Prince y col. (Prince y col.; Prince y col., 1990) y la posible región antigénica según Béla y col. (Béla y col.; Béla y col., 2008), en color amarillo la secuencia expresada de P22c (*P22c*) y en color verde oscuro la secuencia expresada de P22L (*P22L*). En la base se muestra un esquema de la secuencia de AAs de P22 completa. Los rectángulos transparentes con bordes rojos muestran aproximadamente las regiones de los posibles epitopes.

En la figura 58 se señalan aproximadamente mediante recuadros rojos, 3 regiones que se definieron potencialmente antigénicas. Éstas se enumeraron según la importancia inferida,

siendo I la más antigénica y III la menos. Las 3 regiones se encontraron tanto en P22c y P22L. A continuación se detallan cada una:

Región antigénica I: Fue la región aminoacídica **132 a 145**, cuya ubicación en la estructura tridimensional se muestra en la figura 59. Fue la única región que tuvo un epítopo experimentalmente confirmado (AAs de la región 137 a 143; Cunha-Junior y col., 2010), y se encontró dentro del dominio específico de los microorganismos apicomplexas

(dominio SRS). Fue un segmento expuesto a la superficie (AAs de la región 132 a 143) que también formó parte de un epítopo lineal predicho (AAs de la región 115 a 145). Los extremos de la región antigénica I fueron extendidos hasta las posiciones 132 y 145, donde comenzó el segmento expuesto en la superficie y donde terminó el epítopo predicho, sin haberlo limitado a la posición del epítopo confirmado experimentalmente. De esta manera, se contempló la posibilidad de que otros AAs laterales puedan favorecer la interacción con el Ac (Rubinstein y col., 2008). Es de destacar que el epítopo determinado experimentalmente coincidió con el epítopo lineal predicho de mayor puntaje antigénico. Por otro lado, la región antigénica I estaría en una zona compartida por ambas secuencias trabajadas por Prince y col., por lo que hubiese permitido que tuviesen las mismas reactividades en los ensayos diagnóstico, como fueron observadas (Prince y col., 1990). No obstante, no ocurrió lo mismo con las secuencias trabajadas por Béla y col., debido a que la región consenso estudiada en dicho trabajo (AAs de la región 21 a 139; Béla y col., 2008) no alcanzó a incluir la región antigénica I (figura 58).

Región antigénica II: Fue la región aminoacídica **29 a 45**, cuya ubicación en la estructura tridimensional se muestra en la figura 60. Abarcó en su totalidad las regiones donde se predijeron un epítopo lineal (AAs de la región 30 a 45), un epítopo estructural (AAs de la región 34 a 40) y una secuencia expuesta en la superficie (AAs de la región 29 a 45). Los límites de la región antigénica II se definieron por la posición inicial de la secuencia expuesta sobre la superficie y la posición final del epítopo lineal. Esta posible región antigénica estaría en una zona compartida por ambas secuencias evaluadas por Béla y col. (AAs de la región 21 a 139, figura

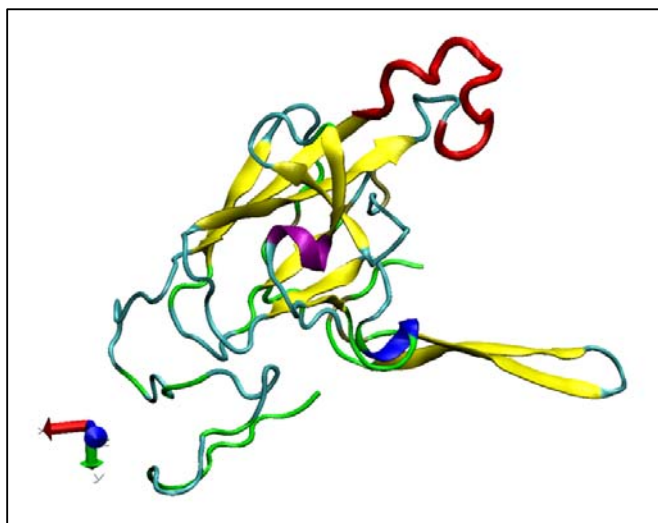


Figura 59: Ubicación de la región antigénica I, en color rojo, en la estructura terciaria de P22. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

58), permitiendo que tuviesen las mismas reactividades en los ensayos diagnóstico, como fue observado (Béla y col., 2008).

Región antigénica III:

Fue la región aminoacídica **63 a 99**, cuya ubicación en la estructura tridimensional se muestra en la figura 61. Es una región que incluyó predicciones de AAs pertenecientes a epitopes estructurales que estuvieron entre las posiciones de los AAs 63 a 98, de 3 regiones expuestas sobre la superficie (entre AAs 59 a 103) y un epitope lineal (AAs 93 a 99). Los límites de la región antigénica III se definieron en función de los límites de las regiones de los epitopes predichos. La posición inicial correspondió al primer AA del epitope lineal y la posición final al último AA del epitope estructural. Estuvo incluido en una región que presenta la misma situación que la región antigénica II respecto al trabajo de Béla y col. (Béla y col., 2008), perteneciendo además al dominio SRS (figura 58).

Las regiones antigénicas definidas, son aquellas que se supusieron específicas para *T. gondii*. Al emplear P22L la proteína perdió su especificidad en los ensayos, pero su reactividad

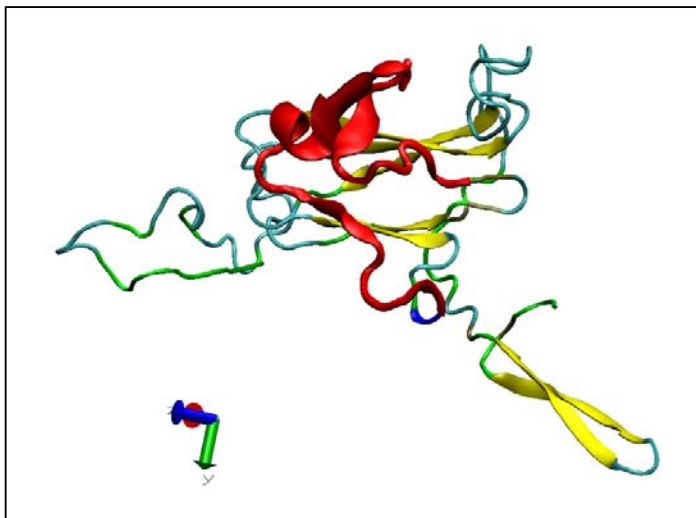


Figura 61: Ubicación de la región antigénica III, en color rojo, en la estructura terciaria de P22. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde

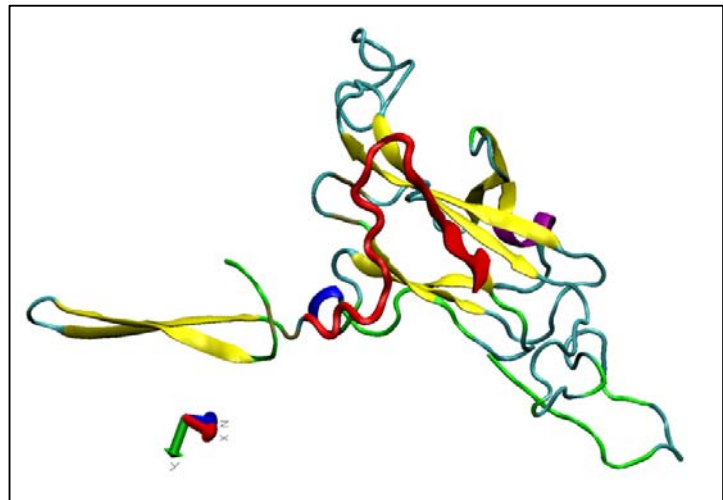


Figura 60: Ubicación de la región antigénica II, en color rojo, en la estructura terciaria de P22. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde

superó la de P22c. Como se indicó en el punto 1.1.4.5. de esta sección, las mayores señales observadas probablemente se debieron a nuevos epitopes inespecíficos que aparecieron, que estaban en las nuevas regiones de P22L o que ya estaban en P22c pero recién se expusieron al desnaturalizarse el Ag durante la purificación de P22L. Ambas situaciones fueron respaldadas por las predicciones. P22L tuvo AAs antigénicos en la

región carboxi terminal que no se encontraban en P22c, y además este Ag tuvo una secuencia predicha como epítopo lineal (en el tercer epítopo en la estructura primaria) que no se encontraría expuesta sobre la superficie pero podría haber aparecido al desnaturalizarse P22L (figura 58).

En este trabajo se evaluaron dos secuencias diferentes de P22. P22L, secuencia tal cual es traducida del ADN codificante, y P22c, secuencia con la extensión final reducida tal cual se encuentra en la superficie del parásito. Ambas se clonaron en el mismo vector de expresión y en bacterias. P22c tuvo un buen nivel de inducción y solubilización. Pero al agregarle las regiones amino y carboxi terminal, no solo se volvió insoluble sino que además formó cuerpos de inclusión, complicando la purificación del Ag. El agregado de estas regiones también afectó significativamente la capacidad para diferenciar sueros de individuos en diferentes estadios de la infección, debido a la aparición de altas señales inespecíficas. En este trabajo se atribuyó ese fenómeno a alteraciones en los epítopos. El proceso de solubilización de P22L habría desnaturalizado la proteína, alterando e inutilizando epítopos estructurales específicos contra *T. gondii*, al mismo tiempo que agregara epítopos inespecíficos al Ag, provenientes de las regiones nuevas adicionadas en P22L y de secuencias que ya se encontraban en P22c pero que luego de la desnaturalización se expusieron en la superficie. En el estudio mediante bioinformática se encontraron en la estructura de P22, regiones antigénicas con características que apoyarían estas hipótesis. Algunas halladas sobre la superficie de P22c y otras que solo se encontraron en P22L o no estuvieron expuestas sobre la superficie de P22c.

2. Evaluación del antígeno P30

2.1. Resultados experimentales

En este trabajo se evaluaron 2 fracciones de la proteína P30 de distintas extensiones. Nigro y col. también analizaron 2 secuencias de diferentes extensiones de esta proteína, clonadas en el plásmido pQE (figura 10), pero no obtuvieron buena discriminación entre las fases de la infección (Nigro y col., 2003). En el presente trabajo se evaluó la misma secuencia corta utilizada por ellos (cedida por el Dr. Ángel), que se denominó P30c. Dados los resultados previos mencionados, se decidió emplear un vector diferente que el utilizado por Nigro y col., para observar si el cambio del plásmido de expresión modificaba los resultados originales. También se evaluó una secuencia denominada P30L, que es más extensa que P30c, pero 28 AAs más corta que la segunda secuencia empleada por Nigro y col., pretendiéndose evaluar si el cambio en la extensión de la secuencia generaba alguna variación significativa favorable (Nigro y col., 2003).

En la figura 62 se muestra un esquema de las regiones trabajadas sobre una secuencia nucleotídica de referencia (HM776940 en el NCBI).

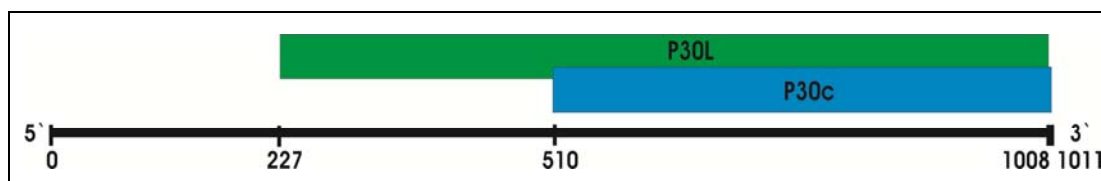


Figura 62.: Esquema del ADN codificante de referencia del NCBI y de las regiones obtenidas de P30.

2.1.1. Obtención de las secuencias de ADN

Se obtuvieron los genes de P30c y P30L cortándolos mediante enzimas de restricción del vector pQE. Las muestras se corrieron en electroforesis de geles de agarosa, confirmando la presencia de los genes con la aparición de bandas del tamaño correspondiente (ver tabla 10). En la figura 63 se muestra un gel de agarosa donde se corrió la digestión enzimática del vector. Ahí se pudo observar una banda cercana a 500 pb correspondiente a P30c y el vector pQE cortado arriba en la misma calle (A); el vector pQE sin cortar (B) y un MPM.

Antígeno	Extensión en pb	Extensión en AAs
P30c	501	166
P30L	781	260

Tabla 10: Extensión en AAs y pb de los Ags de P30 evaluados.

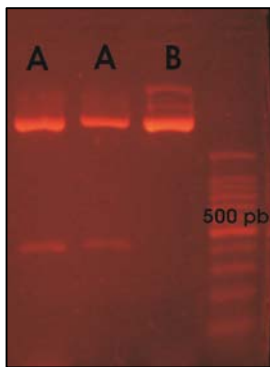


Figura 63: Liberación de P30c del vector pQE (A), vector pQE sin cortar (B) y MPM.

Las regiones del gen de P30 empleadas coincidieron 100 % con la secuencia de número de acceso HM776940 en el NCBI, "ARN mensajero del antígeno de superficie mayor de la cepa de *Toxoplasma gondii* RH, secuencia codificante completa". Exceptuando a Nigro y col. con P30c (Nigro y col., 2003), ningún otro autor expresó secuencias iguales a las empleadas en nuestro trabajo. Beghetto y Pfrepper expresaron regiones semejantes a P30c y P30L, respectivamente (figura 10; Beghetto y col., 2003; Pfrepper y col., 2005). Y solamente Aubert y Selseleh clonaron y evaluaron para diagnóstico de fases de toxoplasmosis una secuencia completa de P30 (Aubert y col., 2000; Selseleh y col., 2012a).

Cabe aclarar que P30 fue una de las primeras proteínas en ser caracterizada y evaluada antigénicamente y muchos de los primeros trabajos la utilizaron purificada del parásito *T. gondii*, mediante Acs monoclonales (Cesbron y col., 1985; Decoster y col., 1988 y 1992; Santoro y col., 1985).

2.1.2. Clonado en el vector de expresión e inducción de proteínas

Las secuencias de P30c y P30L cortadas fueron introducidas por ligación enzimática en los vectores de expresión pET-32a y pRSET C, respectivamente. Se emplearon diferentes plásmidos porque no se podía mantener el marco de lectura correcto con ambas secuencias utilizando el mismo vector, debido a que a los sitios dentro de los codones donde las secuencias comenzaban eran diferentes. Si bien se han empleado otros vectores distintos con P30 (Pfrepper y col., 2005; Pietkiewicz y col., 2003; Selseleh y col., 2012a; Burg y col., 1988; Kotresha y col., 2012), en este trabajo se escogió pET32a particularmente porque ya fue utilizado para la expresión de una secuencia de P30 sin reportar ninguna complicación, habiéndose incluso informado resultados muy prometedores para el diagnóstico de la fase aguda (Jalallou y col., 2012). Debido a estos antecedentes y a lo desarrollado en el punto 2.4. de la Introducción, se utilizó pET-32a en lugar de pQE con P30c para observar el efecto de cambiar el plásmido.

Luego se transformaron bacterias *E. coli* BL21 DE3 con ambas construcciones. Se probaron diferentes condiciones de inducción (ver punto 1.2.1. en Materiales y Métodos), pero no se observaron diferencias en los niveles de inducción de las proteínas. Finalmente se emplearon las condiciones de expresión 0,1 mM de IPTG, toda la noche a 20 °C.

Las secuencias finales de los genes de P30 introducidas en los vectores de expresión se muestran a continuación. En color rojo se muestra un nucleótido que se encontró alterado en

P30c, indicando entre paréntesis el de la secuencia de referencia y subrayado los nucleótidos pertenecientes al codón de expresión.

P30c:

atggtcacgg tgacagtaca agccagagcc tcatcggtcg tcaataatgt cgcaaggtgc tctacggtg cagacagcac
tcttgtcct gtcaagttgt ctgcga(g)aagg acccactaca atgaccctcg tgtcgggaa agatggagtc aaagttctc
aagacaaca tcagtactgt tccgggacga cgctgactgg ttgcaacgag aaatcgttca aagatatttt gccaaaatta
actgagaacc cgtggcaggg taacgcttcg agtgataagg gtgccacgct aacgatcaag aaggaagcat ttccagccga
gtcaaaaagc gtcattattg gatgcacagg gggatcgctt gagaagcadc actgtaccgt gaaactggag tttgccgggg
ctgcagggtc agcaaaatcg gctcgggaa cagccagtca cgtttccatt tttgcatgg tcatcggtg tattggctct
atgcagctt gtgtcgcgtg a-----

La mutación se pudo deber a un polimorfismo natural o a un error en el proceso de obtención del gen. Este cambio de base generó una lisina en lugar de ácido glutámico en la secuencia proteica traducida. Independientemente del origen de la mutación, la modificación ocurrió en una zona compartida entre P30c y P30L, cambiando un AA con carga negativa por otro con carga positiva. Esto pudo generar modificaciones conformacionales en esa zona de la estructura tridimensional, como también cambios en la interacción con Acs. Sin embargo, se consideró que no se afectarían las características antigénicas de la molécula, ya que ambos AAs no pertenecen a los grupos de AAs más antigénicos o al de los menos antigénicos⁷ (Rubinstein y col., 2008; Sun y col., 2011), por lo que igualmente se trabajó con esta secuencia.

P30L:

-----cca cttactctc aagtgccta aaacagcgtc cacagagcct cccactctg cgtactcacc caacaggcaa
atctgccag cgggtactac aagtagctgt acatcaaagg ctgtaacatt gagtccttg attcctgaag cagaagatag
ctggtggagc ggggattctg ctagtctcga cacggcaggc atcaaacctca cagttccaat cgagaagtc cccgtgacaa
cgcagacggt tgtggtcggg tgcatcaagg gagacgacgc acagagttgt atggtcacgg tgacagtaca agccagagcc
tcatcggtcg tcaataatgt cgcaaggtgc tctacggtg cagacagcac tcttgtcct gtcaagttgt ctgcggaagg
accactaca atgaccctcg tgtcgggaa agatggagtc aaagttctc aagacaaca tcagtactgt tccgggacga
cgctgactgg ttgcaacgag aaatcgttca aagatatttt gccaaaatta actgagaacc cgtggcaggg taacgcttcg
agtgataagg gtgccacgct aacgatcaag aaggaagcat ttccagccga gtcaaaaagc gtcattattg gatgcacagg
gggatcgctt gagaagcadc actgtaccgt gaaactggag tttgccgggg ctgcagggtc agcaaaatcg gctcgggaa
cagccagtca cgtttccatt tttgcatgg tcatcggtg tattggctct atgcagctt gtgtcgcg--

⁷ Los AAs más frecuentes en epitopes son triptófano, tirosina, arginina e histidina. Los menos frecuentes son cisteína, alanina y valina

Esta secuencia no tuvo ninguna modificación respecto a la de referencia. En verde se muestra un primer nucleótido que pertenece a la secuencia original, pero como estuvo en la última posición del codón formado también con los 2 primeros nucleótidos del vector, codificó una isoleucina en lugar de la asparagina que correspondería.

Comparando con los otros antígenos, P30c y P30L tuvieron una expresión más débil. Es decir que, bajo las mismas condiciones de inducción, se generó menor concentración de proteína. En la figura 157 se muestra un PAGE de diferentes lisados de células que indujeron P22c, P22L, P30c, P30L, P35A y P35B. En la figura 64 se muestra un PAGE de proteínas obtenidas de células que indujeron P30c (A), P30L (B), células sin inducir (C) y un MPM, corroborándose la expresión de las proteínas recombinantes

P30c y P30L se expresaron de modo soluble en cantidades que pudieron ser utilizadas para los fines propuestos. La figura 65 muestra un PAGE de proteínas obtenidas de células que indujeron P30C (C) y P30L (L), el precipitado (P) y el sobrenadante (S) luego de centrifugar el producto del sonicado inicial de células que indujeron los Ags. Se observó que en ambas fracciones se encontraba el Ag inducido.

La extensión de la estructura primaria de P30c y P30L, considerando la TrxA y los demás AAs que los vectores de expresión les incorporaron, fue de 331 y 303 AAs respectivamente. Sus masas moleculares totales fueron de 34,73 y 31,74 KDa. La secuencia de P30c resultó de mayor tamaño que la secuencia de P30L, sólo por los polipéptidos que se le incorporaron del pET-32a. Pero a pesar de que sus masas moleculares difirieron, corrieron prácticamente a la misma altura en un PAGE (figuras 64 y 65).

A continuación se muestran las secuencias aminoacídicas que se expresaron. En color rojo las secuencias de los Ags de interés, en color verde la secuencia correspondiente a TrxA, en color amarillo las regiones de poli-histidina y subrayado se muestran los AAs mutados durante el proceso en P30c, donde

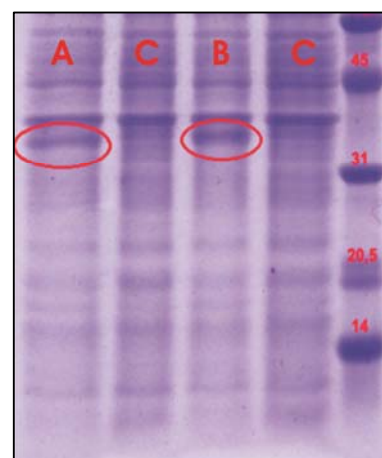


Figura 64: PAGE de proteínas de células que indujeron P30c (A), P30L (B), ninguna proteína recombinante (C) y MPM.

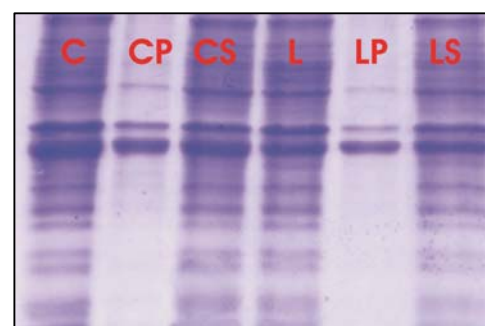


Figura 65: PAGE de proteínas obtenidas de células que indujeron P30c (C) y P30L (L). También se observa muestras con el precipitado (P) y el sobrenadante (S) luego de centrifugar el producto del sonicado inicial de células que indujeron los Ags.

entre paréntesis se indica el AA original.

P30c:

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMI
 APILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFK
 NGEVAATKVGALSCKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHHHHSSG
 LVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTD DDDDKAMADIGSM
 VTVTVQARASSVVNNVARCSYGADSTLGPVKLSA K(E)GPTTM
 TLVCGKDGVKVPQDNNQYCSGTTLTGCNEKSFKDILPKLTENP
 WQGNASSDKGATLTIKKEAFP AESKSVIIGCTGG SPEKHHCTV
 KLEFAGAAGSAKSAAGTASHVSIFAMVIGLIGSIAACVA

P30L:

MRGS HHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWIHF
 TLKCPKTALTEPPTLAYSPNRQICPAGTTSSCTSKAVTLSSLIPE
 AEDSWWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFVVGCIKGGD
 AQSCMVTVTVQARASSVVNNVARCSYGADSTLGPVKLSAEGP
 TTMTLVCGKDGVKVPQDNNQYCSGTTLTGCNEKSFKDILPKL
 TENPWQGNASSDKGATLTIKKEAFP AESKSVIIGCTGG SPEKH
 HCTVKLEFAGAAGSAKSAAGTASHVSIFAMVIGLIGSIAACVA
 PRSTCSQA

En P30L, las secuencias no pertenecientes al gen original fueron de poca extensión comparadas con el largo del gen insertado y con las secuencias de los otros Ags trabajados en esta tesis (P30c, P22c, P22L, P35A y P35B).

Ambas secuencias tuvieron una única región de poli-histidina adelante del gen de interés, pero en el caso de pET-32a, estuvo entre medió de TrxA y P30c.

2.1.3. Purificación de los antígenos

2.1.3.1. Antígeno P30c

P30c se purificó con el protocolo basal, pero se obtuvo poca cantidad de Ag y con mucha contaminación. Por lo tanto, se agregó urea a las soluciones de purificación acorde a lo detallado en el punto 1.2.3.4. en Materiales y Métodos. En la figura 66 se observa el PAGE de la mayoría de las muestras obtenidas. La flecha roja muestra la banda correspondiente a P30c. Sólo la fracción 500-1 pudo utilizarse tal como se obtuvo. Las demás debieron ser re-purificadas, por no

cumplir con el criterio de pureza indicado en el punto 1.2.3. de Materiales y Métodos. No obstante, las fracciones de esa re-purificación tampoco fueron satisfactorias.

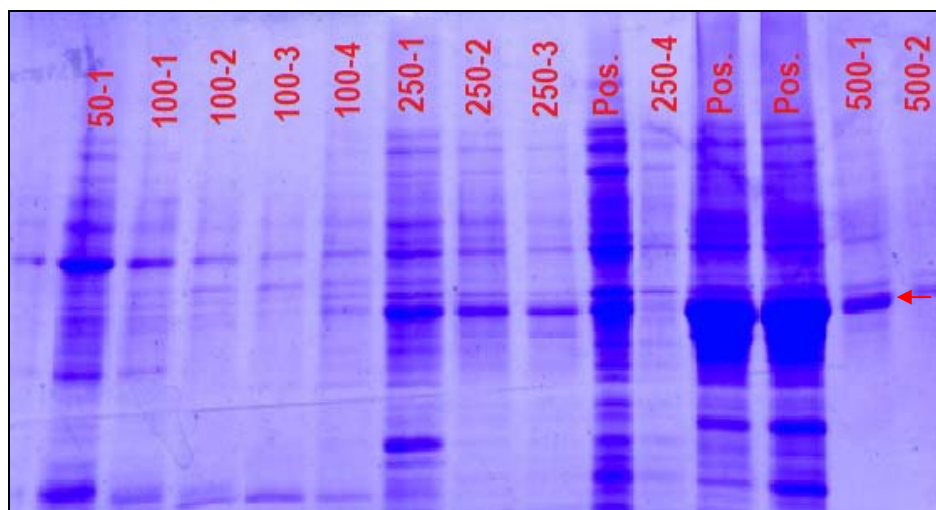


Figura 66: PAGE de la mayoría de las muestras luego de purificar P30c con el protocolo basal agregando urea. "Pos." corresponde a un lisado de células que indujeron exitosamente P30c. Con la flecha roja se indica la posición a la que corrió la proteína recombinante..

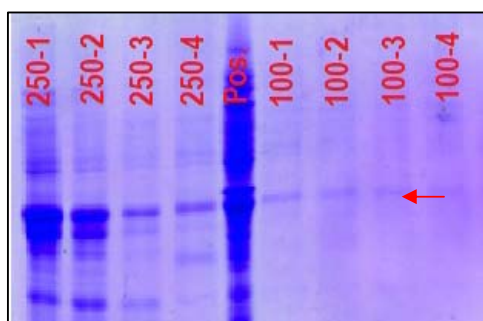


Figura 67: PAGE de varias muestras de P30c purificada con el protocolo basal, agregando urea y empleando mayor volumen de solución de elución y columna de purificación

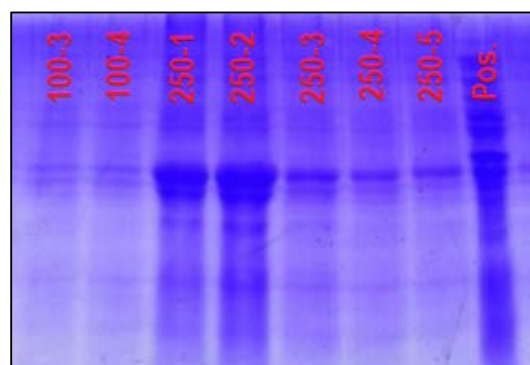


Figura 68: PAGE de varias muestras resultado de purificar P30c con el protocolo basal empleando urea y utilizando mayores volúmenes de elución y columna de purificación. Aumentando además la concentración de imidazol y agregando EDTA en la solución inicial. "Pos." fue un control positivo del Ag y de la posición a la que corrió. Éste correspondió aun lisado de células que indujeron exitosamente.

Luego se probó aumentar el volumen de columna de purificación y el de las soluciones de elución; para adherir mayor cantidad de Ag a la columna e incrementar los volúmenes de las soluciones de lavado (eliminando más las impurezas), respectivamente. En efecto, se obtuvieron mayores cantidades de fracciones más puras y con mayor Ag. En la figura 67, se muestra el PAGE tras la purificación y la flecha roja indica la posición del Ag. Las fracciones 250-1 y 250-2 se re-purificaron y las 250-3, 250-4, 100-1 y 100-2 se emplearon tal como se obtuvieron.

Finalmente, a la solución de lisado bacteriano con la inducción del Ag se le agregó EDTA 0,5 M (para capturar cationes cofactores de proteasas y poder incrementar la concentración de la proteína de interés) y se aumentó la concentración de imidazol a 35 mM (para incrementar la competencia del imidazol con las impurezas). No obstante, no se consiguió una gran mejoría. Aunque se obtuvo mayor cantidad de eluciones con Ag en concentración útil, 100-1, 500-1 y todas las 250. La figura 68 muestra algunas fracciones de esa purificación en un PAGE.

2.1.3.2. Antígeno P30L:

P30L también se purificó según el protocolo basal, pero se obtuvo poca cantidad de proteína y con mucha contaminación. La figura 69 muestra un PAGE de las únicas eluciones que tenían P30L luego de la purificación. La flecha roja indica la posición del Ag.

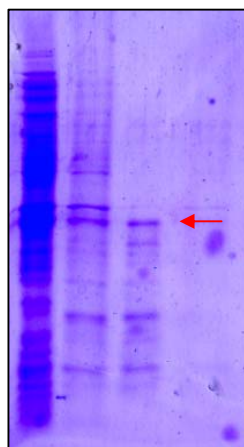


Figura 69: PAGE de muestras de P30L purificada según el protocolo basal, 2da y 3ra calle. La 1er calle es un lisado de células que indujeron exitosamente el Ag. La flecha roja indica P30c.

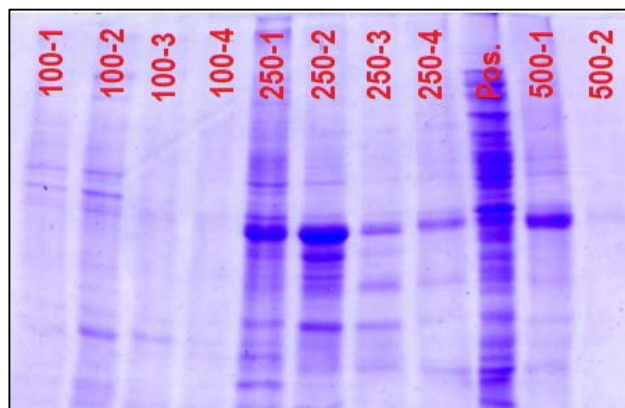


Figura 70: PAGE donde se observan la mayoría de las eluciones luego de purificar P30L habiendo agregado urea a las soluciones del protocolo basal. "Pos." fue un control positivo del Ag y de la posición a la que corrió. Éste correspondió aun lisado de células que indujeron exitosamente.

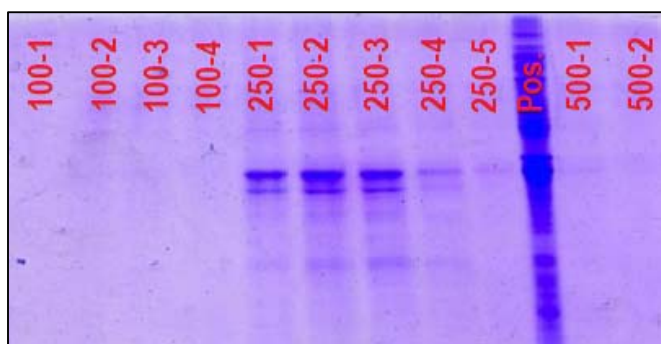


Figura 71: PAGE de eluatos obtenidos luego de purificar P30L agregando urea a las soluciones del protocolo basal y empleando una columna de purificación de 2,5 mL de volumen. "Pos." fue un control positivo del Ag y posición a la que corrió, fue un lisado de células que indujeron exitosamente

Luego se probó agregar urea a las soluciones de purificación acorde a lo descrito en el punto 1.2.3.5. en Materiales y Métodos. En la figura 70 se observan los resultados tras el nuevo tratamiento, habiéndose

obteniendo mayores cantidades del Ag, aunque aún con impurezas. La fracción 500-1 fue la única que se pudo emplear tal como fue obtenida.

Finalmente, se utilizó una columna de purificación de mayor volumen, 2,5 mL, por la misma razón que con P30c. Los resultados fueron satisfactorios, como se observa en la figura 71 que corresponde a un PAGE de las eluciones obtenidas luego de una purificación. Se obtuvieron 4 fracciones útiles (250-1, 250-2, 250-3 y 250-4) de 2,5 mL cada una, a diferencia de la anterior purificación donde sólo se obtuvo 1 mL (la de 500-1). Finalmente, comparando la purificación final (figura 71) con la primera (figura 69), se logró mayor relación de concentraciones Ag/impurezas.

P30c requirió una purificación más compleja comparada con P30L para alcanzar la eficiencia deseada. Contrariamente a P30L, P30c tuvo fusionada la proteína TrxA, proteína recomendada por mejorar la solubilización, plegado y purificación de las proteínas de interés (Terpe, 2006; Sørensen y Mortensen, 2005). En este caso ocurrió lo contrario, lo cual podría deberse a que la secuencia por la que se unía a la columna de purificación (la región de polihistidina) en P30c estuvo entre medio de dos proteínas, P30c y TrxA, pudiendo quedar parcialmente oculta; contrariamente a P30L donde estuvo en un extremo del Ag.

2.1.4. Evaluación de las diferentes secuencias de P30 mediante ELISAs

2.1.4.1. ELISA para detección de IgG

Se realizaron ELISAs indirectos para detección de anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii* empleando como antígenos P30c y P30L. Se ensayaron 58 SIA, 58 SIC y 64 SIN. Las D.O. promedios, los intervalos de las D.O. promedios con 90 % confianza y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 72 y 73, para P30c y P30L, respectivamente. Con P30L, las señales medias de los grupos resultaron en sentido creciente inverso a lo esperado. Cabe mencionar que de los 8 autores que emplearon P30 para detectar IgG (tabla 1), 3 observaron que el antígeno presentaba mayor reactividad con SIC que con SIA (Pfrepper y col., 2005; Santoro y col., 1985; Selseleh y col., 2012a). En este trabajo, con P30c y P30L los SIN dieron el mayor valor medio de D.O., indicando inespecificidad en la reacción. Considerando los IC, no se pudo asegurar con un 90 % de confianza que las señales de los grupos fueran diferentes dentro de cada Ag, excepto para P30L entre SIA y SIN. Pero pudo asegurarse con igual grado de confianza que todas las señales obtenidas con P30L fueron mayores que aquellas provenientes de P30c. Considerando que los ELISAs de ambos antígenos fueron ensayados en idénticas condiciones, esta diferencia podría corresponder a la mayor extensión de P30L respecto a P30c, permitiéndole tener algunos epitopes extra que, dado el aumento en la señal de los tres grupos de sueros, serían principalmente inespecíficos.

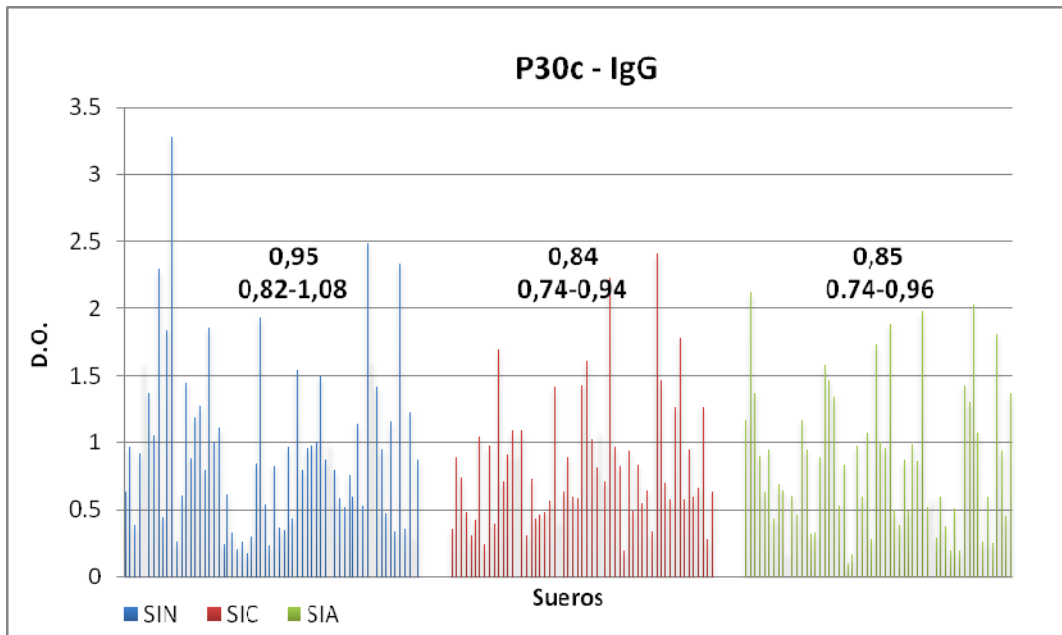


Figura 72: D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto detectando IgG específica, empleando el antígeno P30c. Sobre cada grupo de sueros se indican las D.O. promedio y los intervalos de las D.O. promedio con 90 % de confianza. Los grupos SIN, SIC y SIA se representan con barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

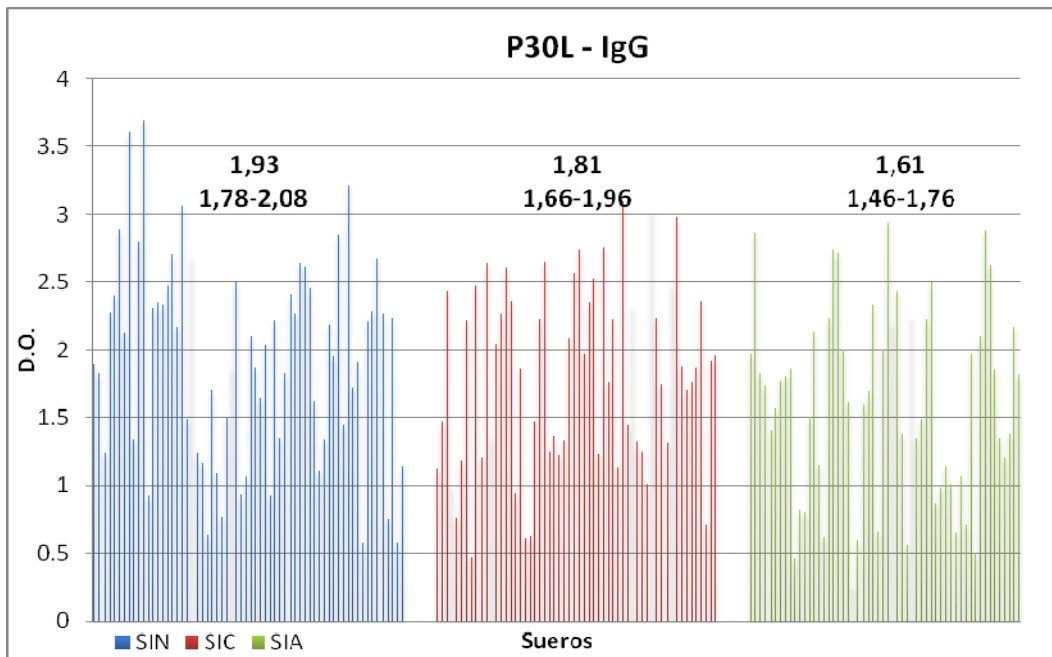


Figura 73: D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto detectando IgG específica, empleando el antígeno P30L. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedio y los intervalos de las D.O. promedio con 90 % de confianza. Los grupos SIN, SIC y SIA se representan con barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

Se evaluó la capacidad para discriminar entre "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 11 muestra los parámetros de comparación que se obtuvieron para cada tipo de discriminación. Observando los IC, P30c no diferenció mejor que el azar en ningún caso. Además, con este Ag la sensibilidad llegó hasta 15,5 % en "SIA contra SIC". Con P30L, los valores medios de áreas bajo las curvas ROCs dieron mayores que con P30c. Pero cabe señalar que si bien la diferencia entre

ELISA para IgG		Proteínas	
		P30c	P30L
SIA contra SIC	Valor umbral	0,29	2,22
	Sensibilidad	15,5	80,4
	Especificidad	94,7	36,8
	VPP	74,8	55,6
	VPN	52,4	52,3
	Área bajo la curva	0,504 0,414-0,594	0,576 0,487-0,664
SIP contra SIN	Valor umbral	0,74	2,10
	Sensibilidad	52,2	67,3
	Especificidad	60,9	48,4
	VPP	70,6	69,7
	VPN	41,5	45,6
	Área bajo la curva	0,541 0,465-0,616	0,579 0,506-0,653

Tabla 11: Parámetros de la discriminación entre los diferentes grupos mediante ELISA indirecto contra IgG específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indican el valor medio y el IC, con una confianza del 90 %.

los SIA y los SIC fue mayor con P30L que con P30c, la relación se invirtió, es decir que en P30c SIA tuvo la mayor D.O. pero con P30L fueron los SIP. Con ambos Ags los mayores valores de áreas medias bajo las curvas ROC fueron en "SIP contra SIN". Y según la clasificación de Tape, todos estos ensayos fueron *malos* (Tape, 2013).

Nigro y col. también detectaron IgG ensayando una secuencia idéntica a P30c y sus resultados tampoco fueron satisfactorios, obteniendo 8,3 y 86,4 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente (Nigro y col., 2003). En el presente trabajo, se incorporó a esta secuencia la proteína TrxA (a través del

cambio de vector) y se observó que la sensibilidad y especificidad mejoraron (tabla 11), aunque los cambios no fueron suficientes como para lograr una buena diferenciación entre las fases.

Nigro y col. también ensayaron una secuencia más extensa que P30c, pero sus resultados fueron aún peores que con la primera (Nigro y col., 2003). Pfrepper y col. también evaluaron IgG con una secuencia semejante a la P30 larga empleada por Nigro y col. y obtuvieron la mejor diferenciación de todos los trabajos en los que se detectó IgG, 72,3 y 91,5 % de sensibilidad y especificidad respectivamente, utilizando westernblot (Pfrepper y col., 2005). Estos resultados no se pudieron atribuir al vector empleado. Nigro y col. emplearon el vector pQE que no agrega proteína de fusión (Nigro y col., 2003) y Pfrepper y col. emplearon el vector pUC8 que sólo agrega segmentos de β -galactosidasa (ver punto 1.1.2. en esta misma sección; Pfrepper y col., 2005). Aubert y Selseh evaluaron una secuencia completa de P30 y sus resultados tampoco fueron buenos, ya que obtuvieron 88 y 73,2 % de sensibilidad y 4,8 y 24,8 % de especificidad, respectivamente (Aubert y col., 2000; Selseh y col., 2012a). Santoro y col. probaron una proteína P30 purificada del parásito obteniendo resultados similares, 13 % de sensibilidad y 93 % de especificidad. (Santoro y col., 1985). Araújo, Kotresha y Pietkiewicz, también realizaron sus respectivos ensayos para la detección de IgG específica con diferentes secuencias de P30 (figura 10), pero sin obtener resultados diferentes (tabla 1; Araújo y Ferreira, 2010; Kotresha y col., 2012; Pietkiewicz y col., 2004). Todos los trabajos citados evaluaron Ags que cubrieron la

mayor parte de la secuencia de P30, excepto Nigro y Araujo (figura 10; Nigro y col., 2003; Araujo y Ferreira, 2010), y todos tuvieron resultados similares, sin obtener buena discriminación entre las fases de infección de toxoplasmosis detectando anticuerpos IgG, excepto Pfrepper y col. (tabla 1; Pfrepper y col., 2005).

La cantidad de sueros empleados en los distintos trabajos fue diversa, pero en la mayoría los paneles superaron los 20 sueros, alcanzando las cantidades de 70 SIA y 74 SIC en el caso de Selseh y col. (tabla 1; Nigro y col., 2003; Pfrepper y col., 2005; Aubert y col., 2000; Selseh y col., 2012a; Santoro y col., 1985; Araújo y Ferreira, 2010; Kotresha y col., 2012; Pietkiewicz y col., 2004).

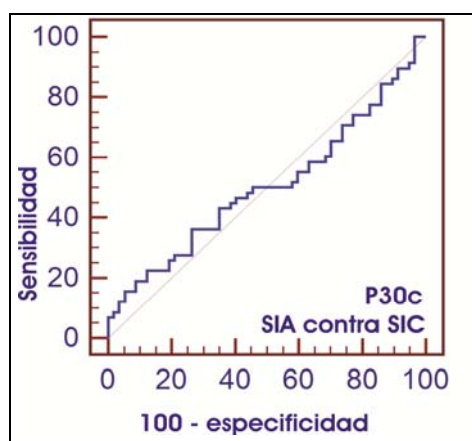


Figura 74: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P30c.

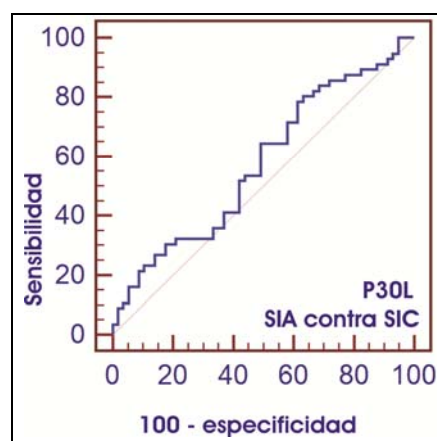


Figura 75: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P30L.

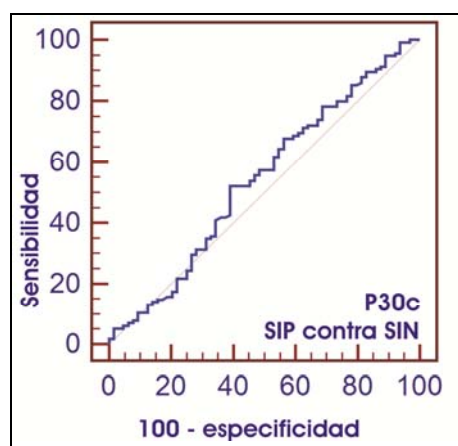


Figura 76: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P30c.

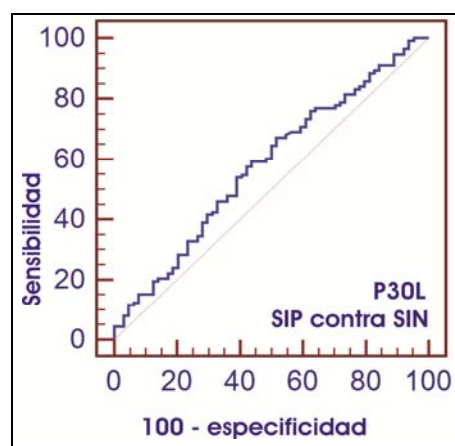


Figura 77: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P30L.

Las curvas ROC obtenidas para cada clase de discriminación se muestran en las figuras 74 y 76 para P30c y en las figuras 75 y 77 para P30L; diferenciando "SIA de SIC" y "SIP de SIN", respectivamente. Aquí también se evidenció el mal desempeño de los Ags. Por esta

dificultad para diferenciar las fases de la infección en estos ensayos, Selseleh y col. no proponen este Ag como marcador de fases de la infección (Selseleh y col., 2012a). Correspondiéndose con nuestros resultados, donde P30 obtuvo mayores valores puntuales de áreas bajo las curvas en "SIP contra SIN" en vez de "SIA contra SIC".

2.1.4.2. ELISA para detección de IgA

Se realizaron ELISAs indirectos para detección de anticuerpos IgA específicos contra *T. gondii* empleando como antígenos P30c y P30L. Se ensayaron 29 SIA, 41 SIC y 40 SIN. Las D.O. promedio, los intervalos de las D.O. promedio con 90 % de confianza y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 78 y 79, para P30c y P30L respectivamente. Sólo P30L ofreció valores medios de D.O. en el orden creciente esperado (SIA > SIC > SIN). Aun así, con cada Ag no se pudo asegurar con significancia estadística, que las D.O. de los grupos fueron diferentes. Si se pudo asegurar con 90 % de confianza que los sueros ensayados con P30L dieron mayores señales que con P30c. Al igual que con IgG, esta diferencia de reactividades podría atribuirse a la mayor extensión de P30L respecto a P30c, permitiéndole tener epítopes extras, en este caso, aparentemente específicos.

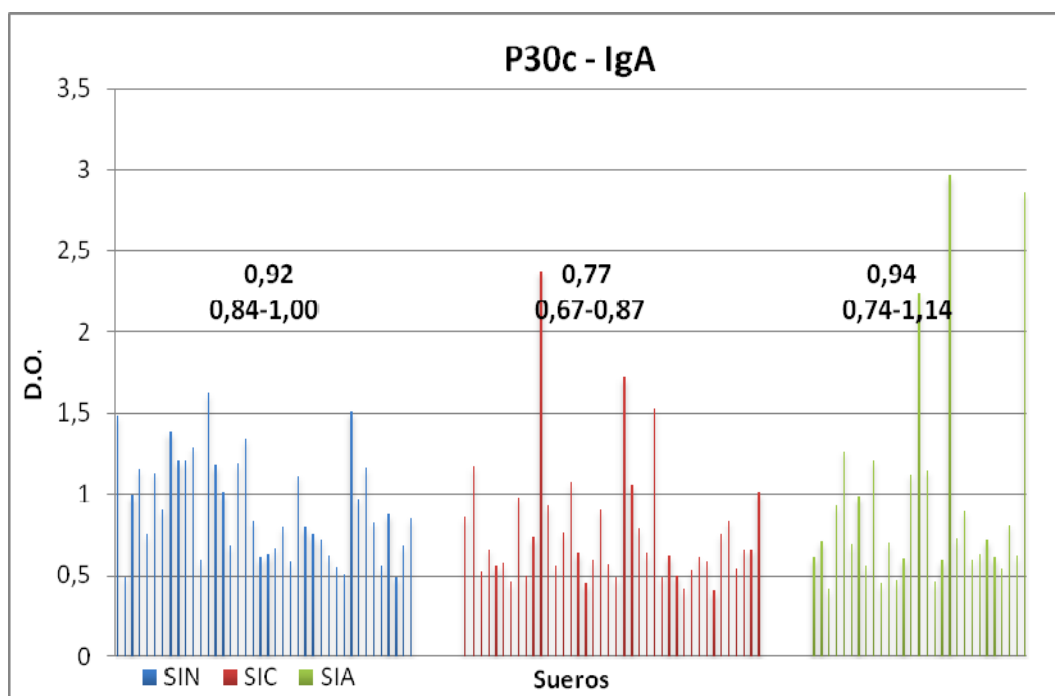


Figura 78: D.O. para todos los sueros ensayados en ELISA indirecto detectando IgA específica, empleando el antígeno P30c. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedio y los intervalos de las D.O. promedios para 90 % de confianza. Los grupos SIN, SIC y SIA se representan con barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

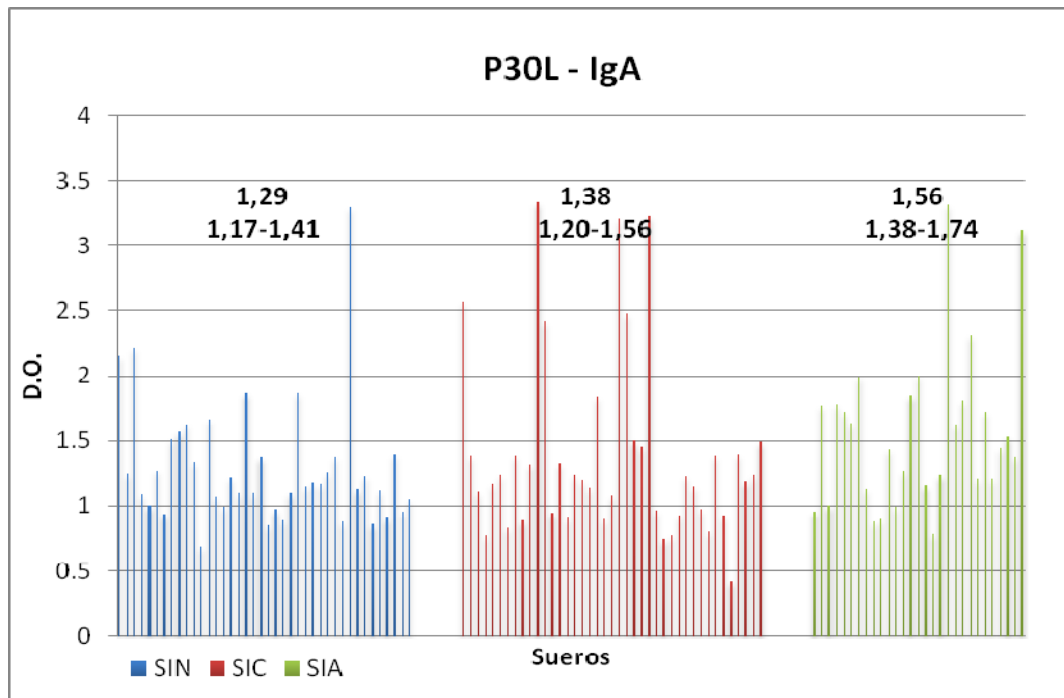


Figura 79: D.O. para todos los sueros ensayados en el ELISA indirecto detectando IgA específica, empleando el antígeno P30L. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedio y los intervalos de las D.O. promedio con 90 % de confianza. Los grupos SIN, SIC y SIA se representan con barras color azul, rojo y verde, respectivamente.

Se evaluó la capacidad para discriminar "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 12 muestra los parámetros de comparación para cada tipo de discriminación. Diferenciando entre SIA de SIC, P30L produjo mayor área bajo la curva ROC que P30c. Pero para diferenciar SIP de SIN, fue lo contrario. El mayor valor de área bajo la curva ROC fue con P30c en "SIP contra SIN". Nuevamente, los IC de las áreas de todas las diferenciaciones se superpusieron entre sí, por lo que no se pudo asegurar con 90 % de confianza que sean diferentes. Según la clasificación de Tape, los ensayos de "SIA contra SIC" con P30L y "SIP contra SIN" con P30c, dieron *débiles* (Tape, 2013).

ELISA para IgA		Proteínas	
		P30c	P30L
SIA contra SIC	Valor umbral	0,59	1,50
	Sensibilidad	79,3	48,3
	Especificidad	40,0	82,9
	VPP	48,9	66,6
	VPN	72,7	69,4
	Área bajo la curva	0,570 0,454-0,686	0,641 0,531-0,752
SIP contra SIN	Valor umbral	0,66	1,38
	Sensibilidad	53,6	42,9
	Especificidad	75	75
	VPP	78,7	75
	VPN	48,4	42,9
	Área bajo la curva	0,65 0,562-0,738	0,565 0,474-0,656

Tabla 12: Parámetros de la discriminación entre los diferentes grupos mediante ELISA indirecto contra IgA específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indican el valor medio y el IC, con una confianza del 90 %.

Los resultados con P30L fueron mejores que los obtenidos por Pfrepper y col., quienes ensayaron la secuencia más parecida a este Ag mediante westernblot, detectando IgA con 102 SIA y 71 SIC. Obtuvieron 2,9 y 100 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente. Pero nuestros resultados dieron muy inferiores a los obtenidos por Araújo y Decoster. Araújo y Ferreira obtuvieron 92 y 97,6 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente, mediante ELISA indirecto ensayando un pequeño péptido de P30 (Araújo y Ferreira, 2010). Y Decoster y col. ensayaron en dos trabajos mediante ELISA doble Sandwich una proteína P30 purificada de *T. gondii*, obteniendo 100 % de sensibilidad y especificidad (Decoster y col., 1988 y 1992).

Las curvas ROC para cada clase de discriminación se muestran en las figuras 80 y 82 para la P30c y en las figuras 81 y 83 para la P30L; diferenciando "SIA de SIC" y "SIP de SIN" respectivamente.

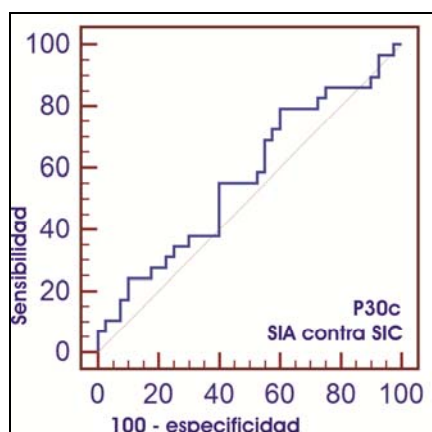


Figura 80: Curva ROC de discriminación entre "SIA y SIC" en el ELISA indirecto para detectar IgA empleando P30c.

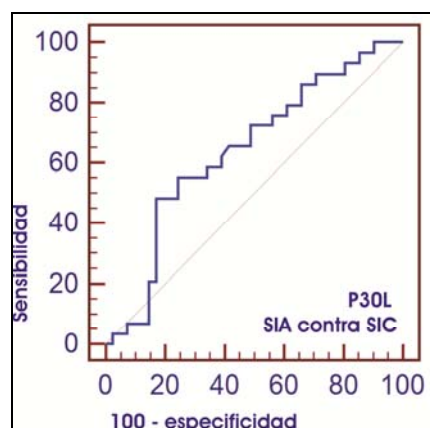


Figura 81: Curva ROC de discriminación entre "SIA y SIC" en el ELISA indirecto para detectar IgA empleando P30L.

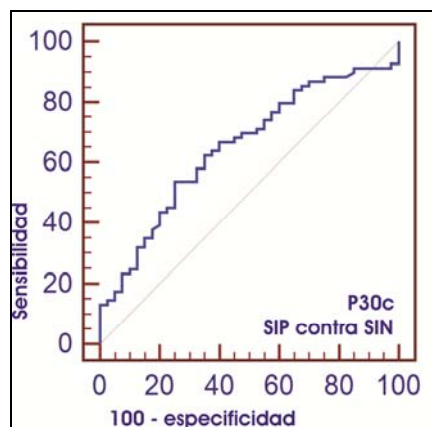


Figura 82: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto para detectar IgA empleando P30c.

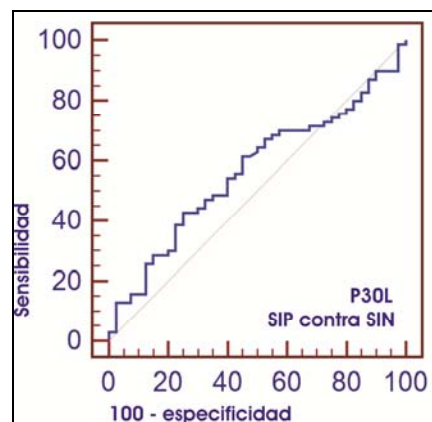


Figura 83: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA para detectar IgA empleando P30L.

2.1.4.3. Comparación entre inmunoensayos:

P30L siempre ofreció mayores áreas medias bajo las curvas ROC que P30c, excepto para diferenciar SIP de SIN con IgA. P30L también generó siempre mayores D.O. que P30c, que se correspondió con que tuvo una secuencia más extensa, pudiendo dar lugar a más epitopes que P30c. Si bien los procesos de purificación de cada secuencia no fueron iguales, no hubo diferencia en la aplicación de compuestos caotrópicos que desnaturalicen las proteínas. A su vez, P30c, tuvo una proteína de fusión y P30L no; pero esta proteína de fusión no tuvo reactividad contra los SIP (ver Anexo B), por lo que tampoco se podría atribuir la mayor reactividad a la TrxA. Según los ensayos con IgG, los epitopes extras de P30L serían epitopes inespecíficos pero según los ensayos con IgA, serían epitopes específicos. Para un mismo epitope no hay especificidad de isotipos de Acs (ver punto 1.5. de la Introducción), por lo tanto es probable que esta región extra que tuvo P30L tenga epitopes tanto específicos como inespecíficos.

La región de la secuencia en que se diferenciaban ambos antígenos fue entre las posiciones de AAs 75 y 170. Observando los IC, sólo se pudo afirmar con 90 % de confianza, que las discriminaciones superiores al azar fueron las de "SIP de SIN" con P30L detectando IgG; y las de "SIA de SIP" con P30L y "SIP de SIN" con P30c detectando anticuerpos IgA.

Nigro y col., que trabajaron con dos secuencias diferentes al mismo tiempo, detectaron únicamente anticuerpos IgG. Su secuencia más corta (idéntica a P30c) obtuvo mejores resultados que la más larga, pero aún así las reactividades de ambas secuencias fueron escasas (tabla 1; Nigro y col., 2003). En nuestro trabajo se le cambió el vector a la secuencia más corta, P30c, pero no se pudo obtener una buena discriminación entre las fases.

Diferenciando los estadios de la infección, la detección de IgA generó áreas bajo las curvas ROC superiores que cuando se detectaba IgG, en coincidencia con la bibliografía. Pfrepper y col. fueron los únicos autores que obtuvieron resultados satisfactorios detectando IgG (Pfrepper y col., 2005). Los demás autores tuvieron escasa discriminación entre las fases empleando este isotipo (Araújo y Ferreira, 2010; Aubert y col., 2000; Kotresha y col., 2012; Nigro y col., 2003; Pietkiewicz y col., 2004; Santoro y col., 1985; Selseleh y col., 2012a). Al analizar la tabla 1, se evidenció que con P30 (SAG1) sólo los ensayos para detectar los isotipos IgM e IgA tuvieron sensibilidades y especificidad superiores a 90 % (cuadros marcados en color gris). Otro dato interesante, fue que en todos esos trabajos se empleó P30 purificada del parásito (Cesbron y col., 1985; Decoster y col., 1988 y 1992; Santoro y col. 1985), excepto el de Araújo y Ferreira, que utilizó un péptido sintetizado químicamente (Araújo y Ferreira, 2010). Debido a la mayor reactividad que se ha informado con el isotipo IgG hacia SIC respecto a los SIA para P30, en varios trabajos, Selseleh y col. propusieron que esta proteína podría seguir expuesta al sistema inmune aún en la fase crónica (Selseleh y col., 2012a). Esta hipótesis cobra fuerza cuando se

observa que este Ag discrimina entre las fases solamente al detectar IgA o IgM, isotipos que son más específicos de fase aguda.

En este trabajo, no se evaluó P30 con IgM debido a los resultados poco satisfactorios que se obtuvieron en la detección de los otros isotipos de Acs con este antígeno.

Beghetto y Pfrepper analizaron el desarrollo de avidez con algunos sueros hacia este Ag y obtuvieron resultados prometedores (Beghetto y col., 2003; Pfrepper y col., 2005). Pero comparando en nuestros ensayos las D.O. de los SIN con los otros 2 grupos en IgG, las señales tuvieron IC superpuestos, indicando falta de especificidad en la reacción. Esta observación también desalentó llevar adelante la evaluación de la avidez de anticuerpos IgG hacia P30.

Detectando anticuerpos IgG se alcanzó una sensibilidad de 80,4 % y una especificidad de 36,8 % empleando P30L para diferenciar SIA de SIC. Resultados similares o apenas superiores a los otros trabajos que detectaron IgG, excepto al de Pfrepper y col. quienes obtuvieron una mejor discriminación (Pfrepper y col., 2005).

Al detectar anticuerpos IgA se alcanzó una sensibilidad de 48,3 % y una especificidad de 82,9 % empleando P30L para diferenciar SIA de SIC. Estos parámetros fueron de menor calidad que los obtenidos por todos los autores, exceptuando a Pfrepper y col. (Pfrepper y col., 2005).

Todas las proteínas recombinantes de P30 dieron resultados cuyas sensibilidades y especificidades en promedio no alcanzaron el 90 %, excepto las de Jalallou y col. (tabla 1; Jalallou y col., 2012). En general, no se expresaron regiones muy diferentes entre sí (figura 10). Contrariamente, todas las proteínas purificadas del parásito dieron buenos resultados (Cesbron y col., 1985; Decoster y col., 1988 y 1992; Santoro y col. 1985). Esto señala un problema de pérdida de antigenicidad en el proceso de obtención de P30 recombinante. P30 es un Ag cuyos epitopes son principalmente conformacionales, muchos de los cuales probablemente se pierdan al no poder replicarse la estructura nativa de la proteína durante el proceso de solubilización (Burg y col., 1988; Velge- Roussel y col., 1994; Nigro y col.; 2003). Selseleh y col. describieron que el vector de expresión es muy influyente en la solubilidad de P30 y plantearon que la pérdida de los epitopes estructurales sucede inmediatamente al obtener la proteína insoluble (Selseleh y col., 2012a). En consecuencia, las escasas diferenciaciones entre las fases de infección que se pudieron observar empleando P30, podrían atribuirse principalmente a los epitopes lineales. Por todo esto, varios autores afirmaron que la expresión de P30 en células bacterianas no generaría buen plegamiento, lo cual sugeriría la clonación de P30 en levaduras (Meek y col., 2003; Burg y col., 1988; Makioka y Kobayashi, 1991).

En el presente trabajo se agregó urea durante la purificación, compuesto que puede alterar las conformaciones de las proteínas. Las concentraciones de urea se diluyeron entre 10 y 100 veces (según la concentración de la fracción de la que se partía) durante la sensibilización de las

placas de ELISA, proceso en el cual se podría esperar que la proteína adquiriera su conformación más estable. Pero considerando las complicaciones particulares de P30 para el correcto plegado del Ag, es probable que este agregado de urea también haya favorecido la pérdida de antigenicidad.

2.2. Bioinformática

Si bien no se obtuvieron resultados satisfactorios en la discriminación de las fases de infección de toxoplasmosis, se realizó un análisis empleando herramientas *in silico* y mediante la amplia información bibliográfica que hay sobre P30. El objetivo de esto fue principalmente definir con mayor precisión las regiones antigénicas de la proteína y avanzar en la interpretación de los resultados obtenidos. Para este estudio se empleó la secuencia aminoacídica completa de 336 AAs de la proteína P30:

MSVSLHHFIISSGFLTSMFPKAVRRAVTAGVFAAPTLMS
FLRCGVMASDPPLVANQVVTCPKKSTAAVILTPTENHFTLKC
PKTALTEPPTLAYSPNRQICPAGTTSSCTSKAVTLSSLIPEAEDS
WWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFVVGCIKGDDAQSC
MVTVTVQARASSVVNNVARCSYGADSTLGPVKLSAEGPTTMT
LVCGKDGVKVPQDNNQYCSGTTLTGCNEKSFKDILPKLTENP
WQGNASSDKGATLTIKKEAFP AESKSVIIGCTGG SPEKHHCTV
KLEFAGAAGSAKSAAGTASHVSIFAMVIGLIGSIAACVA

2.2.1. Análisis de secuencia

Primero se procedió a estudiar la secuencia primaria con diferentes programas: Pfam, InterproScan, SMART, PSIPred y FPScan. Los datos obtenidos fueron utilizados para construir el modelo estructural de P30 y para inferir información sobre la antigenicidad.

El programa Pfam encontró 2 dominios SRS como los observados en P22 (en el punto 1.2.1. de esta misma sección se los describe). Uno fue desde la posición aminoacídica 55 a 176 y el otro desde la 185 hasta la 300 (figura 84). El primer dominio abarcó en su totalidad la secuencia en la que se diferenció P30c y P30L. El segundo dominio está incluido completamente dentro de P30c. El programa señaló 6 cisteínas en cada uno de estos dominios, las



Figura 84: Esquema de los dominios SRS encontrados por el Pfam en P30.

cuales forman puentes disulfuro entre sí del siguiente modo: 1ra-6ta, 2da-5ta y 3ra-4ta, en orden de aparición. P30 tendría 2 dominios SRS a través de los cuales formaría puentes disulfuros. También indicó que P30 forma un homodímero, correspondiendo con la información bibliográfica (Selseleh y col., 2012a; Araújo y Ferreira, 2010; He y col., 2002).

Empleando una aplicación del programa PSIPred se predijeron las estructuras secundarias a partir de la estructura primaria, para correlacionar con la estructura tridimensional que se construyó. En la figura 85 se muestran las predicciones obtenidas. Aparentemente, la secuencia de P30 que se empleó tiene 2 hélices α , una al principio y otra al final de la secuencia. Luego, utilizando los subprogramas del PSIPred, MENSAT-SVM y MENSAT3, se predijeron un péptido señal ubicado entre las posiciones de AAs 1 a 40 y una región transmembrana en la posición del AA inicial 314-316 y posición del AA final 333-334 (las posiciones exactas varían dependiendo del subprograma que se considere). Antes de unirse al GPI, P30 se encuentra en la superficie del parásito anclada a través del péptido carboxi terminal que atraviesa la membrana plasmática. Luego, la proteína se

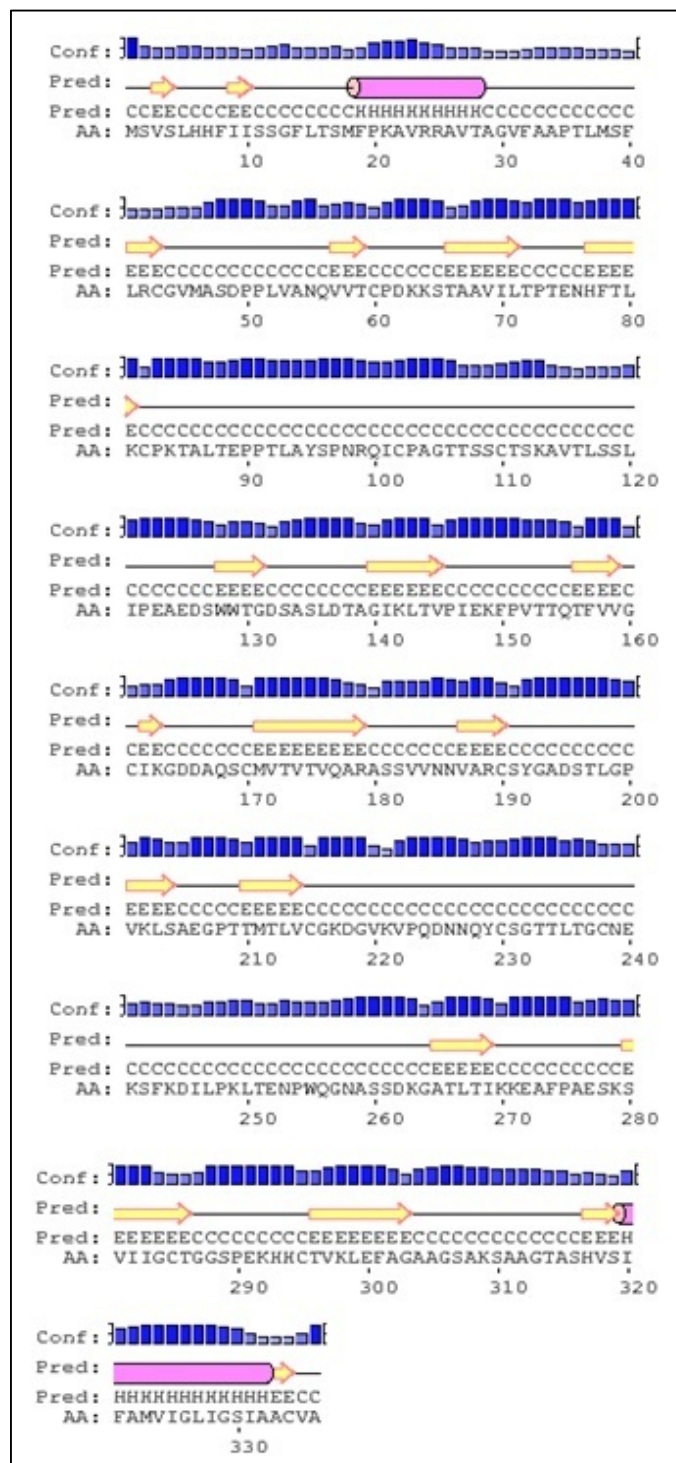


Figura 85: Estructuras secundarias de P30 predichas por el PSIPred. Donde Conf: confianza, Pred: predicción (C: cola, H: hélice α y E: Hoja plegada β).

Antes de unirse al GPI, P30 se encuentra en la superficie del parásito anclada a través del péptido carboxi terminal que atraviesa la membrana plasmática. Luego, la proteína se

ancla al gluco-fosfolípido. En algunas cepas, el péptido carboxi terminal no es eliminado y se mantiene unido a la membrana (Kato y col., 2007).

El programa FPScan encontró una huella perteneciente a los Ags de superficie del parásito *T. gondii*, detallada en la figura 86. La huella estuvo compuesta por 8 motivos de extensiones variables, entre 11 y 20 AAs, y a su vez 2 de ellos repetidos en la proteína (los números 2 y 7). En la figura, la altura de cada motivo indicó el porcentaje de identidad de secuencia. Casi todos ellos se encontraron dentro de las regiones correspondientes a los SRS, excepto el número 3 que se encontró en la secuencia intermedia entre los 2 SRS, y con un alto porcentaje de identidad de secuencia. Se apreció que dentro de cada domino SRS repetido hubo diferentes motivos, indicando la variabilidad de las secuencias y disminuyendo la posibilidad de que haya epitopes repetidos entre los dominios.

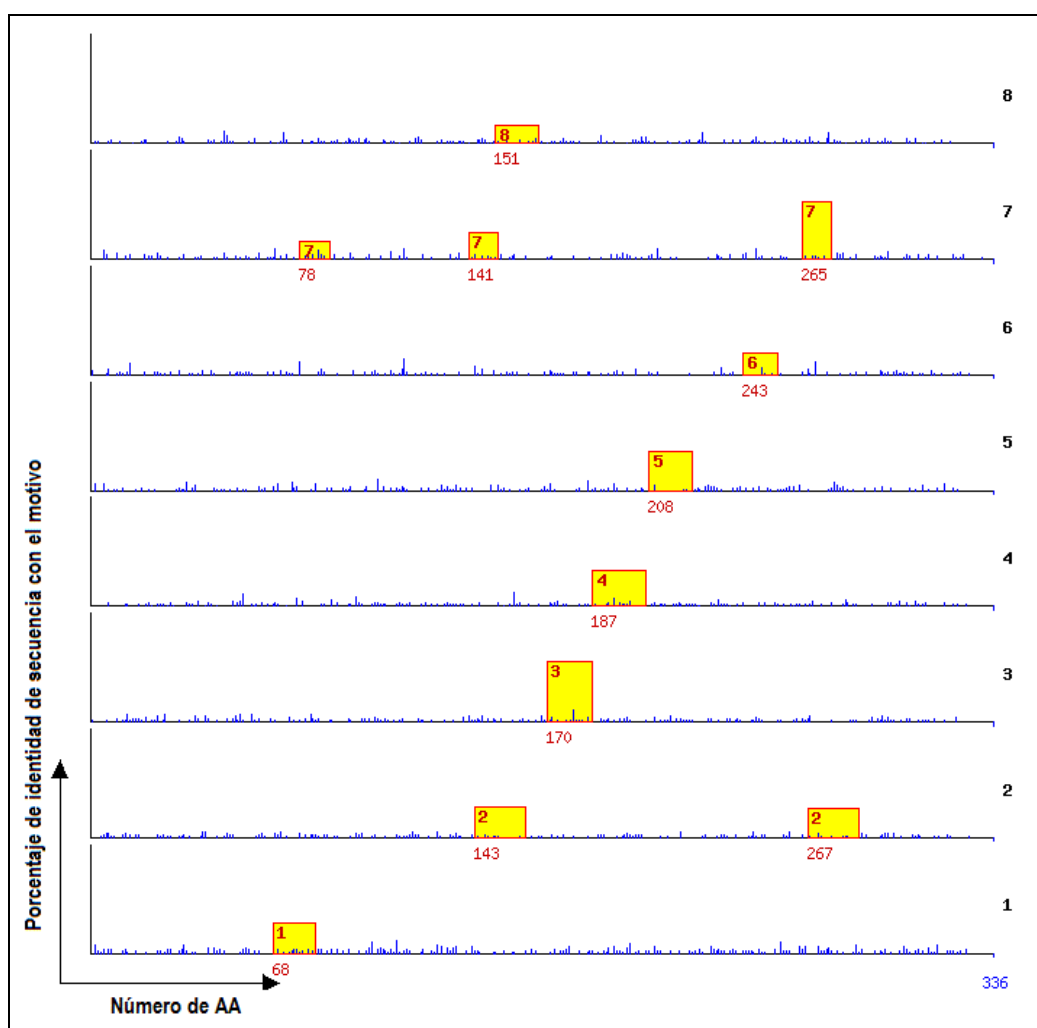


Figura 86: Motivos de la huella que FPScan encontró dentro de la secuencia de P30. En el eje X se esquematiza la estructura primaria. El eje Y se divide en los 8 motivos encontrados, señalando con la barra amarilla la posición en la estructura primaria. La altura de esta barra indica el porcentaje de identidad de secuencia con la proteína en estudio.

SMART detectó un dominio repetido 2 veces en la secuencia, uno ubicado entre los AAs 53 y 164 y el otro entre los AAs 183 y 288. Sus posiciones fueron similares a los dominios SRS definidos por el Pfam, por lo que se infirió que hizo referencia a esos mismos.

El programa InterProScan encontró los mismos dominios que el Pfam y el FPsScan. Los SRS los definió mediante 3 subprogramas diferentes que difirieron ligeramente en las posiciones iniciales y finales de los mismos. También encontró una secuencia péptido señal ubicada entre la posición del AA 1 hasta la del 47.

En función de los resultados de los programas, se podría afirmar que la secuencia péptido señal comienza en la posición aminoacídica 1 y termina entre la 40 y 47, coincidente con Kato y col. quienes mediante otro programa predijeron que se encontraba entre los AAs 1 a 46 (Kato y col., 2007).

La región que no se clonó en este trabajo fue la ubicada entre los aminoácidos 1 a 75, región que contiene al péptido señal y solamente entre 10 y 20 AAs (dependiendo del programa que se considere) del dominio SRS.

2.2.2. Búsqueda de las estructuras patrones para modelado

Si bien hay una secuencia de P30 cuya estructura tridimensional fue resuelta (He y col., 2002), ésta no tuvo exactamente la misma secuencia que la empleada en este trabajo, difiriendo principalmente en las regiones amino y carboxi terminal. Como las variaciones en las secuencias indican diferencias en las conformaciones, se procedió a modelar la secuencia completa de P30.

Empleando el programa Swiss-Model se buscaron estructuras patrones que sirvan como base del modelado. El resultado arrojado fue la P30 cuya estructura ya fue determinada por difracción de rayos X (figura 9, archivo PDB: 1kzqB), con una identidad de secuencia de 75,3 % con la secuencia a modelar. También se encontró la misma estructura cuando se buscó moldes para P22 (ver punto 1.2.2. en esta misma sección). No se buscó moldes por threading porque el encontrado mediante homología, tuvo un alto porcentaje de identidad de secuencia.

2.2.3. Modelado molecular

Empleando el programa Modeller y como molde la proteína P30, se obtuvieron 5 modelos estructurales de la secuencia completa de P30. En paralelo se obtuvieron 5 modelos más utilizando el programa de red I-TASSER. El primer modelo de este último tuvo el mejor valor de ANOLEA. Se observó que el molde escogido por I-TASSER para construir las nuevas estructuras fue el mismo archivo que el utilizado por Modeller (archivo PDB: 1kzqB). Por lo tanto, se eligió la primera estructura resultado del I-TASSER para seguir trabajando.

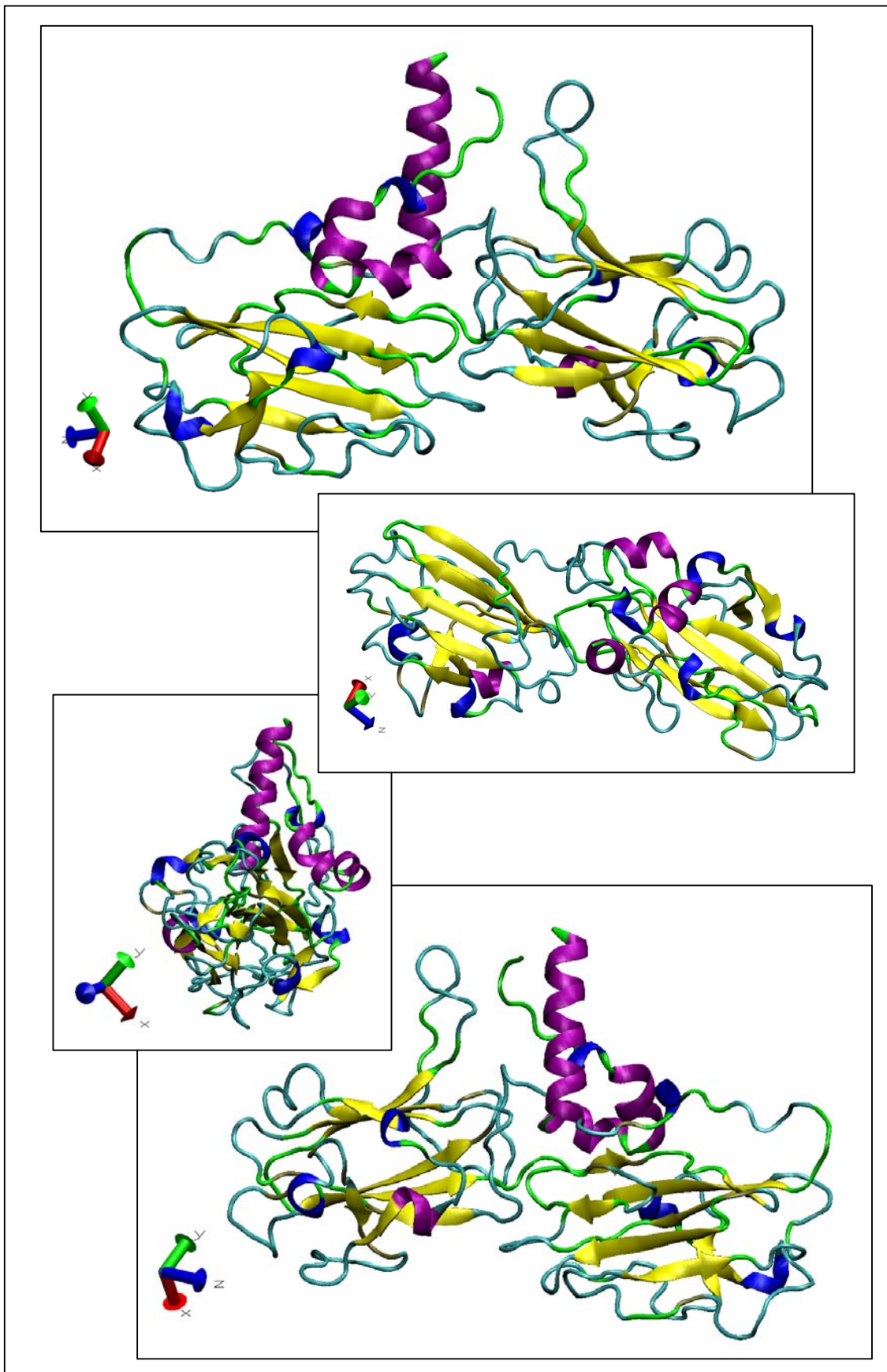


Figura 87: Diferentes perspectivas del modelo final de la estructura terciaria de P30. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

Empleando el programa Swiss-PDB Viewer se generaron los 6 puentes disulfuros señalados por el Pfam (ubicados en los AAs: 60-82, 102-110, 161-170, 190-215, 230-238 y 285-295) y se realizó una minimización de energía de interacción de la estructura de 66 pasos.

Con el programa LOBO se ajustaron los loops ubicados en las posiciones 1 a 10, 26 a 40 y 302 a 319, observando mejoras locales según Verify3D y mejoras globales según ANOLEA. Finalmente, se realizó otra minimización de energía de interacción de 134 pasos con Swiss-PDB Viewer.

Una vez obtenido el modelo final, se lo volvió a evaluar con los programas ANOLEA y Verify3D. El valor Z de energía normalizada fue 6,17 E/kT y el 94,95 % de la secuencia tuvo un valor mayor a 0,15, respectivamente. Comparado con la predicción de estructuras secundarias del PSIPred, fue similar excepto por varios pequeños giros de hélices que tiene el modelo final, alejados de los extremos en la estructura primaria.

En la figura 87 se muestran diferentes perspectivas del modelo final obtenido.

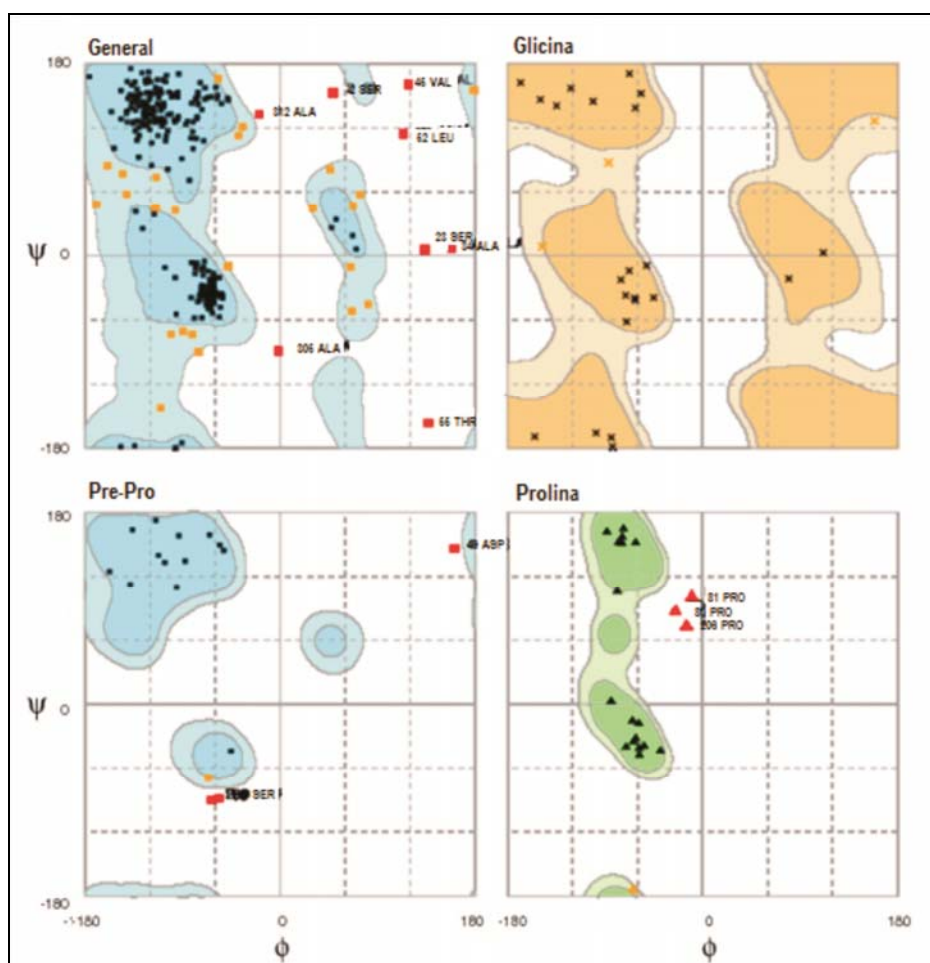


Figura 88: Mapa de Ramachandran del modelo final obtenido para P30. Está dividido en 4 submapas según los grupos de AAs que se consideren. Los puntos rojos fueron los AAs que se ubicaron en zonas del mapa prohibidas.

Mediante el programa Rampage se construyó el mapa de Ramachandran de la estructura final (Lovell y col., 2002) que se muestra en el figura 88. Se apreció que solamente 3 prolinas, 3 AAs anteriores a prolinas y 8 AAs del resto de la estructura tuvieron ángulos diedros poco comunes (Ramachandran y col., 1963), encontrándose en zonas prohibidas del mapa (puntos rojos). Fueron 14 AAs en total, que representan sólo el 4,16 % de la proteína, porcentaje inferior al máximo aceptado en la bibliografía (Danishuddin y col., 2011).

La estructura tridimensional de P30 se pudo dividir en 2 dominios estructurales, cada uno de los cuales estuvo constituido principalmente por una hoja plegada β (figura 87). Las mismas conclusiones fueron obtenidas con la estructura nativa de P30 (Graille y col., 2005).

2.2.4. Ubicación de regiones en la estructura conformacional de P30

En las figuras 89 y 90 se indican las regiones de P30c y P30L (respectivamente) sobre la estructura de P30, señalando en color negro las estructuras que no constituyeron los Ags. Se observó que P30c fue casi exclusivamente un dominio estructural. A su vez, en P30L hubo un dominio estructural completo, el mismo que en P30c, pero faltaron secuencias que pertenecieron al otro dominio estructural, lo cual podría haber dificultado el plegamiento correcto del mismo. También se apreció que en el extremo carboxi terminal se definió una hélice alfa (color púrpura) que comenzó en la posición del AA 320. El PSIPred predijo que la secuencia transmembrana comienza entre las posiciones de AAs 314 y 316. Ésta es la región que estaría introducida en la membrana citoplasmática del parásito y por la cual está anclada la proteína inicialmente (Mineo y Kasper, 1994).

En la figura 91 se muestran los dominios SRS sobre la estructura tridimensional de P30. Puede apreciarse claramente que cada dominio SRS se encuentra sobre un dominio estructural distinto.

Finalmente se buscaron todos los AAs que estuvieron expuestos en la superficie, empleando el programa Swiss-PDB Viewer. Para el análisis se empleó la estructura de P30 cristalizada, excepto para las regiones amino y carboxi terminal en cuyo caso se empleó el modelo que se construyó. El motivo de ello fue que la estructura modelada no formó el complejo homodimérico, que es conocido que *in vivo* si sucede (Selseleh y col., 2012a; Araújo y Ferreira, 2010), y que la interacción entre los monómeros disminuye la región expuesta a la superficie para interactuar con Acs en cada uno. Las secuencias encontradas estuvieron ubicadas en las posiciones de los AAs 1 a 7, 12 a 53, 59 a 74, 81 a 156, 163 a 168, 173, 179 a 208, 217 a 263, 268 a 280, 289 a 292 y 298 a 336. En la figura 92 se muestran las regiones expuestas sobre la superficie (en color anaranjado) sobre un esquema representativo de la estructura primaria de P30. Se pudo observar que no hubo regiones extensas sin ningún AA expuesto sobre la

superficie. La figura 93 muestra la estructura conformacional de P30 señalando en color gris los AAs que no se encontraron en la superficie.

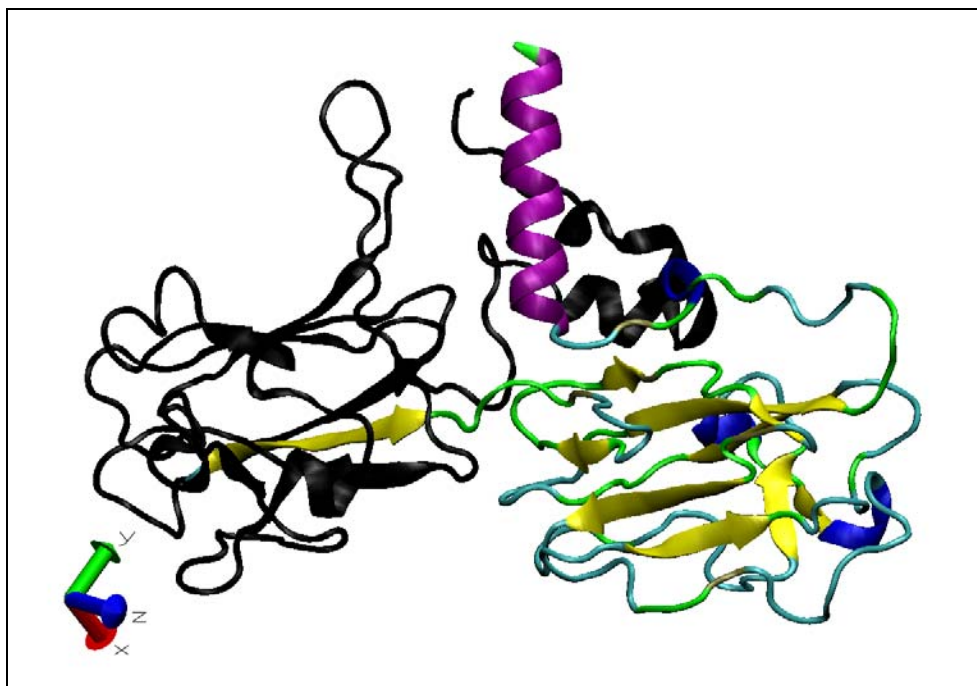


Figura 89: Se indica en color negro las regiones que no pertenecieron a P30c. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

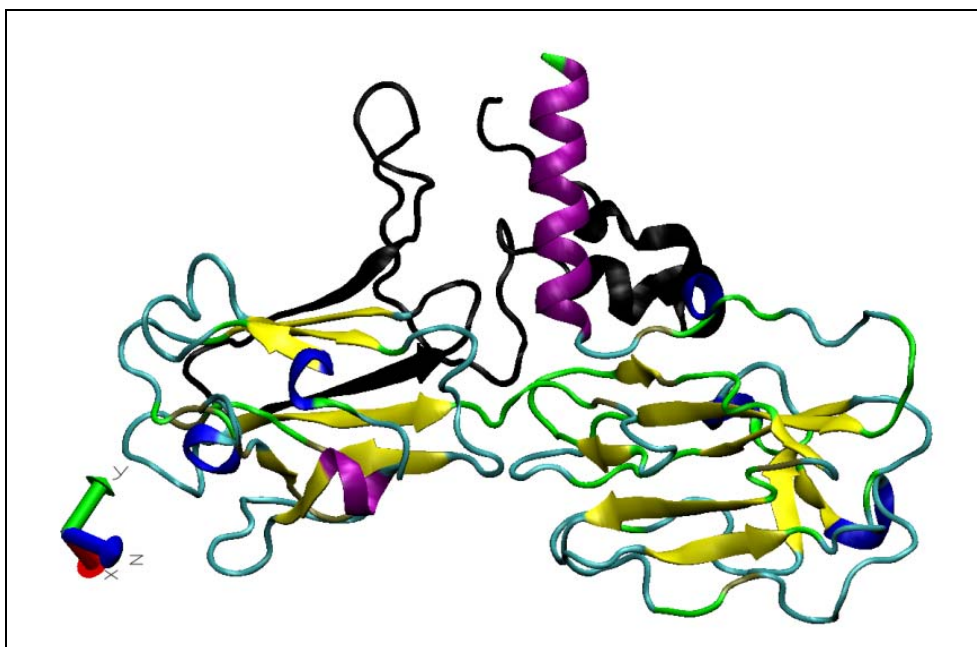


Figura 90: Se indican en color negro las regiones que no pertenecieron a P30L. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

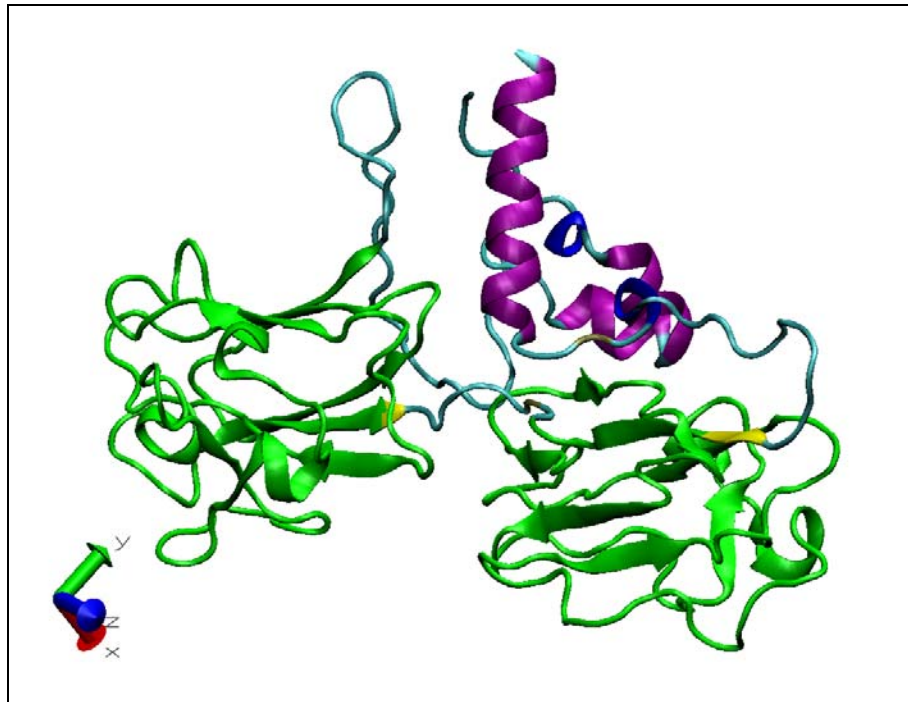


Figura 91: Dominios SRS ubicados sobre la estructura tridimensional de P30, en color verde. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop y coil: cian.



Figura 92: regiones expuestas sobre la superficie en color anaranjado, sobre un esquema representativo de la estructura primaria de P30

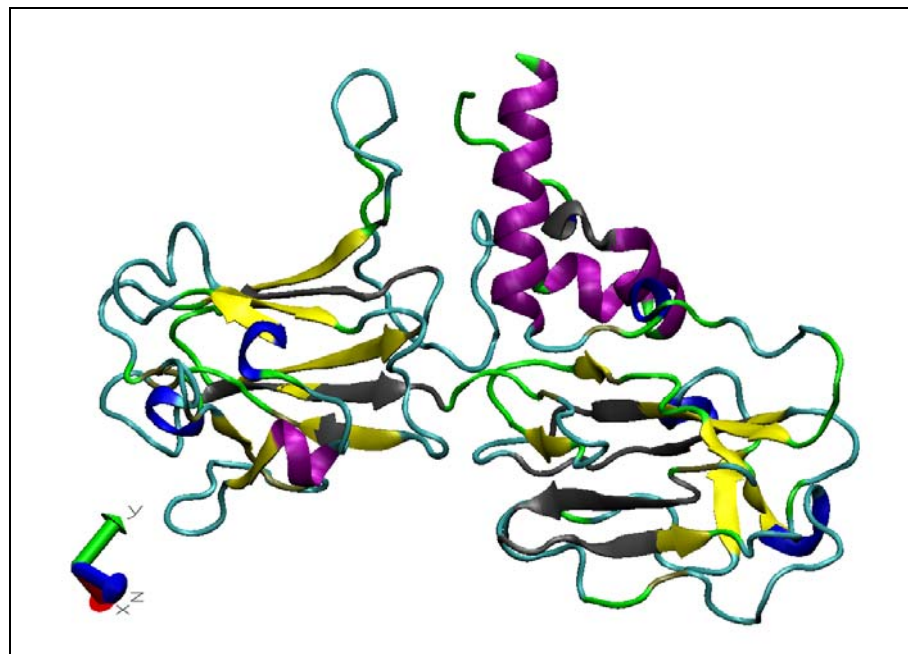


Figura 93: Regiones expuestas sobre la superficie. En color gris están las regiones ocultas. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

2.2.5. Información bibliográfica experimental sobre ubicación de epitopes

2.2.5.1. Epitopes de fase aguda de la infección: Según varios autores, un antígeno es de fase aguda cuando sólo se expresa en el patógeno en este estadio de la infección, es decir que la proteína sólo se encuentra presente cuando *T. gondii* está en la forma de taquizoíto (Lu y col., 2006; Aubert y col., 2000; Beghetto y col., 2003; Béla y col., 2008). Por lo expresado, en el presente trabajo se consideró que dentro de una misma proteína no hay epitopes de fase aguda o de fase crónica, ya que los epitopes no poseen características que los diferencien como de una fase u otra. Es propiamente la proteína la que se clasifica en función de su presencia en cada estadio. A pesar de esto, una proteína de fase aguda debería reaccionar también con SIC, ya que el sistema inmune de individuos con infección crónica fue estimulado contra esos Ags en la etapa aguda y es esperable que persista una memoria inmunológica. Sin embargo, como la exposición a los mismos no se mantiene en la fase crónica, la reactividad debería ser menor en esta última etapa. Por lo expuesto, realizar un mapeo de epitopes en una proteína de fase aguda con SIN versus SIP o SIC también aportaría información sobre la ubicación de epitopes útiles en el diagnóstico diferencial de las fases de la infección.

De todos los Ags de *T. gondii*, P30 fue el más estudiado por otros autores. Una clase de estudio que se le realizó, fue el mapeo antigénico. Éste se ha desarrollado dividiendo la proteína en numerosos péptidos superpuestos o no, pero que entre todos abarcaron la secuencia completa de la proteína. Luego se estudió la reactividad de los péptidos frente a sueros de individuos infectados con toxoplasmosis, generalmente detectando anticuerpos IgG, y se observó cuales presentaron mayor señal. Las reactividades de la mayoría de los péptidos individuales fueron bajas o nulas. Pero aquellos que presentaron las mayores señales, correspondieron a regiones donde se ubicaban 1 o 2 epitopes lineales. A continuación se citan los autores que realizaron estos estudios detallando las regiones antigénicas que encontraron (las posiciones de AAs de los péptidos encontrados, donde las regiones extensas fueron varios péptidos contiguos que presentaron reactividad) y la procedencia de los sueros que utilizaron para sus análisis:

Kato y col.: 48 a 136, 146 a 164 y 301 a 336; en sueros de ratones (Kato y col., 2007).

Maksimov y col.: 61 a 80 y 315 a 336; en sueros humanos (Maksimov y col., 2012).

Siachoque y col.: 101 a 120, 181 a 200 y 281 a 320, en sueros de ratones (Siachoque y col., 2006).

Cardona y col.: 241 a 280 y 301 a 320; en sueros humanos (Cardona y col., 2009).

Wang y col.: 106 a 120, 166 a 180, 289 a 300, 313 a 332; en sueros de cerdos (Wang y col., 2013).

Paralelamente, Graille y col. definieron un epítoto estructural, a partir de un complejo cristalizado, entre P30 y un Ac monoclonal. El epítoto estuvo constituido por los AAs ubicados en las posiciones 85 a 87, 89, 91, 92, 95, 98, 100, 109 a 115 y 162 a 164. Inclusive constataron como ese Ac monoclonal bloqueaba la interacción del Ag con Acs de sueros de pacientes con toxoplasmosis. La señal disminuyó tanto que afirmaron que ese epítoto es inmunodominante (Graille y col., 2005).

También cabe detallar el trabajo de Kato y col. Ellos dividieron P30 en 20 péptidos y observaron la reactividad de ellos contra Acs de sueros de ratones infectados con diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*. Descubrieron que diferentes cepas generaron reactividades contra distintas regiones, varias no polimórficas. Una de las regiones antigénicas que encontraron fue la carboxi terminal (región en la posición de AAs 301 a 336; Kato y col., 2007).

En la mayoría de las cepas, la región carboxi terminal es escindida en la posición del AA 310 antes de que se ancle la proteína al GPI (Mineo y Kasper, 1994; Kato y col., 2007), región que tampoco se encontró en la estructura de P30 determinada experimentalmente (He y col., 2002). A pesar de ello, esta región carboxi terminal mostró reactividad en casi todos los trabajos de mapeo antigénico (Kato y col., 2007; Maksimov y col., 2012; Siachoque y col., 2006; Cardona y col., 2009; Wang y col., 2013), corroborando su presencia en la superficie del parásito y exposición al sistema inmune, después de ser escindida.

2.2.6. Predicción de epítotos

Para predecir epítotos lineales se definió un puntaje antigénico mínimo de 1 en el programa AAPPred, encontrando de tal manera los epítotos ubicados entre las posiciones de AAs 201 a 218, 239 a 262 y 278 a 285 (figura 94); siendo el primero el que obtuvo el mayor puntaje. En la figura 95 se muestran la ubicación de los epítotos (en color rojo) en la estructura de P30. Los tres epítotos se encontraron en 1 de los 2 dominios estructurales, el próximo al extremo carboxi terminal y que fue completamente abarcado tanto por P30c como por P30L.

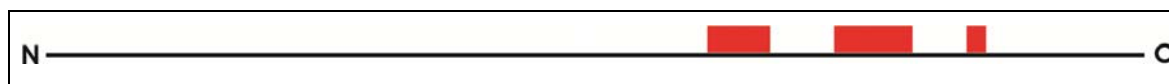


Figura 94: Esquema de la ubicación de los epítotos lineales en la estructura primaria de P30.

Mediante el modelo tridimensional de P30 y empleando el programa Discotope se predijeron los AAs antigénicos de epítotos estructurales de linfocitos B. Estos AAs estuvieron ubicados en las posiciones: 60 a 65, 83 a 84, 107, 108, 135, 137, 138, 163 a 169, 205, 206, 216, 260 a 262, 272, 290, 291 y 303 a 310 (figuras 96 y 97). Si bien el programa no los agrupó en epítotos estructurales, espacialmente se los pudo agrupar fácilmente en 3 epítotos (figura 97).

Uno de ellos, (posiciones: 60 a 65, 83 a 84, 107, 108, 135, 137, 138 y 163 a 169) se encontró aproximadamente en la región del epítopo estructural hallado por Graille y col., coincidiendo exactamente sólo los AAs 163 y 164 (Graille y col., 2005).

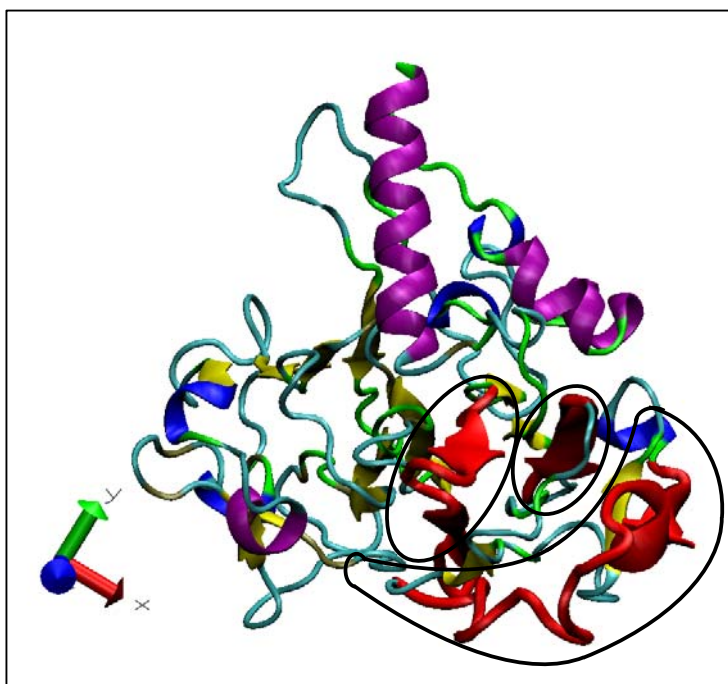


Figura 95: Ubicación de los epítopos lineales en la estructura terciaria de P30, secuencias color rojo encerradas en negro. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.



Figura 96: Esquema de la ubicación de los epítopos estructurales en la estructura primaria de P30.

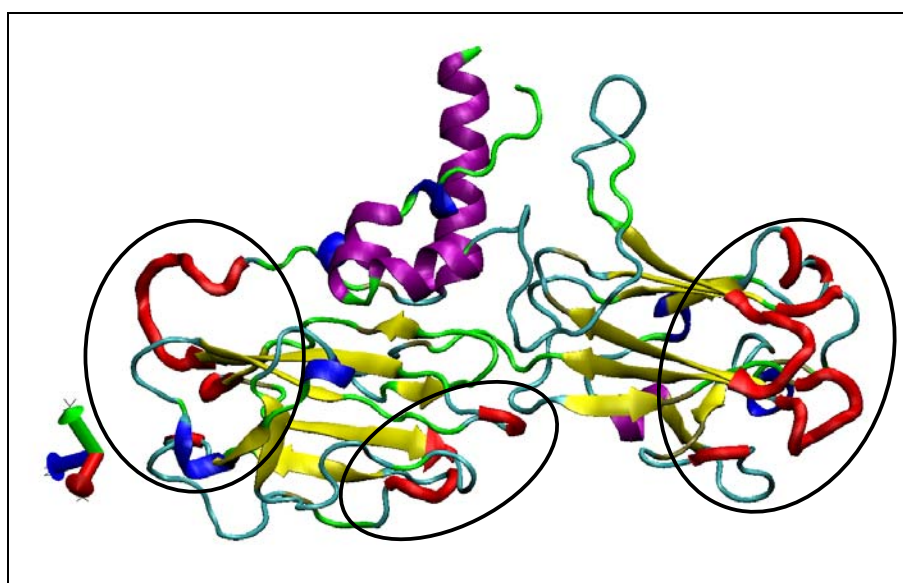


Figura 97: Ubicación de los epítopos estructurales en la estructura terciaria de P30, secuencias color rojo encerradas en elipses negras. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

2.2.7. Consenso sobre la ubicación de los epitopes

En función de los análisis *in silico*, de los datos experimentales y principalmente de la información bibliográfica; se definieron regiones antigénicas, donde cada una incluyó varios epitopes hallados experimentalmente. En la figura 98 se presenta un esquema de la ubicación de los epitopes definidos experimentalmente, predichos y de otras regiones de interés para ubicarlos sobre la estructura primaria de P30: los dominios SRS (*SRS*), las regiones expuestas sobre la superficie (*Superficie*), los epitopes lineales predichos (*E. lineales*), los epitopes estructurales predichos (*E. estructurales*), la secuencia de P30c (*P30c*), la secuencia de P30L (*P30L*) y los epitopes hallados experimentalmente por: Kato y col. (*Kato y col.*; Kato y col., 2007), Maksimov y col. (*Maksimov y col.*; Maksimov y col., 2012), Siachoque y col. (*Siachoque y col.*; Siachoque y col., 2006), Cardona y col. (*Cardona y col.*; Cardona y col., 2009), Wang y col. (*Wang y col.*; Wang y col., 2013) y Graille y col. (*Graille y col.*; Graille y col., 2005). En el esquema se señala aproximadamente mediante un recuadro rojo las 2 regiones antigénicas encontradas.

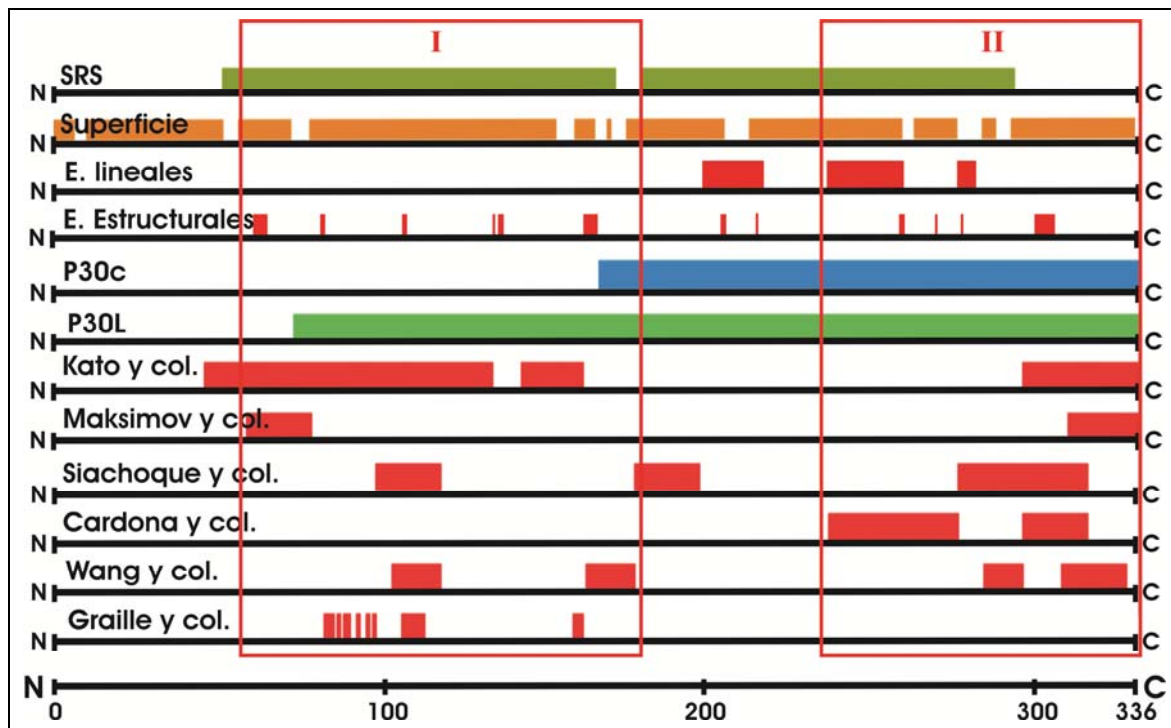


Figura 98: Esquema donde se muestran en color verde claro la ubicación de los dominios SRS (*SRS*); en color anaranjado las regiones expuestas sobre la superficie (*Superficie*); en color azul la secuencia expresada de P30c (*P30c*); en color verde oscuro la secuencia expresada de P30L (*P30L*); en color rojo los epitopes lineales predichos (*E. lineales*) y estructurales predichos (*E. estructurales*) y también se muestran en color rojo los epitopes descubiertos por: Kato y col. (Kato y col., 2007), Maksimov y col. (Maksimov y col., 2012), Siachoque y col. (Siachoque y col., 2006), Cardona y col. (Cardona y col., 2009), Wang y col. (Wang y col., 2013) y Graille y col. (Graille y col., 2005). En la última línea se señalan las posiciones de AAs de P30 completa. Los rectángulos transparentes con bordes color rojo muestran aproximadamente las regiones antigénicas.

Si bien P30 tuvo el mismo dominio SRS repetido dentro de su secuencia, cada cual conformó un dominio estructural distinto (figuras 91). Además, no presentaron los mismos epitopes (figura 98). Es decir que los mismos dominios presentaron gran disparidad en su

secuencia, en concordancia con los resultados encontrados por el programa FPScan, cuando señaló diferentes motivos en cada dominio.

Región antigénica I: Fue la región entre las posiciones de AAs **60 a 180**, mostrada en la figura 99. Puede apreciarse que prácticamente abarcó un dominio completo de los dos dominios estructurales. Incluyó casi toda la región del primer SRS, todo el primer epítipo estructural predicho (entre las posiciones de AAs 60 a 169) y la secuencia completa en que difirieron P30c de P30L (entre las posiciones de AAs 75 y 170). Esta región fue definida principalmente por los siguientes epítipes determinados experimentalmente: 2 por Kato y col. (el completo entre las posiciones de AAs 146 a 164; Kato y col., 2007), 1 por Maksimov y col. (entre las posiciones de AAs 61 a 80; Maksimov y col., 2012), 1 por Siachoque y col. (entre las posiciones de AAs 101 a 120; Siachoque y col., 2006), 2 por Wang y col. (entre las posiciones de AAs 106 a 120 y 166 a 180; Wang y col., 2013) y el único epítipo estructural determinado por Graille y col. (entre las posiciones de AAs 85 y 164; Graille y col., 2005). La región fue determinada por el AA inicial del epítipo estructural predicho y el AA final del epítipo definido por Wang y col. Posiblemente, ésta sea la región antigénica que originó que P30L tuviese D.O. mayores que P30c. Tal vez, si el dominio estructural donde se encontraba hubiese estado completo, los epítipes conformacionales habrían adquirido las disposiciones espaciales correctas y P30L hubiese diferenciado mejor entre las fases de la infección de toxoplasmosis. *In vivo*, esta región antigénica se ubica en el dominio estructural que se encuentra más alejado de la membrana del parásito (Graille y col., 2005), dejándolo más expuesto a la interacción de Acs. Pero al mismo tiempo, por su superposición con el dominio SRS, algunos epítipes de esta región podrían ser comunes a otros microorganismos apicomplexas.

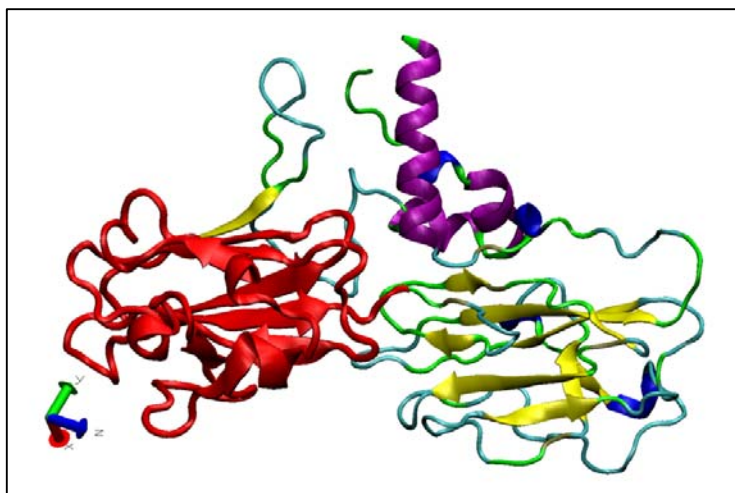


Figura 99: Ubicación de la región antigénica I, en color rojo, en el modelo de P30. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde.

Región antigénica II: Fue la región comprendida entre las posiciones de AAs **239 a 336**, tal como se señala en la figura 100. A diferencia de la región I, se encontró dentro de ambas secuencias, P30c y P30L. Abarcó las predicciones de 2 epítipes lineales (entre las posiciones de AAs 239 a 262 y 278 a 285) y las de AAs pertenecientes a los epítipes estructurales (entre las

posiciones de AAs 272 a 310). También abarcó los siguientes epitopes determinados experimentalmente: 1 por Kato y col. (entre las posiciones de AAs 301 a 336; Kato y col., 2007), 1 por Maksimov y col. (entre las posiciones de AAs 315 a 336; Maksimov y col., 2012), 1 por Siachoque y col. (entre las posiciones de AAs 281 a 320; Siachoque y col., 2006), 2 por Cardona y col. (entre las posiciones de AAs 241 a 280 y 301 a 320; Cardona y col., 2009) y 2 por Wang y col. (entre las posiciones de AAs 289 a

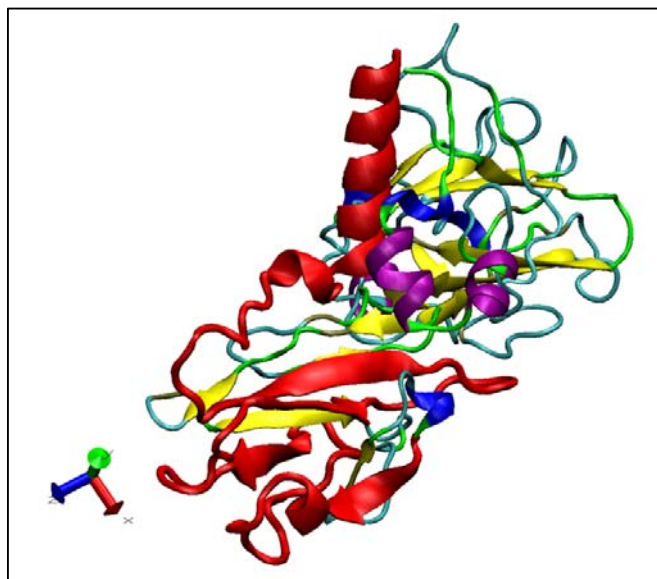


Figura 100: Ubicación de la región antigénica II, en color rojo, en la estructura tridimensional de P30. Código de colores de las estructuras secundarias: Hélice α : púrpura, hélice 3-10: azul, hoja plegada β : amarillo, loop: cian y coil: verde

300, 313 a 332; Wang y col., 2013). La región fue limitada por la posición inicial de uno de los epitopes lineales predichos y por la posición final de los epitopes descubiertos por Kato y Maksimov. Cabe señalar que la mayoría de los epitopes de esta región determinados experimentalmente, estuvieron fuera del dominio SRS. A pesar de los problemas de plegado que puede tener P30 al ser expresada en *E. coli*, estos factores pudieron estar atenuados en los epitopes estructurales de P30c, debido a que la región antigénica II estuvo enteramente contenida en un dominio estructural que aquí fue expresado completo.

En el presente trabajo se evaluaron 2 regiones de secuencias diferentes del antígeno P30 de *Toxoplasma gondii*. Una de ellas, P30c, fue evaluada anteriormente por Nigro y col. (Nigro y col., 2003). Aquí fue expresada en un vector diferente, que había mostrado resultados prometedores con una región distinta dentro de esta misma proteína por otro autor (Jalallou y col., 2012), pero no obtuvimos resultados muy diferentes a Nigro y col. en la diferenciación de fases. La otra región evaluada en este trabajo, P30L, brindó siempre mayores D.O. y una ligera mejoría en la discriminación entre las fases de la infección por toxoplasmosis detectando IgA. Si bien los procesos de purificación de cada región no fueron iguales, no hubo diferencia en la aplicación de compuestos caotrópicos que desnaturalicen las proteínas. A su vez, P30c, tuvo una proteína de fusión, TrxA, que P30L no. No obstante, ésta no tuvo reactividad contra los SIP (ver Anexo B), por lo que tampoco se podría atribuir alguna reactividad a TrxA. Por lo tanto, la

diferencia en los resultados de los Ags no pudo atribuirse ni a los diferentes procesos de purificación, ni a los vectores de expresión.

Del análisis *in silico*, se definió que la región que no fue expresada no contuvo solamente el péptido señal, pero también, que la mayoría de los epitopes estuvieron contenidos en P30c y P30L. La región antigénica II estuvo en ambas secuencias, y la región antigénica I principalmente en P30L. La diferencia en las reactividades entre los 2 Ags probablemente se debió a la región en la que se diferenciaron. Si bien el mayor problema para la distinción de las fases se supone que se originó por el plegado diferente de P30 en *E. coli*, el uso de P30L para el diagnóstico de la infección podría mejorarse incluyendo en este polipéptido las secuencias que completan el dominio estructural al que pertenece la región antigénica I.

3. Evaluación del antígeno P35

3.1. Resultados experimentales

Como se indicó en el punto 2.1. de la sección Objetivos, se dividió el ADN codificante completo de P35 en 5 regiones superpuestas: P35A, P35B, P35C, P35D y P35E. Estas 5 secuencias, más la secuencia completa de ADN codificante, P35T, fueron clonadas y evaluadas para encontrar las regiones antigénicas más propicias para la diferenciación de las fases de la infección de toxoplasmosis (figura 101).

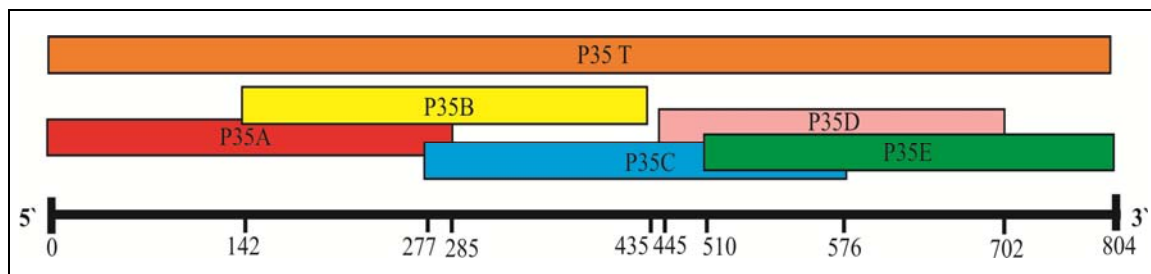


Figura 101: esquema del ADN codificante y de las regiones génicas obtenidas de P35.

3.1.1. Obtención de las secuencias de ADN

Se obtuvieron las secuencias codificantes amplificadas por PCR de P35A, P35B, P35C, P35D, P35E y P35T, a partir del ADN genómico total de *T. gondii*. Éstas fueron corridas en electroforesis de geles de agarosa para confirmar su presencia con la aparición de bandas del tamaño correspondiente a las de los genes buscados (tabla 13). Se obtuvieron amplificaciones inespecíficas, pero su concentración y tamaño no generaron complicaciones para continuar trabajando con las secuencias de interés, debido a que éstas fueron purificadas del gel de agarosa. La figura 102 muestra un gel donde se examinó una muestra producto de la PCR de P35T (calle derecha) al lado de un MPM (calle izquierda).

Antígeno	Extensión en pb	Extensión en AAs
P35A	285	95
P35B	294	98
P35C	303	101
P35D	258	86
P35E	294	98
P35T	801	267

Tabla 13: Extensión en AAs y pb de los Ags evaluados de P35.

El gen de P35 con el que se trabajó, coincidió 100 % con la región +139 a +943 de la secuencia AF150729 del NCBI, "ARNm de la proteína de gránulo denso GRA8 de *Toxoplasma gondii*, secuencia codificante completa". Si bien algunos autores emplearon una región parcial de P35 (Aubert y col., 2000; Li y col., 2000b; Hisczyjska-Sawicka y col., 2005; Babaie y col.,

2001), a la fecha, no se ha encontrado en la literatura evaluación de secuencias en posiciones similares a las de este trabajo para diferenciación de fases de toxoplasmosis. De todos los autores, Aubert, Li, Babaie y Hiszczyjska-Sawicka fueron quienes trabajaron con las secuencias más semejantes a la de P35B (figura 11; Aubert y col., 2000; Li y col., 2000b; Babaie y col., 2001; Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005). Mientras, otros autores emplearon secuencias que abarcaron casi todo el ADN codificante de la proteína, similares a P35T, pero retirándole las regiones amino y/o carboxi terminal (figura 11; Suzuki y col., 2000; Li y col., 2000a; Lu y col.; 2006).



Figura 102: Electroforesis en gel de agarosa con el producto de PCR de P35T (calle derecha) al lado de un MPM (calle izquierda). La flecha roja indica una secuencia de 500 pb de extensión.

3.1.2. Construcción del vector de clonado

Las 6 secuencias nucleotídicas amplificadas se introdujeron en el vector de clonado T Easy Vector y la cepa *E. coli* DH5 α .

A modo de ejemplo se presenta en la figura 103 un gel de agarosa con muestras luego de efectuada una corrida electroforética. Se observan dos muestras del vector de clonado con P35A (AN y BN) y a la izquierda las mismas cortadas con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Hind* III (AC y BC), donde se puede observar cómo se liberan las secuencias insertadas y desaparece la banda correspondiente al plásmido circular.

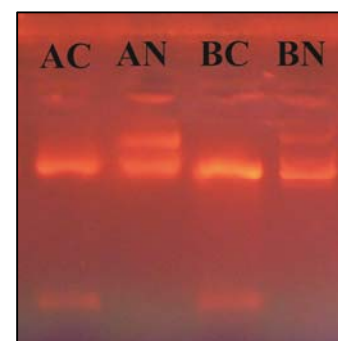


Figura 103: Electroforesis en gel de agarosa de dos muestras del vector de clonado con P35A (AN y BN) y al lado la misma muestra cortada con *EcoR* I y *Hind* III (AC y BC).

3.1.3. Clonado en distintos vectores de expresión e inducción de proteínas

Si bien la secuencia P35A se clonó en la cepa de expresión *E. coli* BL21 DE3, en los vectores pET32a, pET24a y pRSET B, sólo se logró expresar la proteína con éxito en el vector pET32a.

La secuencia P35B se clonó en los vectores pET24a y pET32a, en la cepa *E. coli* BL21 DE3. Nuevamente, la proteína sólo se expresó con éxito cuando el gen se encontraba en el vector pET32a.

Las secuencias P35C, P35D y P35E se clonaron en los vectores pET24a y pET32a, en la cepa *E. coli* BL21 DE3. También se clonaron en el vector pET32a en la cepa *E. coli* BL21 Rosetta. Bajo ninguna de las condiciones se lograron expresar estas proteínas.

Igualmente, la secuencia P35T se clonó en los vectores pET32a y pMal-c2X, en la cepa *E. coli* BL21 DE3, pero tampoco logró expresarse con ninguno de los 2 plásmidos

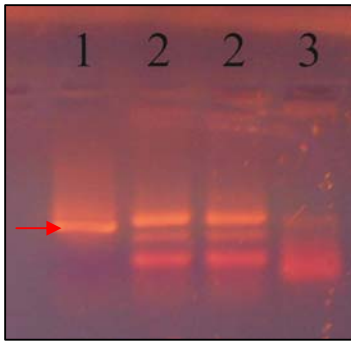


Figura 104: gel de agarosa donde se corrieron muestras productos de PCR realizados sobre las construcciones P35D-pET24a (1), P35B-pET24a (2) y el vector pET24a sin inserto (3).

A modo de ejemplo, en la figura 104 se muestra un gel de agarosa donde se corrieron muestras de productos de PCR realizadas sobre las construcciones P35D-pET24a (1), P35B-pET24a (2) y el vector pET24a sin inserto (3, control negativo), para corroborar la presencia de los insertos en los plásmidos. Tanto en las calles 1 y 2, se observó una amplificación de tamaño cercano a 300 pb (flecha roja) que no se encontró con la misma intensidad en el control negativo. También se observó que la secuencia amplificada de P35D corrió un poco más abajo que la de P35B, corroborando la diferencia de 36 pb entre ambos insertos. Este fue uno de los controles que se realizaron sobre las muestras para corroborar el éxito en la construcción del plásmido, previo a la secuenciación de los genes.

Ninguno de los plásmidos aquí empleados con P35 fueron utilizados por otros autores para expresar esta proteína, y a su vez, ellos usaron diferentes vectores entre sí (Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005; Li y col., 2000a y 2000b; Suzuki y col., 2000; Aubert y col., 2000; Lu y col., 2006; Babaie y col., 2011).

Las secuencias nucleotídicas finales insertadas en los vectores de expresión se muestran a continuación. En color rojo se señalan los nucleótidos que difirieron respecto de aquellos en las secuencias de P35 almacenadas en el NCBI, indicándose entre paréntesis cual es el nucleótido de la secuencia de referencia (AF150729). También se señalan subrayados los nucleótidos pertenecientes al codón de expresión. Las mutaciones se pudieron deber a un polimorfismo natural o a un error en el proceso de obtención del gen.

P35A:

```
atggctttac cattgcgtgc(t) ttcggccacg gtgttcgtgg tcttcgctgt ctttggtgta gctcgcgcca tgaacggctcc
tttgagttat catccaagca gttacgggagc gtcgtatccg aatccgagta atcctctgca tggaatgcc aagccagaga
accgggtgag accgcctcct cccggttcc atccaagcgt tattccaat cccccgtacc cgctgggcac tccagcgggc
atgccacagc cagaggttcc gccactc(t)cag catccccgc caacg----
```

La primera mutación cambió el AA valina por alanina. La segunda mutación fue silenciosa. Igualmente, se utilizó esta secuencia porque ambos AAs tienen grupos R hidrofóbicos de un tamaño no muy distinto y los dos son poco frecuentes en los epítopes de Acs (Rubinstein y col., 2008; Sun y col., 2011).

P35B:

-ggaatgccc aagccagaga acccggtag accgcctct cccggttcc atccaagegt tattccaat cccccgtacc
 cgctgggcac tccagcgggc atgccacagc cagaggtcc gccactcag catccccgc caacgggtc cctcccgcg
 gccgctccc agcctccata tccagtgggt actccagtaa tgccacagcc agagataccg cctgttcac ggccgccgc
 tccgggttc cgtcccgaag tggctcccg gccccgtat ccagtgggca ctcca-----

P35C:

-----ccgc caacgggtc cctcccgcg gccgctccc agcctccata tccagtgggt actccagtaa tgccacagcc
 agagataccg cctgttcac ggccgccgc tccgggttc cgtcccgaag tggctcccg gccccgtat ccagtgggca
 ctccaacggg catgccccag ccggagatac cggcagtca ccatc**a(g)**ttc cctacgta cgacaaccac gacagctgct
 cctcgtgctc tggttataa gattccctat ggagcgcgtg cccccccg tgcctcca gtcca----

Hubo una mutación pero fue silenciosa.

P35D:

----ccccag ccggagatac cggcagtca ccatccgtc cctacgta cgacaaccac gacagctgct cctcgtgctc
 tggttataa gattccctat ggagcgcgtg cccccccg tgcctcca gtccacccc gtagggccc gtagtatac
 agcactcag tccgggtgc aatccggcgt caaccggta ccaccaccac cactactcc cgaaactac tattcaggac
 agcggtagtg gctgcaatgg ca-----

P35E:

gctcctcgtg tgcgtgta taagattccc tatggagcgc ctgaccccc ccgtcctct ccagtccac cccgtatggg
 cccgagtat atcagcactc acgtcggggg tgcaatccgg cgtcaaccgc gtaccaccac caccactact tcccgaac
 tactattcag gacagcggta gtggctgcaa tggcagcagc cttgataacc ctgttcagac aaagacctgt gttatggag
 ggggtacgga tgttccaaa tctcactac agattcaccg taacagcga gaat-----

P35T:

atggcttac cattgcgtg tccggccag gtgtcgtg tctcctgt ctttggta gctcgcgcca tgaacggtcc
 tttgagttat catcaagca gttacggagc gtcgtaccg aatccgagta atcct**g(t)**gca tggaatgccc aagccagaga
 acccggtag accgcctct cccggttcc atccaagegt tattccaat cccccgtacc cgctgggcac tccagcgggc
 atgccacagc cagaggtcc gccactcag catccccgc caacgggtc cctcccgcg gccgctccc agcctccata
 tccagtgggt actccagtaa tgccacagcc agagataccg cctgttcac ggccgccgc tccgggttc cgtcccgaag
 tggctcccg gccccgtat ccagtgggca ctccaacggg catgccccag ccggagatac cggcagtca ccatccgtc
 cctacgta cgacaaccac gacagctgct cctcgtgctc tggttataa gattccctat ggagcgcgtg cccccccg
 tgcctcca gtccacccc gtagggccc gtagtatac agcactcag tccgggtgc aatccggcgt caaccggta

ccaccaccac cactacttcc cgcaaactac tattcaggac agcggtagtg gctgcaatgg cagcagcett gataaccctg
 ttcagacaaa gacctgtgtt catggagggg gtacggatgt ttccaaatct ccactacaga ttcaccgtaa cgacgcagaa t-----

La mutación generó arginina en lugar de leucina. Este cambio es significativo porque la arginina, a diferencia del AA correcto, es polar, más grande y es frecuente en los epitopes de Acs (Rubinstein y col., 2008; Sun y col., 2011). Pero como esta secuencia de P35T no pudo expresarse, no se intentó obtener otra secuencia sin ninguna mutación trascendente.

Todas las proteínas fueron inducidas mediante IPTG en concentración de 0,1 mM durante toda la noche a 20 °C. Cuando se evaluaron todas las condiciones explicitadas en el punto 1.2.1. de Materiales y Métodos, se observaron variaciones en las cantidades de proteína expresada en el caso de P35A y P35B, pero las proteínas que no se expresaron en la condición inicial tampoco pudieron inducirse en ninguna otra. La condición que generó mayor inducción fue IPTG 1 mM, a 37 °C, con un tiempo de inducción de toda la noche. Siempre se obtuvo mejor inducción con IPTG que con lactosa.

Carey y col. definieron la región transmembrana entre las posiciones de AAs 223 a 242 (nucleótidos 669 a 726; Carey y col., 2000). Babaie y col. reportaron que esta región disminuye fuertemente la expresión de la proteína completa en *E. coli* (Babaie y col., 2009). Esto podría explicar porque no se pudieron expresar P35T, P35D y P35E, secuencias que abarcan la región transmembrana, pero no así P35C. Sin embargo, observando las secuencias que han sido expresadas por otros autores (figura 11), ninguno expresó separadamente la región central o carboxi terminal de P35.

La extensión de la estructura primaria de P35A y P35B, considerando TrxA y los demás AAs que el vector de expresión les incorporó, fue de 275 y 278 AAs, respectivamente. A su vez, sus masas moleculares totales fueron de 29,50 y 29,68 KDa, respectivamente. En la figura 105 se observa un PAGE con muestras de células que indujeron P35A (A), una muestra con células sin inducir (B, control negativo) y un MPM, donde se apreció que el Ag corrió una distancia cercana a la teórica (flecha roja). En la figura 157 se muestra un PAGE con P35A y P35B junto a las otras proteínas clonadas. Ambas proteínas corrieron unos pocos KDa más arriba de lo esperado y P35B, particularmente, corrió como si tuviese 3 o 4 KDa más

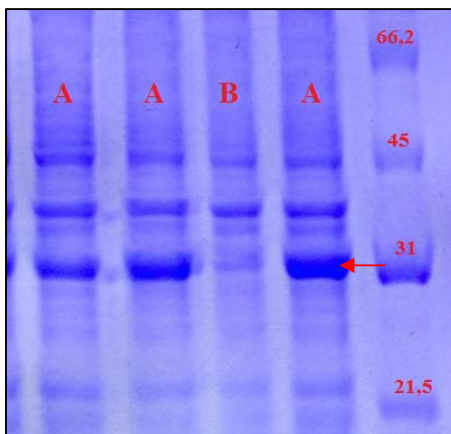


Figura 105: PAGE con muestras de células que indujeron P35A (A), muestra de células sin inducir (B, control negativo) y un marcador de peso molecular.

que P35A. Esto concuerda con lo descrito por Carey y col., quienes observaron que la proteína completa corre más retrasada de lo esperado en un PAGE. Este fenómeno se atribuyó a que P35 posee una proporción elevada de prolinas con respecto a los demás AAs (Carey y col.; 2000).

Ambos Ags se expresaron solubles, aunque P35B lo hizo en mayor medida. Aubert y col., que trabajaron con una de las secuencias más similares a P35B, informaron que se expresó insoluble, a pesar de que su vector, CKF, le introdujo una proteína de fusión que debería haber favorecido su solubilización (Aubert y col., 2000). La figura 106 muestra un PAGE donde se corrieron el precipitado (calle izquierda) y el sobrenadante (calle derecha) luego de centrifugar el producto del sonicado de células que expresaron P35A. Se observa que en ambas fracciones se encontró el Ag inducido.

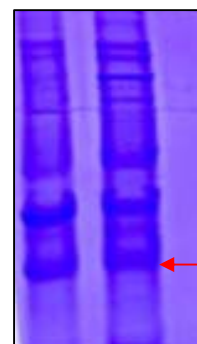


Figura 106: PAGE del precipitado (calle izquierda) y el sobrenadante (calle derecha) luego de centrifugar el producto del sonicado de células que expresaron P35A (flecha roja).

Las secuencias aminoacídicas que se expresaron con éxito se muestran a continuación. En color verde está la secuencia correspondiente a TrxA, en color rojo la secuencia del Ag de interés, en color amarillo las 2 secuencias de poli-histidina y subrayado se muestran los AAs mutados durante el proceso, donde entre paréntesis se indica el AA de la secuencia indexada. Se pudo observar que la secuencia polipeptídica que se expresó junto con el Ag de interés fue de mayor extensión que el mismo.

P35A:

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMI
 APILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFK
 NGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHHHHSSG
 LVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSEF
MALPLRA(V)SATVFVVFVAVFGVARAMNGPLSYHPSSYGASYP
NPSNPLHGMKPENPVRPPPPGFHPSVIPNPPYPLGTPAGMP
QPEVPPLQHPPPTKLAAALEHHHHH

P35B:

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMI
 APILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFK
 NGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHHHHSSG
 LVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSEF
GMPKPENPVRPPPPGFHPSVIPNPPYPLGTPAGMPQPEVPPL

QHPPPTGSPPA AAPQPPYPVGT PVM PQPEIPPVHRPPPPGFR
PEVAPVPPYPVGT P K L A A A L E H H H H H H

3.1.4. Purificación de los antígenos

La proteína P35B fue purificada del total de proteínas de la bacteria según el protocolo basal de purificación (ver punto 1.2.3.1. de Materiales y Métodos). La proteína normalmente eluyó en las primeras recolecciones de imidazol 250 mM. En la figura 107 se muestra la fracción resultado al lado del MPM, luego de la purificación .

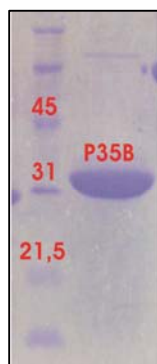


Figura 107: PAGE con una fracción satisfactoria de la purificación de P35B.

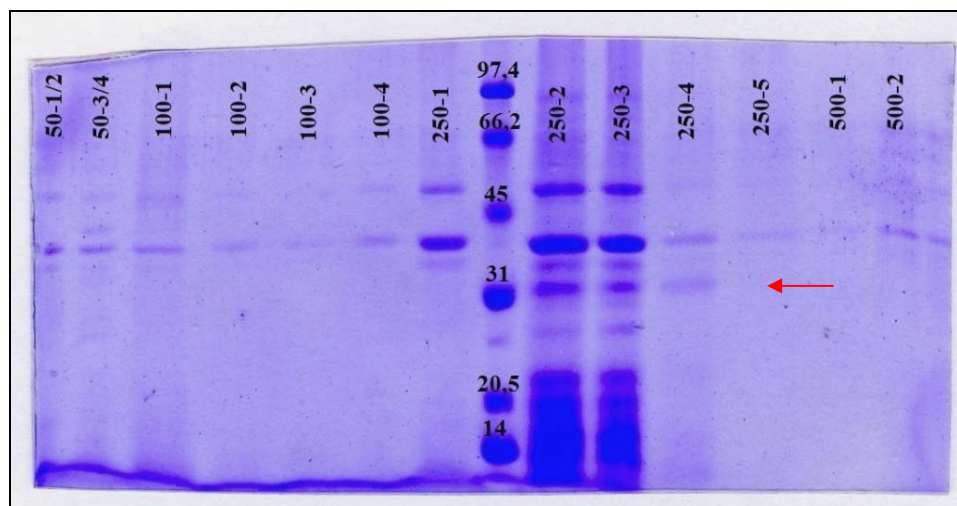


Figura 108: PAGE de las eluciones de la purificación de P35A sin emplear urea.

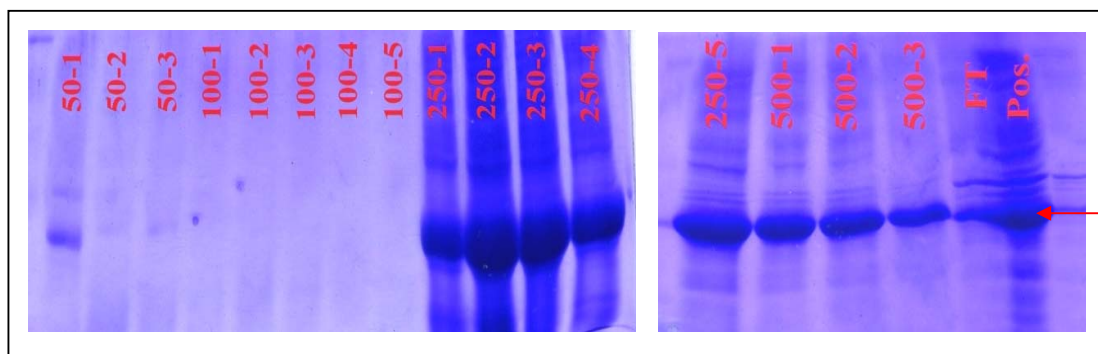


Figura 109: PAGES de las eluciones de la purificación de P35A empleando urea. Pos., lisado de bacterias que indujeron P35A y "FT", solución que tuvo la proteína de interés luego de ser circulada por la columna de purificación (proteína no adsorbida por la columna).

Se intentó purificar la proteína P35A según el protocolo basal, pero no se obtuvieron muestras con concentraciones y grados de pureza satisfactorios. En la figura 108 se muestra un ejemplo de esas purificaciones, donde se observó que P35A sólo se encontraba en las eluciones 2 y 3 de imidazol 250 mM (flecha roja), y en baja relación de concentraciones Ag/contaminación. Particularmente, una banda de contaminación que corrió aproximadamente a 38 KDa se encontró

más concentrada que el Ag, presentándose además en otras eluciones. Para resolver este problema se agregó urea a todas las soluciones de trabajo de purificación. Las eluciones resultantes se muestran en la figura 109, donde en los PAGES se observó gran cantidad de P35A en varias eluciones (flecha roja). Habiéndose verificado la diferencia notable entre usar o no urea. La fracción 50-1 y todas las de imidazol 500 mM se utilizaron tal como fueron obtenidas. Todas las fracciones de 250 mM fueron repurificadas bajo las mismas condiciones.

3.1.5. Evaluación de las diferentes secuencias de P35 mediante inmunoquímica

3.1.5.1. Dot blot para detección de IgG

Inicialmente se realizó un dot blot con TrxA, P35A y P35B para detección de IgG específica (como se detalla en el punto 1.3.4. de Materiales y Métodos) para corroborar las especificidades de las 3 proteínas contra los SIP y SIN. Sus resultados se detallan en el Anexo B, donde se evalúa en detalle la antigenicidad de TrxA.

3.1.5.2. ELISA para detección de IgG

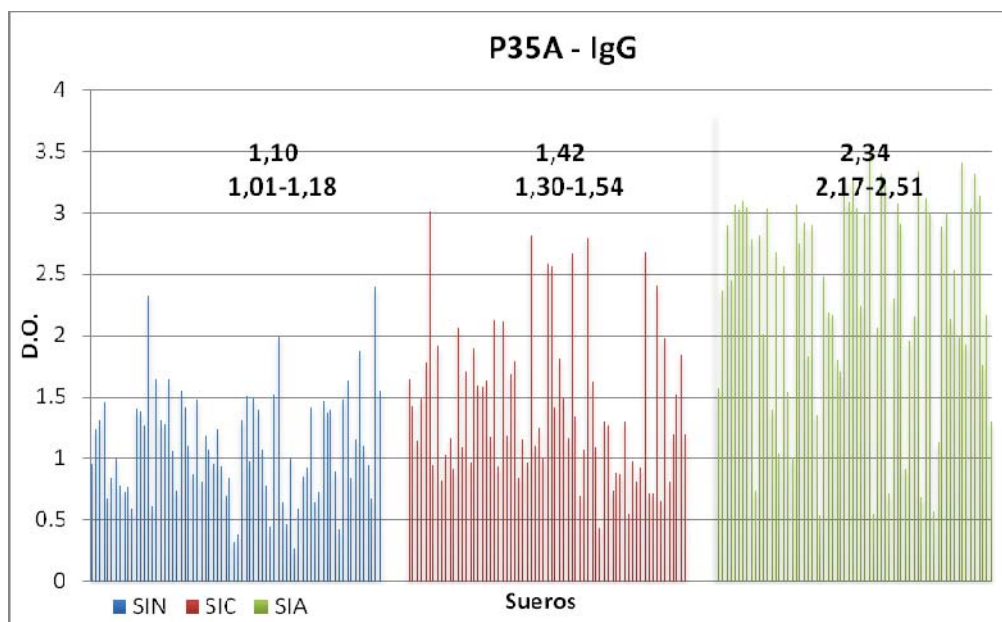


Figura 110: D.O. de todos los sueros ensayados en ELISA indirecto para detectar IgG específica, empleando el antígeno P35A. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios, con 90 % confianza. Grupos: SIN en azul; SIC en rojo y SIA en verde.

Se realizó ELISA indirecto para detección de anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii* empleando como antígenos a P35A y P35B. Se ensayaron 69 SIA, 69 SIC y 73 SIN. Las D.O. promedios, los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 110 y 111, para P35A y P35B, respectivamente. Se pudo

afirmar con significancia estadística que para cada grupo se obtuvieron diferentes D.O., con ambos Ags. Observando las diferencias entre los promedios de D.O., P35B tuvo la mayor diferencia entre las señales de SIA con SIC. Esto también se observó en los diagramas de dispersión (figuras 110 y 111), siendo además evidente que los SIN y SIC produjeron menor señal con P35B que con P35A. Si bien el valor medio de D.O. de SIA con P35A fue mayor que con P35B, sus IC se superpusieron. Con ambos Ags hubo reactividad diferenciada ante los grupos SIA y SIC. Que esta diferencia sea mayor con P35B al mismo tiempo que las D.O. son menores, indicaría que hay epitopes específicos en ambos Ags, pero también inespecíficos en P35A.

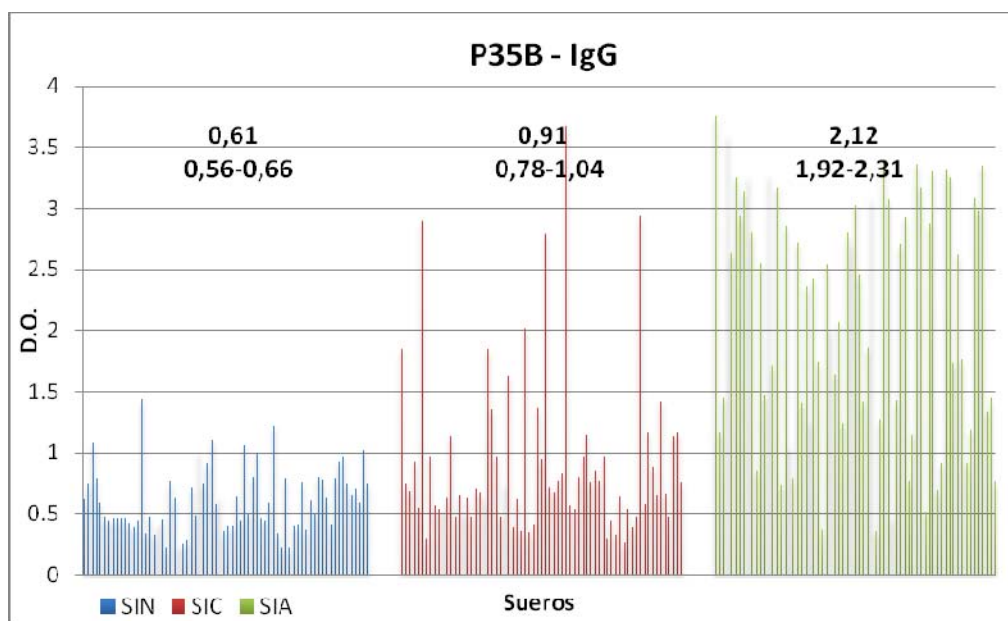


Figura 111: D.O. de todos los sueros ensayados en ELISA indirecto para la detección de IgG específica, empleando el antígeno P35B. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios, con 90 % confianza. Grupos: SIN en azul; SIC en rojo y SIA en verde.

Se evaluó la capacidad para discriminar entre: "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 14 muestra los parámetros de comparación obtenidos para cada clase de discriminación. Los IC de todas las áreas bajo las curvas se superpusieron, pero ninguno contuvo el valor de 0,5. Además, en la clasificación "SIA contra SIC" empleando P35B, el límite superior del IC fue de 0,905. Observando solamente los valores medios de áreas bajo las curvas, P35B siempre presentó las mayores áreas. Con ambos Ags, la discriminación entre "SIA de SIC" mostró mayores valores de áreas que "SIP de SIN". Según la definición de Tape, los ensayos fueron *aceptables*, excepto el de "SIA contra SIC" con P35B que resultó *bueno* (Tape, 2013).

Cabe destacar los resultados obtenidos para P35B en la diferenciación "SIP de SIN", donde la técnica sólo fue capaz de detectar a la mitad de la población de SIP (sensibilidad de 52,2 %) pero cuando clasificó un suero como tal, prácticamente siempre fue acertado (VPP 97,3 %). Contrariamente, con los SIN detectó prácticamente todos los ensayados (especificidad de 97,1 %), pero las mitad de las veces que clasificó un suero dentro de ese grupo, el resultado estuvo equivocado (VPN 50,7 %).

Cinco autores trabajaron con el antígeno P35 detectando IgG. Aubert, Li y Hiszczyjska-Sawicka clonaron las secuencias de mayor similitud a P35B, obteniendo sensibilidades de 94,4; 85,3 y 87,9 %

y especificidades de 62,9; 92 y 47 %; respectivamente (tabla 1). Los resultados aquí obtenidos fueron menos promisorios que los de Li y col., similares a los de Aubert y col. y superadores a los de Hiszczyjska-Sawicka y col. (Aubert y col., 2000; Li y col., 2000b; Hiszczyjska-Sawicka y col., 2005). Sin embargo, antes de obtener los resultados significativos que obtuvieron Li y col., este mismo grupo de investigación ensayó una región más extensa de P35, cubriendo casi toda la extensión del Ag (figura 11) y obtuvieron resultados de menor calidad, sensibilidad de 60 % y especificidad de 90 % (Li y col., 2000a). A su vez, Pfrepper y col. evaluaron la región más extensa de P35, clonando una secuencia que incluyó una región carboxi terminal repetida, alcanzando una extensión de 1137 nucleótidos en lugar de 801 nucleótidos. Sus resultados en la discriminación de fases, fueron menos significativos que los nuestros ya que obtuvieron 94 % de sensibilidad y 53,5 % de especificidad (Pfrepper y col., 2005). Cabe señalar que todos estos autores emplearon espacios muestrales significativos, excepto el primer trabajo de Li y col., donde solo utilizaron 10 SIA y 10 SIC (Li y col., 2000a).

ELISA para IgG		Proteínas	
		P35A	P35B
SIA contra SIC	Valor umbral	1,91	1,17
	Sensibilidad	72,5	79,7
	Especificidad	82,6	84,1
	VPP	80,6	83,4
	VPN	72,0	80,6
	Área bajo la curva	0,797 0,732-0,863	0,849 0,792-0,905
SIP contra SIN	Valor umbral	1,55	1,10
	Sensibilidad	58,0	52,2
	Especificidad	90,3	97,1
	VPP	91,9	97,3
	VPN	53,2	50,7
	Área bajo la curva	0,759 0,706-0,812	0,790 0,739-0,840
SIAS contra SIC	Valor umbral	1,91	1,52
	Sensibilidad	76	69,9
	Especificidad	82,6	88,4
	VPP	61,3	66,8
	VPN	90,5	89,8
	Área bajo la curva	0,779 0,667-0,892	0,853 0,775-0,933

Tabla 14: Parámetros de discriminación entre los diferentes grupos mediante ELISA indirecto contra IgG específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indica primero el valor medio y debajo el IC del mismo con una confianza del 90%.

También se analizó la capacidad de discriminar entre los grupos "SIAS de SIC" (tabla 14). Comparando con las discriminaciones de "SIA contra SIC" en ambos Ags, los IC se superpusieron, pero el valor medio del área bajo la curva ROC con P35B fue mayor cuando se emplearon sueros con mayor certeza de su identidad de fase (SIAS), habiendo alcanzado el límite superior del IC en "SIAS contra SIC" un valor de 0,933.

Las curvas ROC de las discriminaciones se muestran en las figuras 112 y 114 para P35A y en las figuras 113 y 115 para P35B; diferenciando "SIA de SIC" y "SIP de SIN", respectivamente.

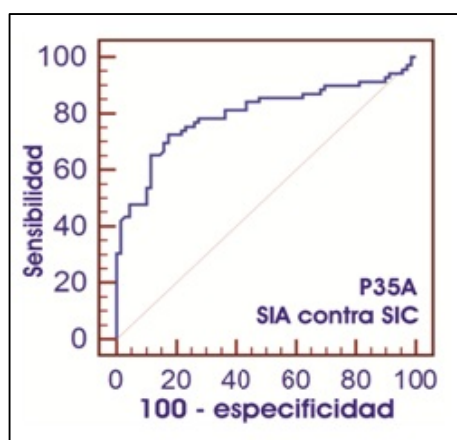


Figura 112: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P35A.

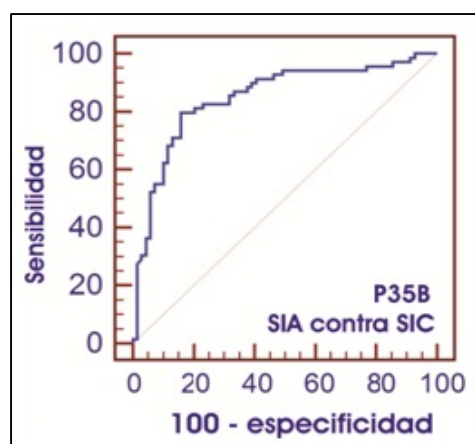


Figura 113: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P35B.

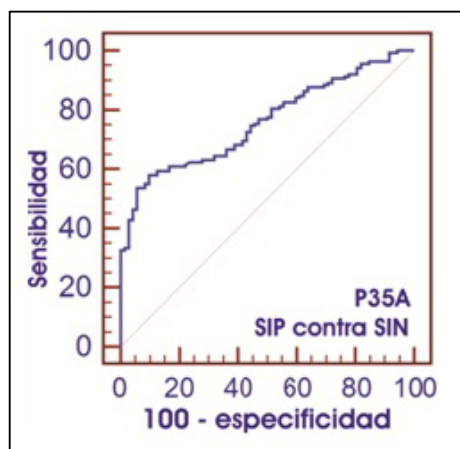


Figura 114: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P35A.

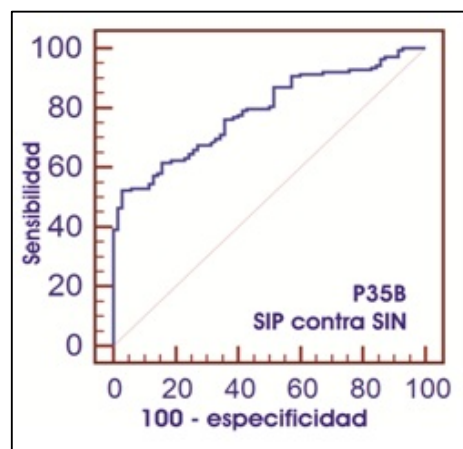


Figura 115: Curva ROC de la discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgG y empleando P35B.

P35A se diferenció de P35B no sólo en la secuencia, sino además por el empleo de urea para su purificación. Sin embargo, las soluciones de estos Ags se diluyeron entre 100 y 200

veces (según la concentración de proteínas de la solución madre) cuando se sembraron las placas de ELISA, proceso en el cual se podría esperar que P35A adquiriera la conformación nativa.

Para comprobar el efecto de la urea, se realizó un ELISA detectando IgG con 6 SIC y 5 SIN, empleando P35B en 2 series, una sin urea y otra con urea. Como el ensayo fue con muestras pareadas, se calculó para cada suero la diferencia entre las D.O. de los ensayos con cada una de las soluciones del Ag. Luego se calculó la media de estas diferencias para los SIC y para los SIN, y sus intervalos con 90 % de confianza. Para SIC se obtuvo 0,11; IC: 0,20 -0,02. Y para SIN se obtuvo -0,04; IC: 0,06 – -0,14. En el caso de SIC se pudo asegurar con significancia estadística que agregar urea aumenta la D.O. entre 0,02 y 0,2. Pero en el caso de SIN, como el IC contuvo el valor 0, no se pudo asegurar que la urea aumente las señales.

El aumento de las señales al emplear P35A, en lugar de P35B, no sólo ocurrió en los tres grupos de sueros sino que además fue 0,51 en SIC y 0,49 en SIN, mayor a las diferencias que se encontraron ensayando P35B con y sin urea, por lo cual se supuso que las distintas reactividades también deberían explicarse por la diferencia de secuencias.

3.1.5.3. ELISA para detección de IgA

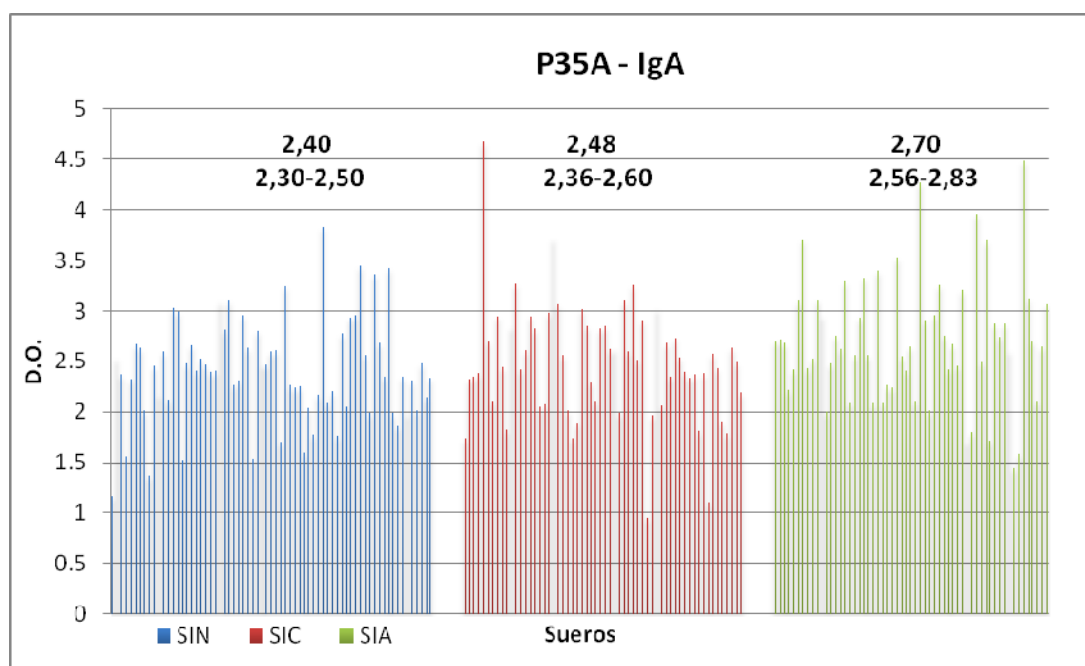


Figura 116: D.O. de todos los sueros ensayados en ELISA indirecto para la detección de IgA específica, empleando el antígeno P35A. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios, con 90 % confianza. Grupos: SIN en azul; SIC en rojo y SIA en verde.

Se realizó ELISA indirecto detectando anticuerpos IgA específicos contra *T. gondii* empleando como antígenos P35A y P35B. Se ensayaron 59 SIA, 61 SIC y 69 SIN. Las D.O.

promedios, los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 116 y 117, para P35A y P35B, respectivamente. Utilizando P35A se observó que se superpusieron los IC de SIA con SIC y de SIC con SIN, mientras que con P35B sólo se superpusieron los IC de SIC con SIN. Con 90 % de confianza se pudo afirmar que las señales medias de P35A fueron mayores que de P35B. Sólo utilizando P35B se pudo asegurar con significancia estadística, que el valor medio de D.O. de SIA fue distinto a SIC.

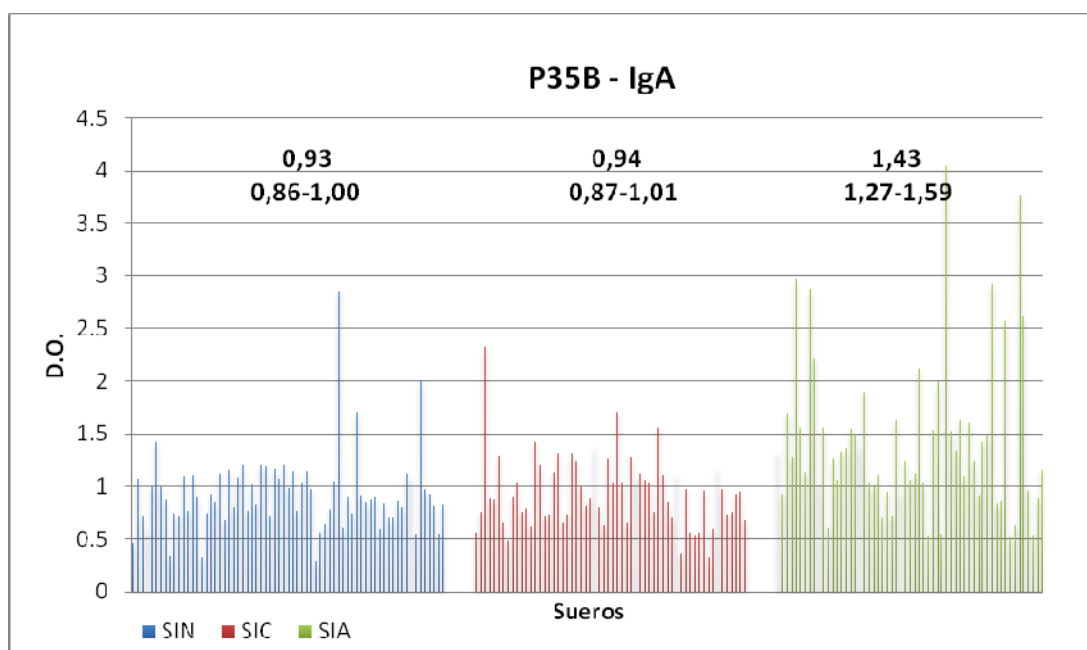


Figura 117: D.O. de todos los sueros ensayados en ELISA indirecto para la detección de IgA específica, empleando el antígeno P35B. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios, con 90 % confianza. Grupos: SIN en azul; SIC en rojo y SIA en verde.

Se evaluó la capacidad para discriminar entre: "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 15 muestra los parámetros de comparación obtenidos para cada clase de discriminación. Desafortunadamente, los IC de todas las áreas se superpusieron. No obstante, ningún área de estas diferenciaciones abarcó el valor de 0,5. Observando solamente los valores medios de áreas bajo las curvas ROC se apreció que "SIA de SIC" ofreció valores superiores que "SIP de SIN" y P35B fue el antígeno que ofreció las mayores áreas. Según la clasificación de Tape los ensayos fueron: con P35A *malo* en "SIP contra SIN" y *débil* en "SIA contra SIC", y con P35B *débil* con "SIP contra SIN" y *aceptable* en "SIA contra SIC" (Tape, 2013).

Los únicos autores que ensayaron P35 detectando anticuerpos IgA fueron Pfrepper y col. Mediante westernblot ensayaron 102 SIA y 71 SIC empleando una secuencia más larga que P35A o P35B (figura 11) y obtuvieron mejores resultados que los nuestros, sensibilidad de 67,6 % y especificidad de 98,6 % (Pfrepper y col., 2005).

También se observó la capacidad para discriminar entre los grupos "SIAS contra SIC" (tabla 15). Sus IC también se superpusieron con las otras discriminaciones, pero los comportamientos variaron según el Ag. Con P35A el valor medio del área bajo la curva fue inferior tanto a "SIA contra SIC" como a "SIP contra SIN" y el IC abarcó el valor de 0,5. Con P35B el área media bajo la curva superó el valor de "SIA contra SIC" y su IC no incluyó el valor de 0,5.

Las curvas ROC para estas discriminaciones se muestran en las figuras 118 y 120 para P35A y en las figuras 119 y 121 para P35B; diferenciando "SIA de SIC" y "SIP de SIN", respectivamente.

ELISA para IgA		Proteínas	
		P35A	P35B
SIA contra SIC	Valor umbral	2,39	1,03
	Sensibilidad	74,6	71,2
	Especificidad	45	68,3
	VPP	57,2	68,9
	VPN	64,3	70,7
	Área bajo la curva	0,604 0,519-0,690	0,733 0,657-0,810
SIP contra SIN	Valor umbral	2,48	1,21
	Sensibilidad	57,1	36,1
	Especificidad	62,3	94,2
	VPP	72,3	91,5
	VPN	45,7	46,1
	Área bajo la curva	0,596 0,526-0,666	0,631 0,564-0,697
SIAS contra SIC	Valor umbral	3,08	1,03
	Sensibilidad	31,8	63,6
	Especificidad	91,7	95
	VPP	58,4	82,3
	VPN	78,6	87,7
	Área bajo la curva	0,588 0,458-0,718	0,764 0,646-0,881

Tabla 15: Parámetros de discriminación entre los diferentes grupos mediante el ELISA indirecto contra IgA específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indica primero el valor medio y debajo el IC del mismo con una confianza del 90%.

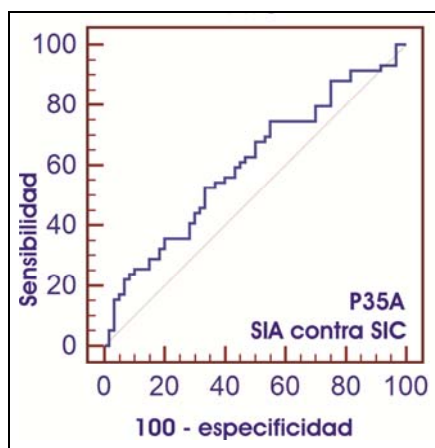


Figura 118: Curva ROC de discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P35A.

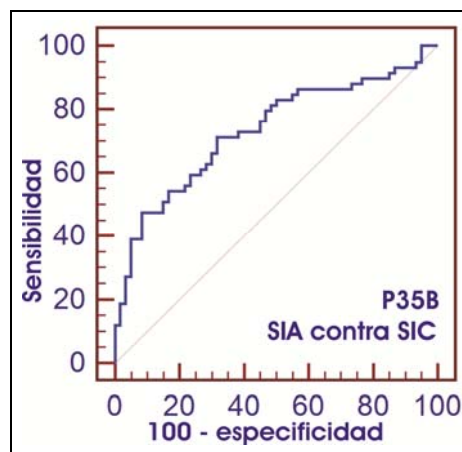


Figura 119: Curva ROC de discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P35B.

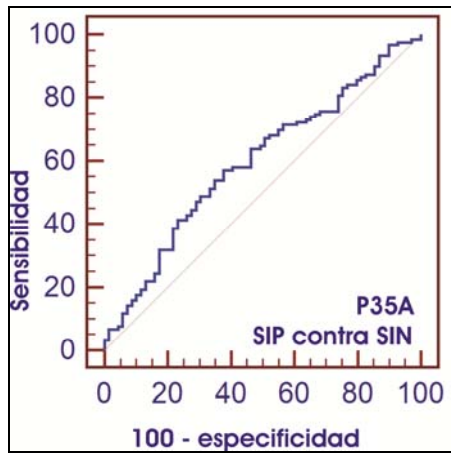


Figura 120: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P35A.

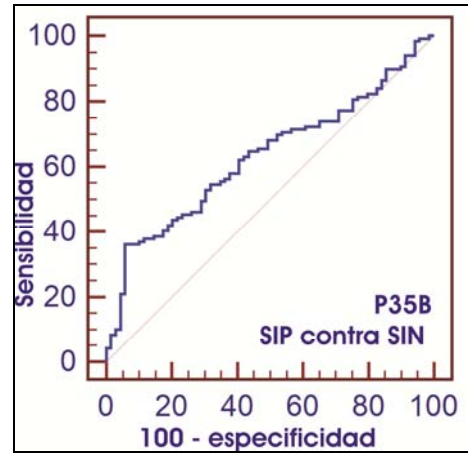


Figura 121: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto detectando IgA y empleando P35B.

3.1.5.4. ELISA para detección de IgM

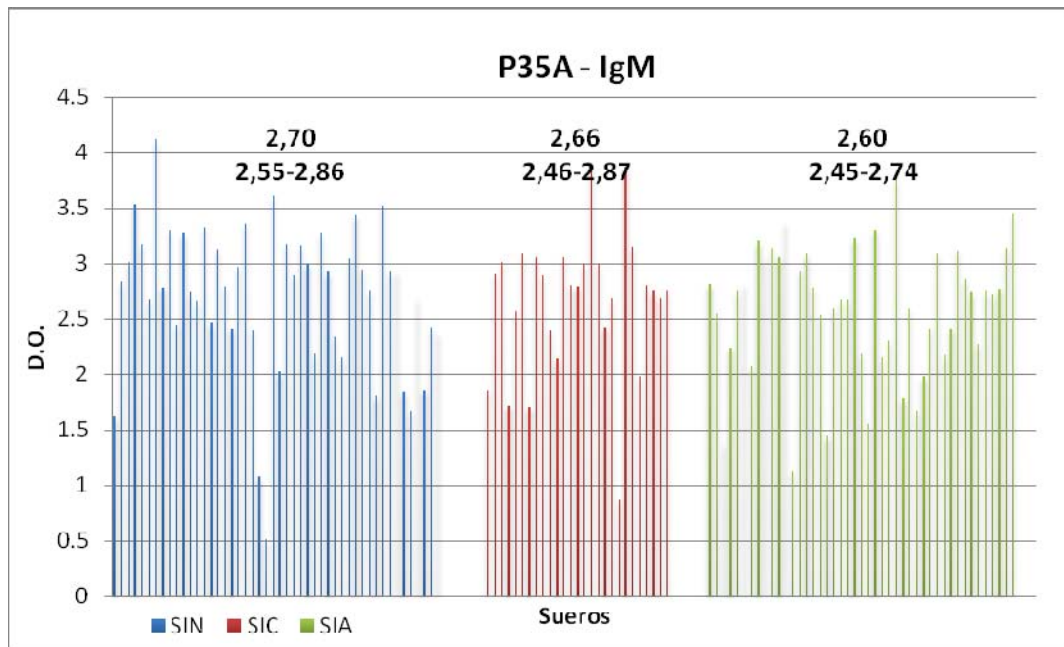


Figura 122: D.O. de todos los sueros ensayados en ELISA indirecto para la detección de IgM específica, empleando el antígeno P35A. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios, con 90 % confianza. Grupos: SIN en azul; SIC en rojo y SIA en verde.

Se realizó ELISA indirecto detectando anticuerpos IgM específicos contra *T. gondii* empleando como antígenos P35A y P35B. Se ensayaron 45 SIA, 27 SIC y 51 SIN. Las D.O. promedios, los intervalos de las D.O. promedios con 90 % de confianza y los diagramas de dispersión se muestran en las figuras 122 y 123 para P35A y P35B, respectivamente. Para ambos antígenos, los IC de los grupos de sueros se superpusieron entre sí. Además, para P35A se observó que el orden de las D.O. fue contrario al esperado ($SIA > SIC > SIN$). Con P35B, el

valor medio de D.O. de SIA fue mayor a SIC, pero el de SIN fue mayor que el de estos 2 grupos. Si se pudo asegurar con significancia estadística que los valores medios de P35A fueron mayores que P35B.

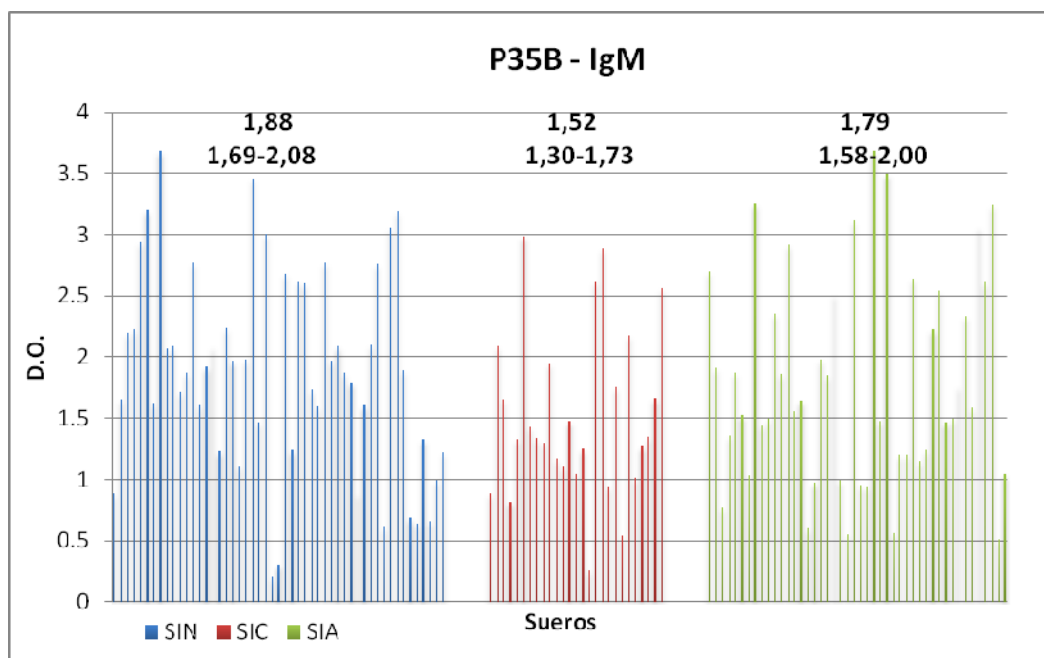


Figura 123: D.O. de todos los sueros ensayados en ELISA indirecto para la detección de IgM específica, empleando el antígeno P35B. Sobre cada grupo de sueros se indican D.O. promedios y los intervalos de las D.O. promedios, con 90 % confianza. Grupos: SIN en azul; SIC en rojo y SIA en verde.

Se evaluó la capacidad para discriminar "SIA de SIC" y "SIP de SIN". La tabla 16 muestra los parámetros de comparación para cada tipo de discriminación. Los valores umbrales dieron altos para P35A. Desafortunadamente, todos los IC abarcaron el valor 0,5. Observando únicamente las áreas medias bajo las curvas ROC, P35B siempre mostró áreas superiores y con esta secuencia la mejor fue "SIA contra SIC". Contrario a P35A, donde "SIP contra SIN" tuvo la mayor área. Según la clasificación de

ELISA para IgM		Proteínas	
		P35A	P35B
SIA contra SIC	Valor umbral	2,75	1,43
	Sensibilidad	57,8	65,2
	Especificidad	59,3	59,3
	VPP	70,2	73,2
	VPN	45,7	50,0
	Área bajo la curva	0,533 0,417-0,648	0,595 0,484-0,706
SIP contra SIN	Valor umbral	3,15	1,59
	Sensibilidad	88,9	56,2
	Especificidad	27,1	70,6
	VPP	64,7	73,2
	VPN	61,9	53,0
	Área bajo la curva	0,554 0,464-0,648	0,585 0,498-0,672

Tabla 16: Parámetros de la discriminación entre los diferentes grupos mediante ELISA indirecto para IgM específica. Todos los valores son %, excepto las áreas bajo las curvas y los valores umbrales. En las áreas bajo las curvas se indica primero el valor medio y debajo el IC del mismo con una confianza del 90 %.

Tape los ensayos fueron *malos* (Tape, 2013).

Aubert y col. trabajaron con la secuencia de extensión más parecida a P35B y detectando IgM, pero solo ensayaron SIA, obteniendo 50,7 % de sensibilidad (Aubert y col., 2000). Todos los otros autores que también detectaron anticuerpos IgM, obtuvieron resultados más prometedores que los nuestros. Babaie y col. también ensayaron una secuencia parcial de P35 y obtuvieron 60,6 y 97,1 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente (Babaie y col., 2011). Lu, Pfrepper y Suzuki ensayaron las secuencias completas de P35 (excepto por las regiones amino y carboxi terminal) y obtuvieron sensibilidades de 100; 64,7 y 90 %; y especificidades de 96; 100 y 91,8 %; respectivamente.

Las figuras 124 y 126 muestran las curvas ROC obtenidas para P35A, y las figuras 125 y 127 muestran las curvas ROC obtenidas para P35B, para las diferenciaciones de "SIA contra SIC" y "SIP contra SIN", respectivamente.

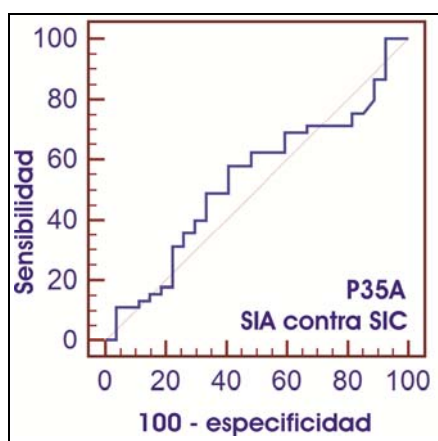


Figura 124: Curva ROC de discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto, detectando IgM y empleando P35A.

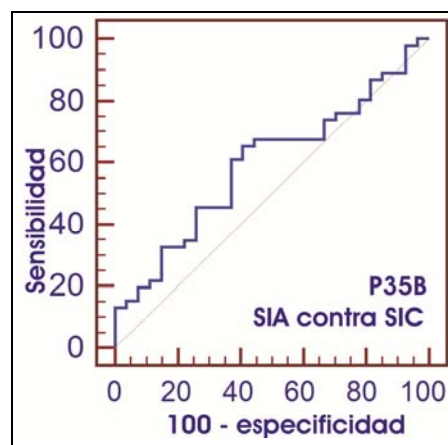


Figura 125: Curva ROC de discriminación entre "SIA y SIC" en ELISA indirecto, detectando IgM y empleando P35B.

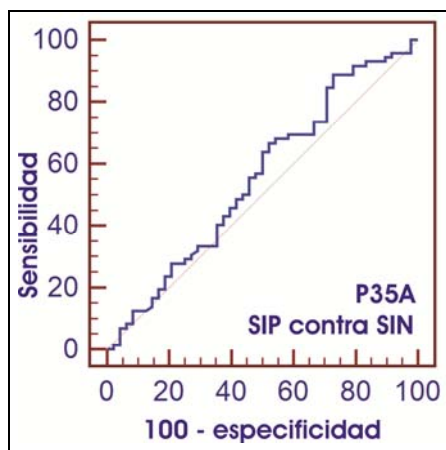


Figura 126: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto, detectando IgM y empleando P35A.

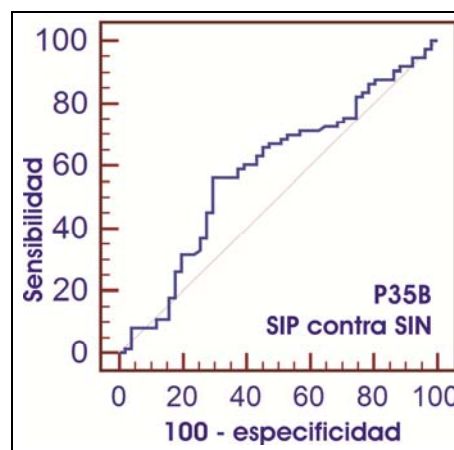


Figura 127: Curva ROC de discriminación entre "SIP y SIN" en ELISA indirecto, detectando IgM y empleando P35B.

3.1.5.5. ELISA de avidez

Como se observó especificidad de los anticuerpos IgG hacia P35, se estudió el desarrollo de avidez en anticuerpos de SIAS y SIC. Para ello, se analizó la correlación entre 5 sueros clasificados con baja avidez para IgG por el Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán (pertenecientes a SIAS) con la avidez de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno P35B (el que mostró mejor desempeño) medida mediante el procedimiento descrito en el punto 1.3.3. de Materiales y Métodos. Además, se ensayaron 8 SIC al azar de los cuales no se poseían datos previos de avidez, pero para los cuales se supuso que tenían alto valor por provenir de pacientes con infección crónica.

Como ejemplo, se muestran las curvas típicas obtenidas para un SIAS y un SIC, figuras 128 y 129 respectivamente.

En la figura 130 se muestra un diagrama de dispersión de los valores de avidez obtenidos con los sueros, como así también el valor promedio de cada grupo y su intervalo con una confianza del 90 %. Se pudo asegurar con significancia estadística, que los valores de avidez fueron distintos para cada grupo. No fue necesario desarrollar una curva ROC para observar que definiendo un valor umbral entre 22 y 25 % se obtiene 100 % de sensibilidad,

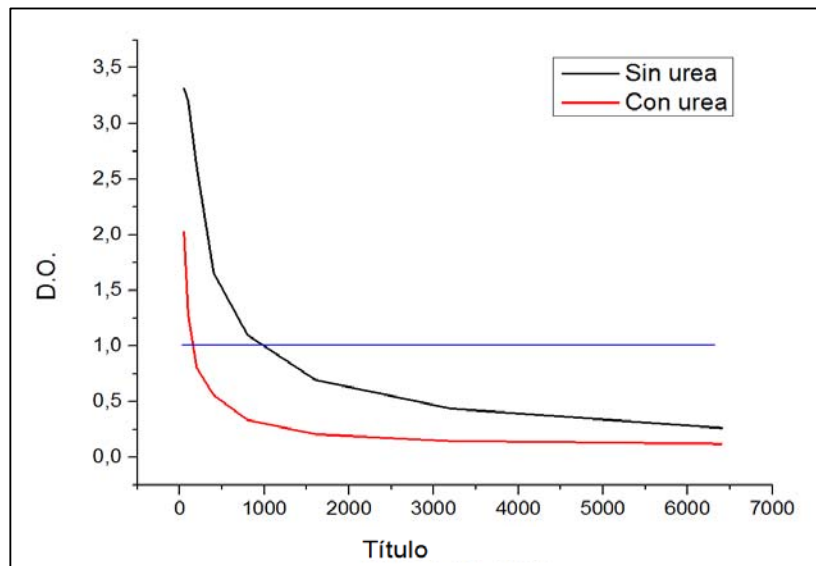


Figura 128: Curvas de los títulos de dilución del suero contra las D.O. obtenidas con un SIAS en presencia y ausencia de urea. La recta azul es la D.O. en la que se compararon los títulos.

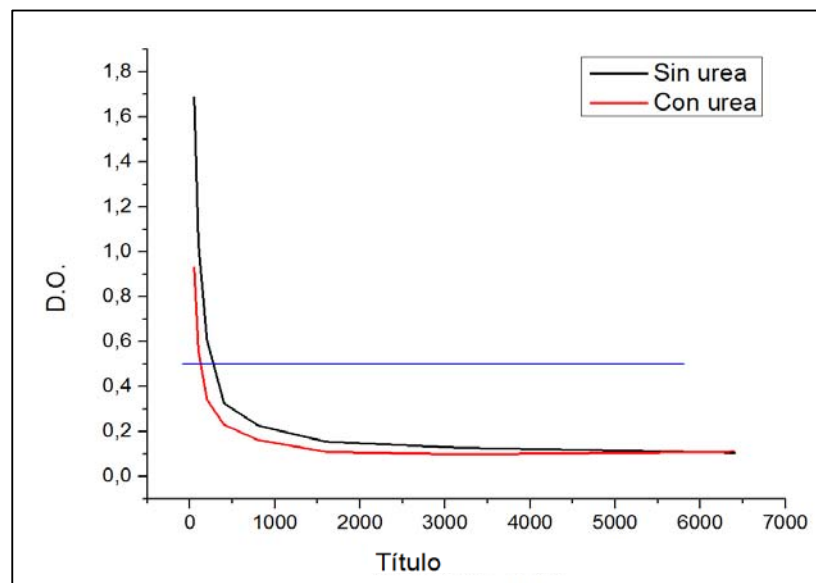


Figura 129: Curvas de los títulos de dilución del suero contra las D.O. obtenidas con un SIC en presencia y ausencia de urea. La recta azul es la D.O. en la que se compararon los títulos.

especificidad, VPP y VPN. Además, los SIAS dieron valores de avidéz similares a los obtenidos con el kit para detectar avidéz de *Platelia* empleado por el Laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán.

Pfrepper y col. fueron los únicos que estudiaron la

avidéz de anticuerpos IgG contra P35 en varios sueros recolectados a lo largo del transcurso de la infección de 2 personas. Si bien no presentaron resultados cuantitativos, afirmaron no observar un incremento de avidéz en los Acs, utilizando P35, contrario a otros Acs que ensayaron paralelamente (Pfrepper y col., 2005).

Si bien la técnica ofreció excelentes resultados (Tape, 2013), se debería ensayar con un mayor número de sueros para validar estas conclusiones.

3.1.5.6. Dot blot semicuantitativo

Como los antígenos con los resultados más prometedores fueron P35A y P35B, se los ensayó en un dot blot semicuantitativo. Éste es un procedimiento desarrollado previamente en el laboratorio como prototipo para un kit comercial, para que pueda ser utilizado fácilmente por personal no especializado. Es una metodología que no requiere equipo costoso y es sencilla. El diseño original empleaba homogenato de *T. gondii* y estaba orientado para diferenciar SIP de SIN (Spessott, 2004). En esta instancia se adaptó para ser usado con los antígenos recombinantes y discriminar entre SIA y SIC.

En el ensayo dot blot semicuantitativo se detecta anticuerpos IgG, sembrando el antígeno en una serie de 5 puntos con concentraciones decrecientes. Luego, se exponen al mismo suero y, al revelar, se les asigna un valor a los puntos obtenidos, de acuerdo a la intensidad de color que presentan. Para cada suero se multiplican los valores de los 5 puntos obteniendo así un puntaje

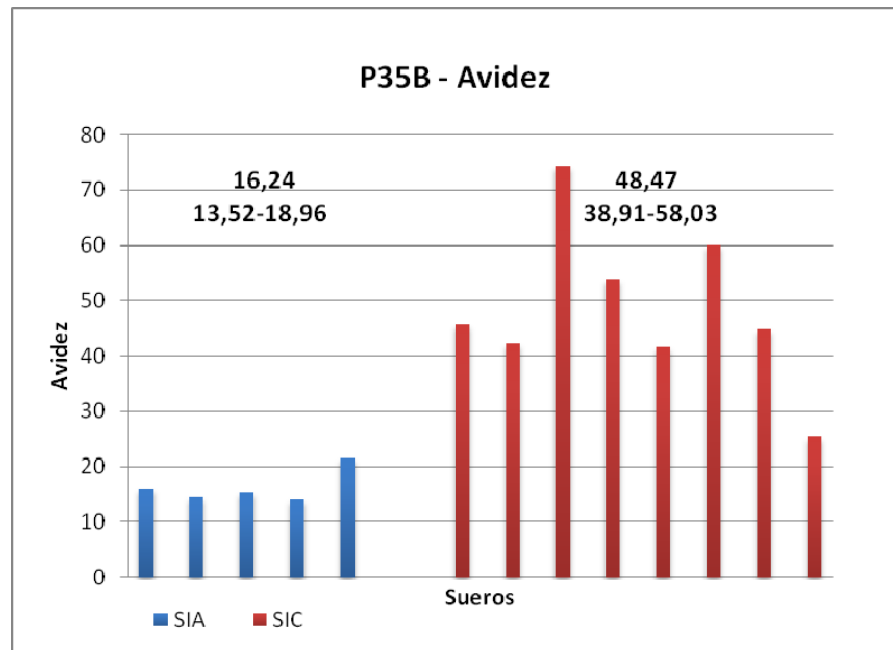


Figura 130: Diagrama de dispersión, valor promedio e intervalo del valor promedio con una confianza del 90 % de la avidéz obtenida para cada grupo de sueros empleando P35B como antígeno.

final. En el punto 1.3.4.1. de Materiales y Métodos se detalla el procedimiento. En la figura 131 se muestran los puntajes obtenidos cuando se ensayaron 5 SIA (tiras de arriba) y 5 SIC (tiras de abajo), empleando P35B.

Se evaluaron 47 SIA y 41 SIC. Se obtuvieron las curvas ROC para ambos Ags (figuras 132 y 133). Las áreas bajo las curvas fueron 0,682 (IC: 0,587-0,777) y 0,750 (IC: 0,664-0,837) para P35A y P35B, respectivamente. El programa Medcalc definió un puntaje umbral óptimo de 4 y 8, respectivamente. Es decir que los sueros se clasificaron como pertenecientes a fase aguda si ofrecían un valor igual o mayor a 8 para P35A y 16 para P35B. De este modo, las sensibilidades y especificidades fueron de 78,3 y 52,4 % para P35A y de 73,9 y 71,4 % para P35B, respectivamente. A su vez, el VPP y VPN fueron de 65,4 y 67,8 % para P35A y de 74,8 y 70,5 % para P35B, respectivamente. Se observó que ninguno de los IC de las áreas bajo las curvas ROC contempló el valor 0,5. Y empleando la clasificación de Tape, la técnica resultó *débil* con P35A y *aceptable* con P35B (Tape, 2013).

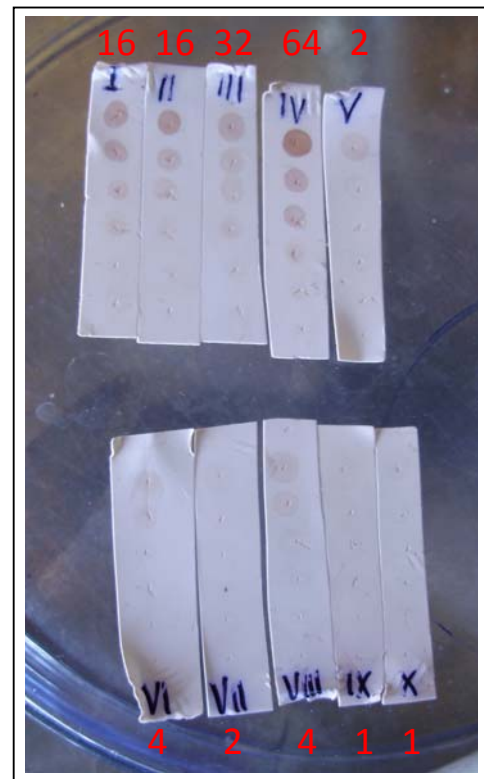


Figura 131: Ejemplo del dot blot semicuantitativo para 5 SIA (tiras de arriba) y 5 SIC (tiras de abajo). Los valores rojos son los puntajes calculados para cada suero.

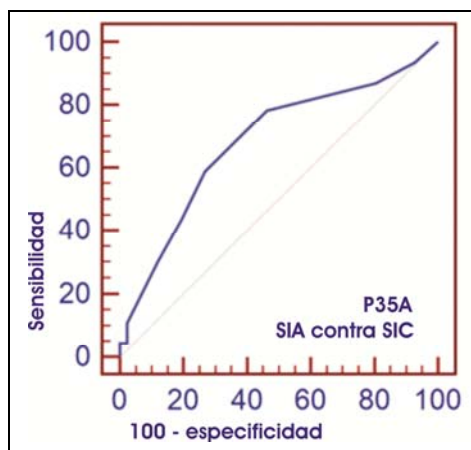


Figura 132: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en el dot blot semicuantitativo empleando P35A.

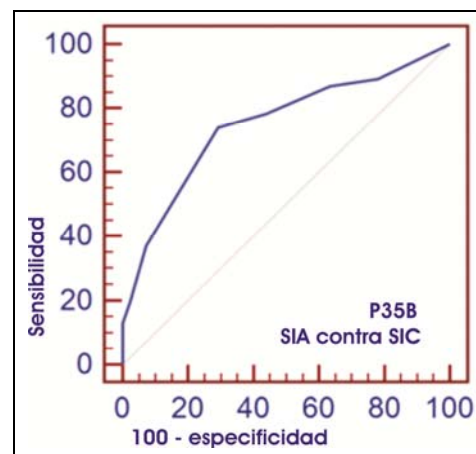


Figura 133: Curva ROC de la discriminación entre "SIA y SIC" en el dot blot semicuantitativo empleando P35B.

3.1.5.7. Comparación entre inmunoensayos

En todos los inmunoensayos, P35B ofreció en las discriminaciones mayor área media bajo la curva ROC, a pesar de que P35A siempre tuvo mayores D.O. en los ELISAs indirectos (con 90 % de confianza). No obstante, las diferenciaciones con P35A también fueron prometedoras. Como los Ags compartieron una región de la secuencia de P35 (posición de AAs de 47 a 95), es probable que en esta zona se encuentren los epitopes específicos y que en la región exclusiva de P35A haya epitopes inespecíficos que aumentaron su reactividad (recordando que los SIN dieron el doble de D.O. o más, cuando se empleaba P35A en vez de P35B, detectando IgG o IgA) al mismo tiempo que disminuyeron su capacidad de diferenciar entre las fases de infección.

Si bien no se ha reportado un mapeo antigénico de P35, Li y col. en publicaciones diferentes ensayaron distintas regiones empleando la misma técnica y el mismo vector de expresión. Los mejores resultados los obtuvieron empleando la región más corta (AAs entre las posiciones 23 a 159). En esta zona deberían encontrarse los epitopes más inmunodominantes (Li y col., 2000a y 2000b). A su vez, Pfrepper y col. emplearon una secuencia de P35 que posee la región desde la posición del AA 147 a 258 repetida una vez inmediatamente a continuación de la primera copia y sus resultados no fueron sobresalientes (Pfrepper y col., 2005). Debería ser al contrario si en dicha región hubiese epitopes inmunodominantes, tendrían que obtenerse mejores resultados por que se estarían exponiendo los epitopes por duplicado (Valiente Gabioud y col., 2011). En el trabajo aquí presentado, esta zona fue incluida en las regiones P35C, P35D, P35E y P35T, que pudieron clonarse pero no expresarse. P35B llegó hasta la posición del AA 145, 2 AAs antes de que comience la región repetitiva.

Mediante ELISA indirecto, detectando anticuerpos IgG con P35B, se obtuvo una sensibilidad de 79,7 % y una especificidad de 84,1 % diferenciando la fase aguda de la crónica de toxoplasmosis. Únicamente Li y Aubert obtuvieron resultados similares o superiores a los nuestros detectando el mismo isotipo de Ac. Ambos también trabajaron con secuencias parciales de P35 (figura 11; Li y col., 2000b; Aubert y col., 2000).

Detectando anticuerpos IgA con ELISA indirecto se alcanzó una sensibilidad de 71,2 % y una especificidad de 68,3 % utilizando P35B para discriminar entre SIA y SIC, pero fueron resultados inferiores a los de Pfrepper y col. quienes fueron los únicos que trabajaron con IgA (Pfrepper y col., 2005).

A través del ELISA indirecto, la detección de IgM no ofreció una buena diferenciación de las fases de la infección; ni siquiera con P35B, cuya sensibilidad y especificidad fueron de 65,2 % y 59,3 %, respectivamente. Otros 5 autores emplearon P35 para analizar anticuerpos IgM, y excepto uno, el resto obtuvo resultados superiores a los nuestros. Más aún, Lu y Suzuki que expresaron la región transmembrana y/o carboxi terminal (figura 11), obtuvieron uno de los

mejores resultados para diferenciación de las fases (tabla 1; Lu y col., 2006; Suzuki y col., 2000). Pero una diferencia entre ellos y el trabajo aquí presentado, fue que la detección la realizaron mediante ELISA doble sandwich, procedimiento que frente al nuestro (el ELISA indirecto) tiene la ventaja de disminuir los resultados falsos positivos provenientes de Acs naturales o factores reumatoides y disminuir los resultados falsos negativos generados por inhibición competitiva con anticuerpos IgG específicos (Suzuki y col., 2000; Robinson y col., 2004).

Se realizaron ensayos de avidéz en los SIAS y, observando esta propiedad para diferenciar entre las fases de la infección, se obtuvieron los mejores resultados de todos los inmunoensayos aquí estudiados, con sensibilidad y especificidad de 100 %. Aunque la cantidad de muestras que pudo utilizarse fue escasa (5 SIAS y 8 SIC), estos resultados son muy prometedores. Cabe destacar que hasta el momento sólo un grupo de investigación había evaluado la avidéz en sueros utilizando P35, sin obtener resultados favorables (Pfrepper y col., 2005).

Mediante el desarrollo de dot blot semicuantitativo, se intentó simplificar el ensayo para detectar anticuerpos IgG, de modo que pueda desarrollarse un kit para detección de fase aguda de toxoplasmosis. Empleando P35B se obtuvo una sensibilidad de 73,9 % y una especificidad de 71,4 %.

De los ensayos de ELISA indirecto, el que mayores áreas bajo las curvas ROC presentó fue el que detectó anticuerpos IgG. La detección de anticuerpos IgM, en cualquiera de las discriminaciones, no ofreció resultados muy prometedores, con áreas bajo las curvas cuyos IC abarcaron el valor de 0,5.

De todos los ensayos realizados, siempre se obtuvieron mejores resultados discriminado entre "SIA y SIC" que entre "SIP y SIN", excepto en la detección de anticuerpos IgM empleando P35A. Empleando P35B, las áreas bajo las curvas de las discriminaciones entre "SIAS de SIC" fueron mayores que las discriminaciones entre "SIA de SIC", detectando anticuerpos IgG e IgA. Es decir que empleando este Ag en estas técnicas hubo correlación entre la antigüedad de la infección determinada por títulos altos de IgM, presencia de IgA y/o avidéz de IgG, con la concentración de IgG o IgA. Esto es importante ya que el grupo SIA contenía sueros presumidos como agudos, aunque algunos de ellos fueran sueros con títulos bajos de IgM, avidéz baja y/o títulos para IgA positivos, pero pertenecientes probablemente a individuos en fase crónica. El grupo SIAS fue un grupo de sueros sobre el que se tuvo mayor certeza que pertenecieran a individuos en fase aguda (ver punto 1.3.1.4. de Materiales y Métodos). Si un procedimiento discrimina SIAS de SIC mejor que SIA de SIC, es posible que este procedimiento pueda distinguir sueros verdaderamente agudos de sueros crónicos que normalmente se confunden con sueros agudos.

3.2. Bioinformática

Se analizó y modeló la secuencia completa de la proteína P35 (267 AAs de extensión) con diferentes programas para profundizar en la interpretación de los resultados de los distintos experimentos y hallar las potenciales regiones antigénicas de la proteína. A continuación se muestra la secuencia completa de la proteína P35 estudiada:

M A L P L R V S A T V F V V F A V F G V A R A M N G P L S Y H P S S Y G A S Y
 P N P S N P L H G M P K P E N P V R P P P P G F H P S V I P N P P Y P L G T P A G M P Q
 P E V P P L Q H P P P T G S P P A A A P Q P P Y P V G T P V M P Q P E I P P V H R P P P
 P G F R P E V A P V P P Y P V G T P T G M P Q P E I P A V H H P F P Y V T T T T T A A P
 R V L V Y K I P Y G G A A P P R A P P V P P R M G P S D I S T H V R G A I R R Q P G T T
 T T T T S R K L L F R T A V V A A M A A A L I T L F R Q R P V F M E G V R M F P N L H
 Y R F T V T T Q N

3.2.1 Análisis de secuencia

Se comenzó estudiando la secuencia primaria con los programas: Pfam, InterproScan, SMART, PSIPred y FPsScan.

Mediante la aplicación MEMSAT-SVM de PSIPred, se reconocieron 4 regiones: región péptido señal, región extracelular, región transmembrana y región citoplasmática. Mediante la aplicación MEMSAT3 se encontraron 3 dominios: región extracelular, región transmembrana y región citoplasmática (figura 134). Ambas aplicaciones coincidieron aproximadamente en sus predicciones. Paralelamente, con otra aplicación del programa PSIPred se predijeron las estructuras secundarias. Sus resultados se muestran en la figura 135. Es de destacar la escasa cantidad de estructuras α hélice y hoja plegada β que se encontraron en esta proteína. La estructura secundaria predicha más importante, fue la hélice posicionada en la región transmembrana y fue coincidente con las estimaciones de la bibliografía (Carey y col., 2000).

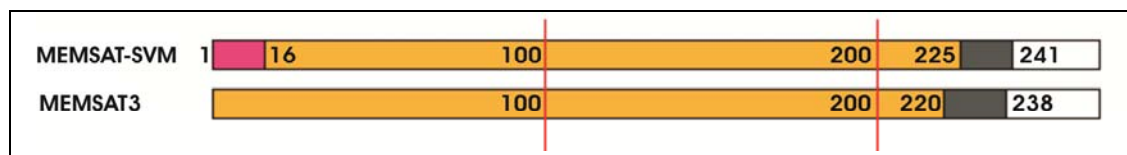


Figura 134: Resultados del PSIPred: magenta: péptido señal; amarillo: región extracelular; gris: región transmembrana y blanco: región citoplasmática. Los números internos indican posiciones en la secuencia peptídica.

El programa SMART reconoció a la proteína como P35 y encontró dos dominios característicos, uno de ellos un péptido señal, desde en la posición de los AAs 1 a 23.

Tanto PSIPred como el SMART predijeron un péptido señal, que terminó en las posiciones 16 y 23, respectivamente. Esto es coincidente con las predicciones de Carey y col., quienes ubicaron esa posición en el AA 23 (Carey y col., 2000) y confirmando que la mitad de la secuencia exclusiva de P35A (respecto a P35B), es la región péptido señal.

Los programas Pfam e InterProScan no encontraron ningún dominio.

Por inspección visual de la estructura primaria se observó también que hay 2 secuencias compuestas por repeticiones de treonina de 5 y 6 AAs de longitud y que comienzan en las posiciones 164 y 214, respectivamente. Ubicada la primera dentro de la secuencia P35C y P35D, y la segunda dentro de P35D y P35E.

El programa FPSan encontró una huella definida por 14 motivos de una extensión de 12 AAs cada uno (ver figura 136), constituidos principalmente por prolina. El programa describió que estos motivos también se encuentran en la proteína denominada "Extensina", que es muy abundante en la pared celular de las plantas. Ésta es altamente glicosilada a través de las prolinas. Esto indicaría que P35 podría ser una glicoproteína *in vivo*. Este Ag posee una alta cantidad de prolinas (Carey y col., 2000), estando este AA en el 23,97 % de la secuencia del total de la proteína. A su vez, esta particularidad explicaría las pocas estructuras secundarias predichas; porque de los 20 AAs, la prolina es el menos frecuente en las estructuras secundarias hélices y hojas plegadas β (Creighton, 1993). Por otro lado, en la figura



Figura 135: Estructuras secundarias predichas por el PSIPred. Conf: confianza, Pred: predicción (C: cola, H: hélice α y E: Hoja plegada β).

136 se observó que la mayoría de estos motivos se encontraron en las regiones correspondientes a P35A y P35B, las únicas regiones que pudieron expresarse.

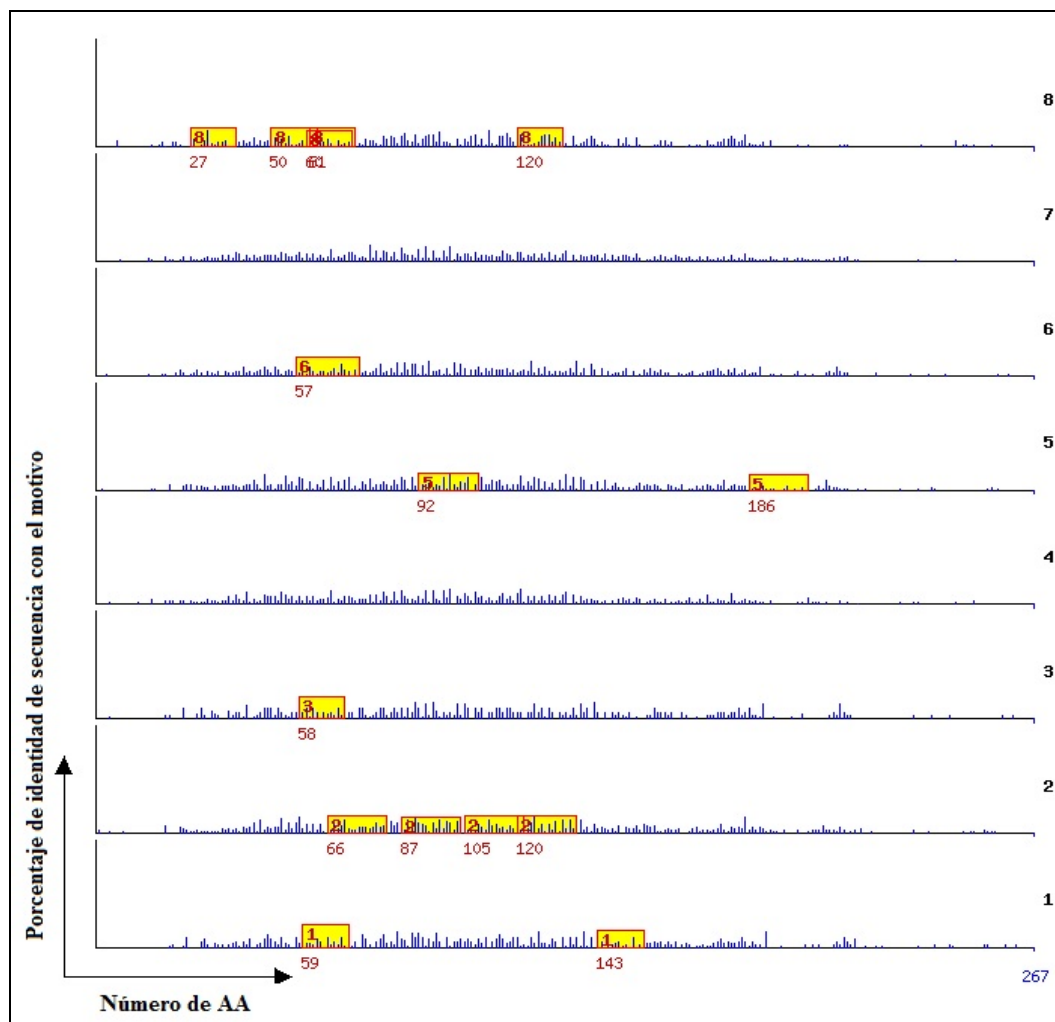


Figura 136: Motivos de 12 AAs de la huella que FPScan encontró sobre P35. En el eje X se esquematiza la estructura primaria. El eje Y se divide en los 8 motivos diferentes encontrados, señalando con la barra amarilla la posición en la estructura primaria de los mismos. La altura de la barra amarilla indica el porcentaje de identidad de secuencia con la proteína en estudio.

3.2.1.1. Problemas de expresión de las secuencias P35C, P35D y P35E: Si bien no se encontró una razón precisa para explicar la imposibilidad de expresar estas regiones, si se observaron características diferenciadas entre las secuencias que abarcaron estos Ags, con los que sí se pudieron expresar (P35A y P35B):

En P35C, P35D y P35E (la región que no se pudo expresar) se encontró:

- Una región hidrofóbica transmembrana.
- Una región de doble copia en algunas cepas de *T. gondii*.
- Dos secuencias cortas compuestas exclusivamente por el AA treonina.

En P35A y P35B (la región que sí se pudo expresar) se encontró:

- Alta concentración de AAs prolina.

3.2.2. Búsqueda de las estructuras patrones para modelado

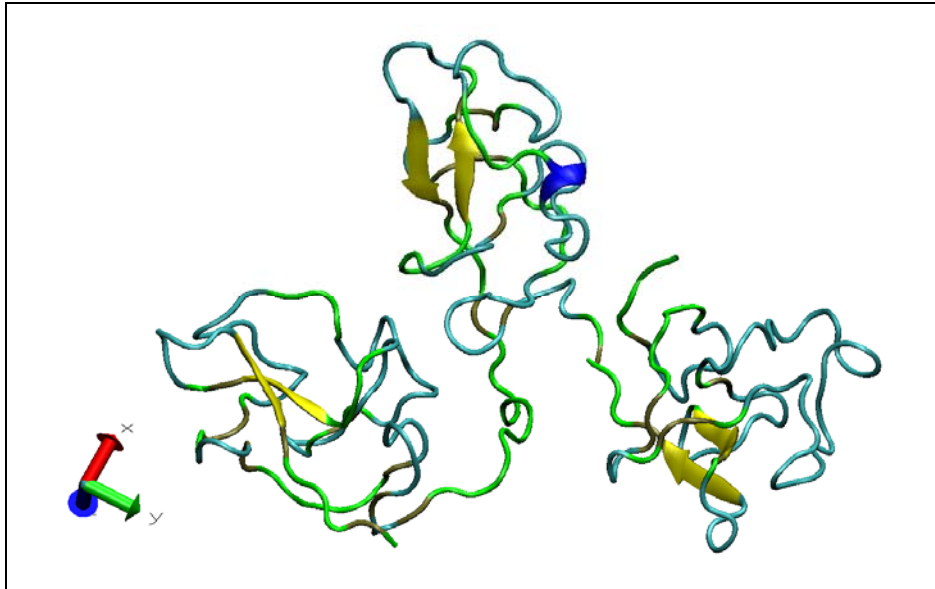


Figura 137: Estructura molecular de la proteína Angiotensin. Código de colores de estructuras secundarias: hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

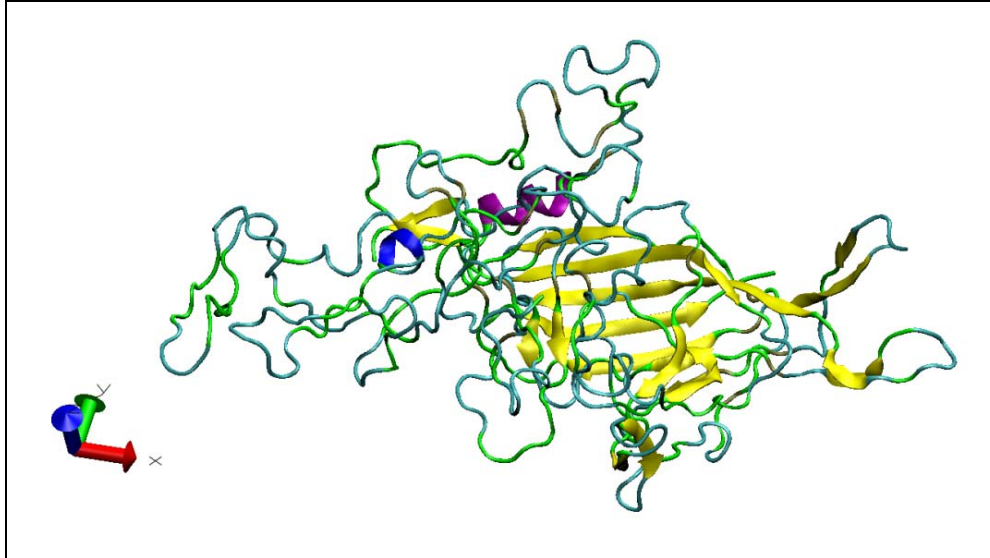


Figura 138: Estructura molecular de la proteína de la cápside del Parvovirus B19. Código de colores de estructuras secundarias: hélice α , púrpura; hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

Para construir un modelo de la estructura tridimensional de P35 se precisó de estructuras moldes determinadas experimentalmente. Pero no se encontraron proteínas moldes cuya identidad de secuencia con P35 sea mayor a 25 % empleando los programas Swiss-Model y BLAST, por lo que se descartó el modelado por homología. Por lo tanto, se buscaron estructuras

patrón empleando el programa PSIPred para modelar por threading. Así se encontraron 3 posibles modelos: Angiostatin (proteína inhibidora de angiogénesis, código de PDB: 1ki0A), la proteína de la cápside del Parvovirus B19 (código de PDB: 1s58A) y BIN1 (proteína supresora tumoral, código de PDB: 1mV3). La Angiostatin y la proteína de cápside hibridaron en la misma región, abarcando la mayor parte de la secuencia de P35. La identidad de secuencia con el Ag fue de 16,7 y 5,4 % respectivamente. La BIN1 hibridó con la secuencia restante de P35. En las figuras 137, 138 y 139, se muestran las estructuras de Angiostatin, la proteína de cápside y BIN1, respectivamente. Se observó que las 3 estructuras poseían predominio de conformaciones coils y loops.

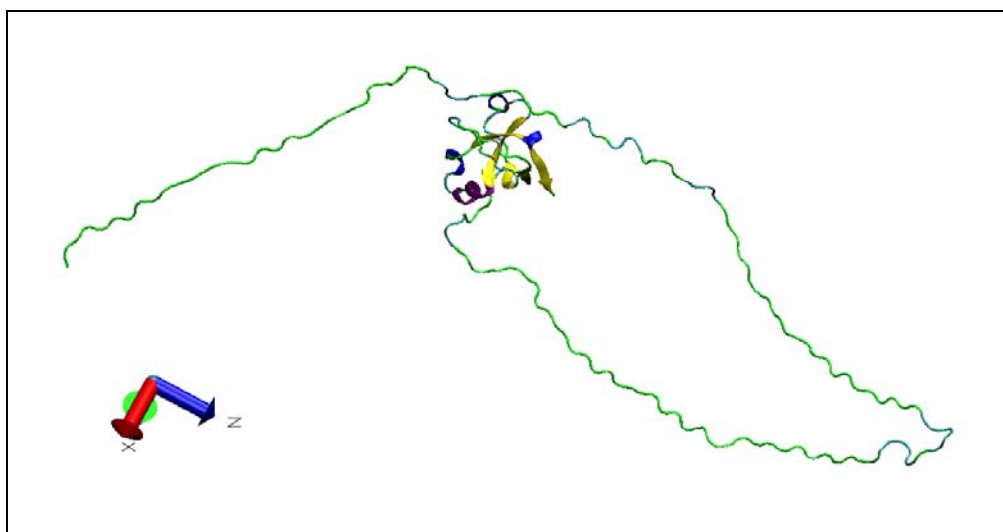


Figura 139: Estructura molecular del supresor tumoral BIN1. Código de colores de estructuras secundarias: hélice α , púrpura; hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

3.2.3. Modelado molecular

Empleando el programa Modeller, se realizaron 4 alineamientos diferentes entre P35 y las 3 proteínas moldes. Para cada alineamiento se generaron 5 modelos estructurales de P35. Los alineamientos fueron con:

- Angiostatin
- Proteína de cápside
- Angiostatin junto con BIN1.
- Proteína de cápside junto con BIN1.

No se combinó angiostatin con la proteína de cápside por una imposibilidad de alineamiento estructural entre ambas proteínas, requisito previo del programa Modeller para emplear moldes combinados antes de construir modelos nuevos.

Paralelamente, se construyeron 5 modelos con el programa de modelado automático I-TASSER.

Mediante el programa ANOLEA se evaluaron todas las estructuras obtenidas. La mejor según este programa, fue la construida con Modeller empleando la proteína de cápside junto con BIN1. Por lo tanto, a partir de estas dos estructuras se volvieron a construir los modelos con Modeller, pero realizando ajustes manuales en el alineamiento inicial (entre P35 y los moldes). Se prepararon 6 alineamientos diferentes y con cada uno se construyeron 5 modelos. Mediante los programas ANOLEA y Verify3D se evaluó cual de las 30 estructuras obtenidas fue la mejor.

A partir de las predicciones de estructuras secundarias y regiones proteicas celulares (ver punto 3.2.1. de esta misma sección) se conoció la existencia y ubicación de una estructura hélice transmembrana, la cual no se modeló a través de Modeller. Por ello, se procedió a construirla en el mejor modelo obtenido, empleando el programa Swiss-PDB Viewer.

Se realizó una minimización de energía estructural de 65 pasos. Luego se refinaron varios loops empleando el programa LOBO y evaluando las posibles mejorías del modelo mediante Verify3D. Los loops refinados quedaron ubicados entre las posiciones de AAs 2 a 24, 107 a 117 y 247 a 266. Finalmente, se realizó otra minimización de energía de 135 pasos.

En la figura 140 se muestran diferentes perspectivas de la estructura obtenida. El modelo final tuvo un 52,43 % de los AAs con un valor de Verify3D superior a 0,15 y un valor Z de energía normalizada de 14,95 E/kT según ANOLEA.

Casi toda la estructura obtenida estuvo formada por loops y coils, lo cual se explicó considerando que la estructura primaria de P35 alineó con las secuencias de la proteína de cápside y de BIN1 correspondientes a las estructuras de loops. A su vez, coincidió con las predicciones sobre las estructuras secundarias de PSIPred y otros análisis descritos en el punto 3.2.1. de esta misma sección.

En la figura 141 se muestra el mapa de Ramachandran obtenido a partir de esta estructura, en donde es posible apreciar cuales fueron los AAs ubicados en zonas prohibidas del mapa (puntos rojos). Estos fueron 6 AAs pre-prolinas, 6 prolinas y 6 del resto de los AAs, exceptuando la glicina. Esto significa que 6,74 % de los AAs tuvieron ángulos diedros poco comunes en la conformación final (Ramachandran y col., 1963), porcentaje inferior al máximo aceptado en la bibliografía (Danishuddin y col., 2011).

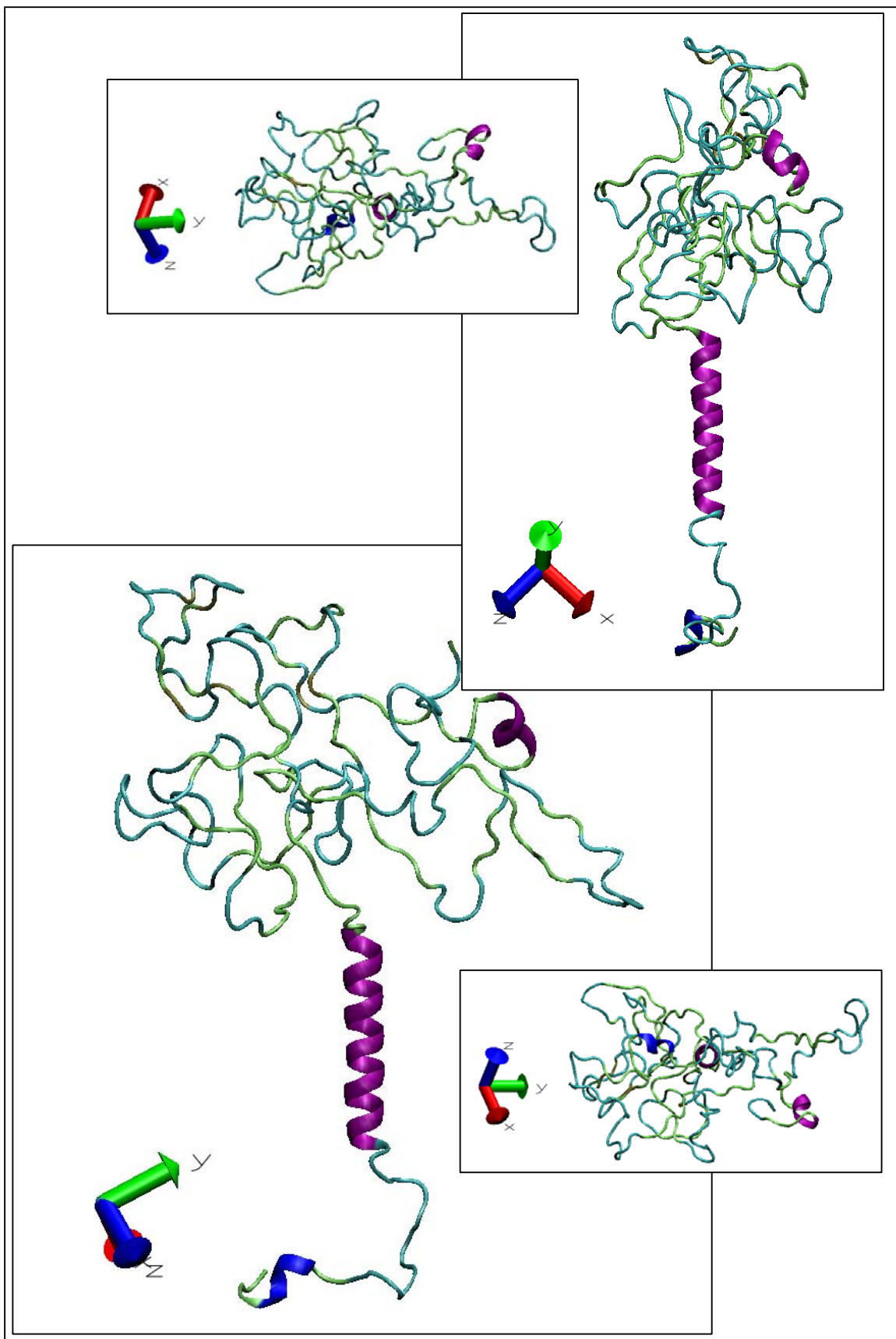


Figura 140: Distintas perspectivas del antígeno P35 luego del modelado molecular. Código de colores de estructuras secundarias: hélice α , púrpura; hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

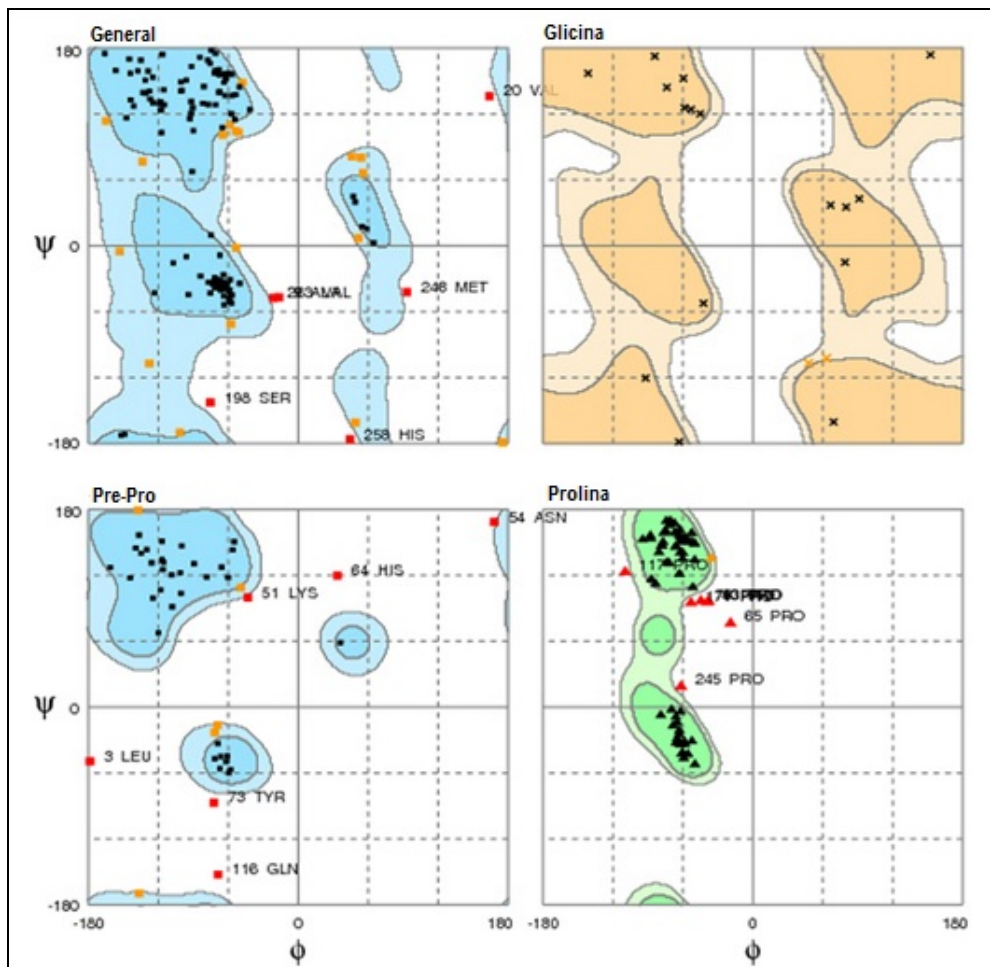


Figura 141: Mapa de Ramachandran de la proteína P35. Está dividido en 4 submapas según los grupos de AAs que se consideran. Los puntos rojos fueron los AAs que se ubicaron en zonas del mapa prohibidas.

3.2.4. Ubicación de regiones en la estructura conformacional de P35

Se buscaron todos los AAs que estuvieron expuestos en la superficie, empleando el programa Swiss-PDB Viewer. Los AAs encontrados estuvieron ubicados en las posiciones 1 a 14, 27, 35, 41 a 49, 55 a 61, 67 a 98, 107 a 118, 125 a 160, 168 a 175, 182 a 200, 205 a 207, 219 a 267. En la figura 142 se muestran las regiones expuestas sobre la superficie (en color anaranjado) sobre un esquema representativo de la estructura primaria de P35. La figura 143 muestra la estructura conformacional de P35 expuesta sobre la membrana, señalando en color gris los AAs que no se encontraron en la superficie.

En las figuras 144 y 145 se muestra la estructura tridimensional de P35, donde se indicaron en negro las regiones que fueron retiradas en P35A y P35B, respectivamente.



Figura 142: Regiones de P35 expuestas sobre la superficie en color anaranjado, ubicadas sobre un esquema representativo de la estructura primaria de la proteína

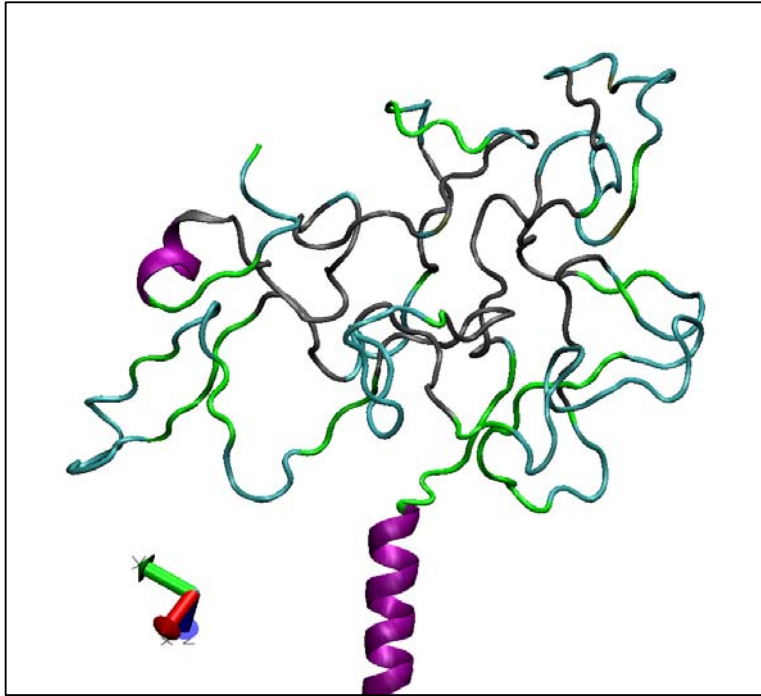


Figura 143: Regiones no expuestas a la superficie en P35, en color gris. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α , púrpura; loop, cian y coil, verde.

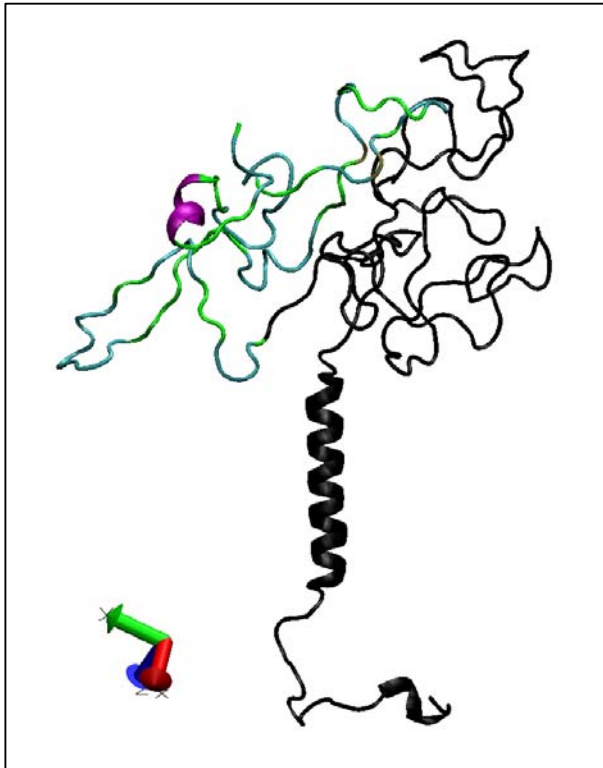


Figura 144: Ubicación de P35A sobre la estructura terciaria de P35. En negro se muestran las regiones excluidas. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α , púrpura; loop, cian y coil, verde.

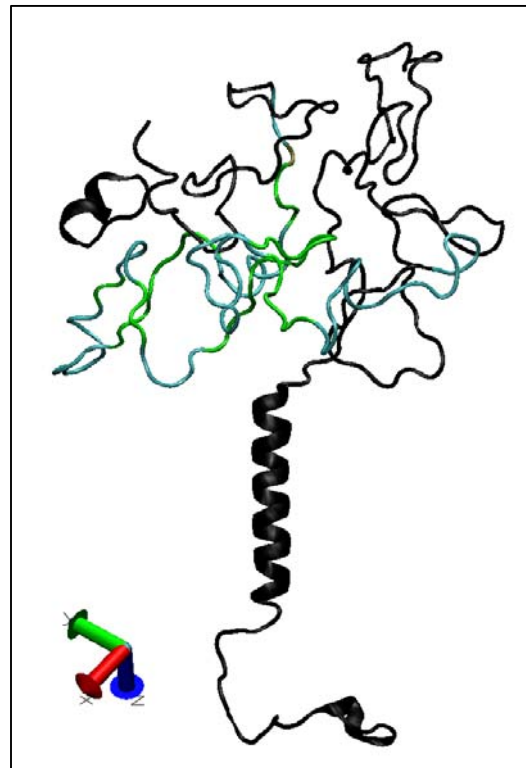


Figura 145: Ubicación de P35B sobre la estructura terciaria de P35. En negro se muestran las regiones excluidas. Código de colores de las estructuras secundarias: loop, cian y coil, verde.

3.2.5. Predicción de epitopes

Considerando que no hay ningún mapeo antigénico reportado y sólo se pudieron definir aproximadamente algunas regiones de epitopes, su predicción adquirió mayor relevancia.

Empleando el programa AAPPred, se predijeron los epitopes lineales para P35. Se tomó el valor 1 como puntaje antigénico umbral. Los epitopes predichos estuvieron entre los AAs 44 a 78, 86 a 91 y 190 a 196 (ver figura 146). El primero fue el más antigénico y se encontró en ambas secuencias. El segundo se encontró sólo en P35B y el tercero no fue expresado. En la figura 148 se muestran estos epitopes ubicados sobre la estructura conformacional.

Empleando Discotope se predijeron los AAs pertenecientes a epitopes estructurales. Estos fueron: 34 a 38, 41, 50, 57, 61, 62, 68 a 71, 73 a 79, 81 a 83, 88 a 98, 104 a 132, 135, 142 a 144, 150, 157, 158, 191 a 195 y 197 a 200 (figuras 147 y 149). Desafortunadamente el programa no los agrupó en epitopes, pero la mayoría de los AAs antigénicos se encontraron en P35B.



Figura 146: Esquema de la ubicación de los epitopes lineales predichos sobre la estructura primaria de P35.



Figura 147: Esquema de la ubicación de los epitopes estructurales predichos sobre la estructura primaria de P35.

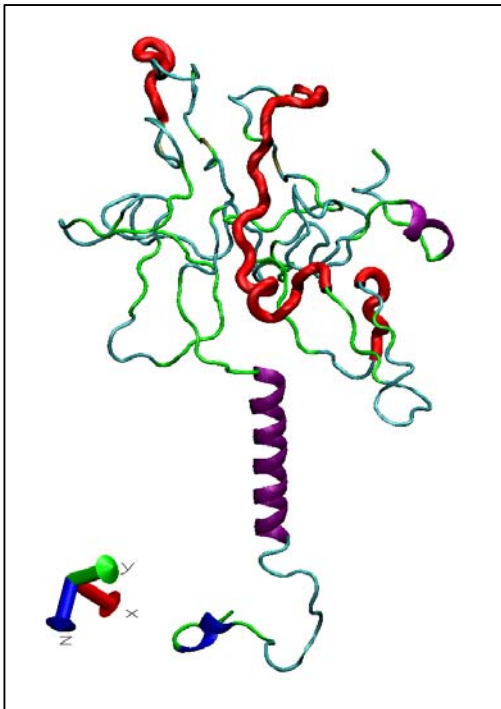


Figura 148: Ubicación de los epitopes lineales predichos sobre la estructura terciaria de P35. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α , púrpura; hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

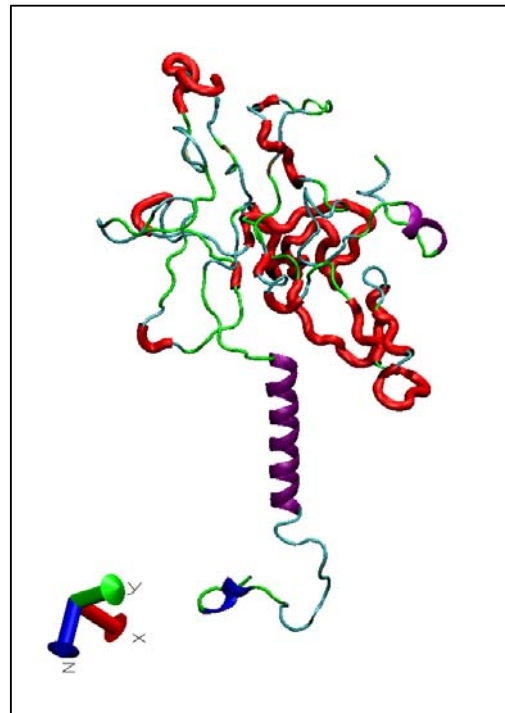


Figura 149: Ubicación de los epitopes estructurales predichos sobre la estructura terciaria de P35. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α , púrpura; hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

3.2.6. Hipótesis sobre la ubicación de los epitopes

Considerando los datos experimentales, análisis *in silico* y datos bibliográficos; se definieron 2 regiones antigénicas. En la figura 150 se presenta un esquema de estas regiones así como de otras de interés, ubicadas sobre la estructura primaria de P35. Se muestra la localización de las regiones expuestas sobre la superficie (*Superficie*), los epitopes lineales predichos (*E. lineales*), los epitopes estructurales predichos (*E. estructurales*), la región que se supuso antigénica por datos bibliográficos (*Li y col.*; Li y col., 2000a y 2000b), la secuencia expresada de P35A (*P35A*), la secuencia expresada de P35B (*P35B*) y la región que se supuso no contener ningún epitope inmunodominante (*Pfrepper y col.*; Pfrepper y col., 2005). En el esquema se señala aproximadamente mediante un recuadro rojo las 2 regiones antigénicas encontradas, numeradas según la importancia antigénica inferida.

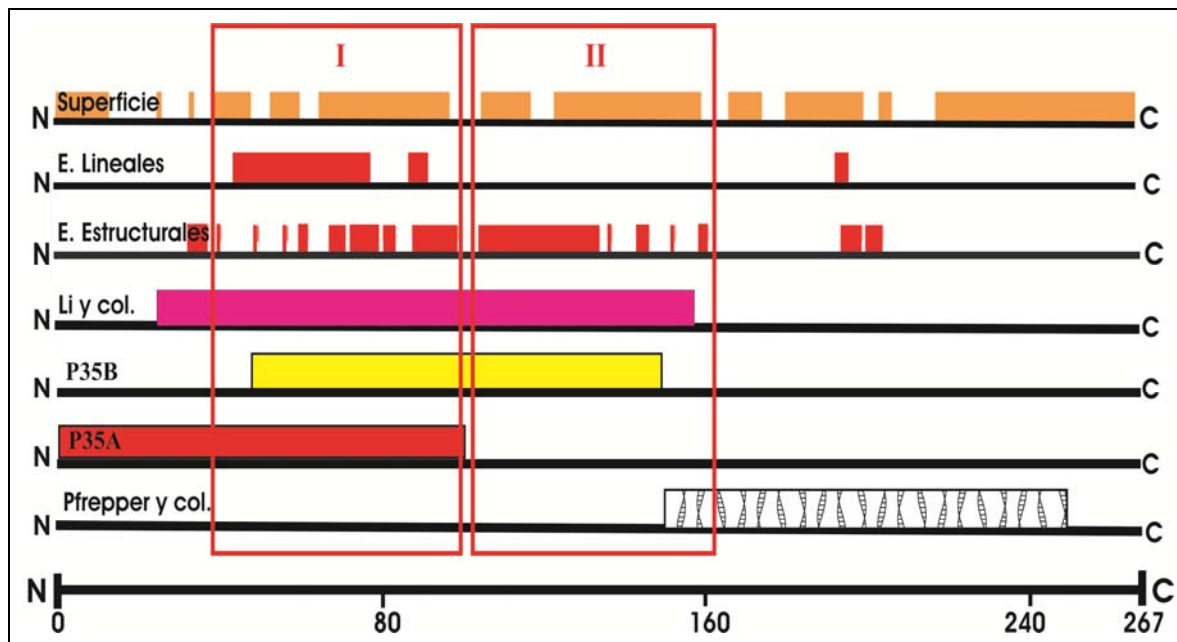


Figura 150: Esquema donde se muestran en color anaranjado las regiones expuestas sobre la superficie (*Superficie*); en color rojo oscuro la secuencia expresada de P35A (*P35A*); en color amarillo la secuencia expresada de P35B (*P35B*); en color rojo los epitopes lineales predichos (*E. lineales*) y estructurales predichos (*E. estructurales*); en color fucsia la región que se supuso antigénica según los datos bibliográficos (*Li y col.*; Li y col., 2000a y 2000b) y en color blanco con rayas la región que se supuso no poseer ningún epitope inmunodominante (*Pfrepper y col.*; Pfrepper y col., 2005). Abajo hay un esquema de las posiciones de AAs de P35 completa. Los rectángulos transparentes con bordes rojos muestran aproximadamente las regiones antigénicas.

Región antigénica I: Es la región comprendida entre las posiciones de los AAs 44 a 98.

Se muestra en color rojo sobre la estructura molecular de P35 en la figura 151. Incluye completamente algunas de las regiones expuestas sobre la superficie (en las posiciones de los AAs 55 a 61 y 67 a 98); 2 epitopes lineales predichos (en las posiciones de AAs 44 a 78 y 86 a 91), siendo el primero el de mayor puntaje antigénico; varios AAs pertenecientes a epitopes estructurales predichos (en las posiciones de AAs 50, 57, 61, 62, 68 a 71, 73 a 79, 81 a 83 y 88 a 98) y la región compartida entre P35A y P35B. La Región Antigénica I fue definida por el AA

inicial de uno de los epitopes lineales y el AA final de uno de los epitopes estructurales. Esta región fue la única que incluyó epitopes predichos tanto lineales como estructurales.

Región antigénica II: Es la región comprendida entre las posiciones de los AAs **107 a 158**. Incluyó la mitad de P35B, pero nada de P35A. Abarcó 2 regiones expuestas sobre la superficie (posiciones de AAs en 107 a 118 y 125 a 160) y los AAs pertenecientes a los epitopes estructurales (posiciones de AAs en 104 a 132, 135, 142 a 144, 150, 157 y 158). La posición de esta región antigénica la definió el primer AA de la región expuesta sobre la superficie y el último AA antigénico predicho.

Cabe señalar que estructuralmente las regiones se encontraron en diferentes zonas de la proteína. La región antigénica I se posicionó en la zona ubicada en la región espacial positiva de los 3 ejes (x-y-z) mientras que la región antigénica II se ubicó en la región negativa de estos 3 ejes.

Las 2 regiones antigénicas incluyeron casi toda la región que tendría epitopes inmunodominantes según los datos de Li y col. (Li y col., 2000a y 2000b). Solamente la región II incluyó algunos AAs de la región que, según los datos de Pfrepper y col. (Pfrepper y col., 2005), se presumió no posee epitopes inmunodominantes.

Según estas hipótesis, P35B pudo diferenciar mejor que P35A la fase aguda de la fase crónica de toxoplasmosis, por la Región Antigénica II que no estuvo presente en P35A, a pesar que la Región Antigénica I fue planteada

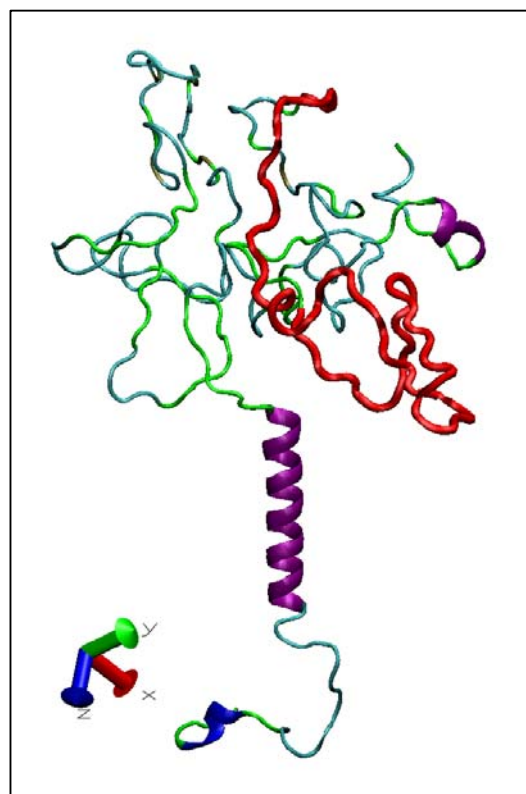


Figura 151: Ubicación de la región antigénica I en la estructura tridimensional de P35, en color rojo. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α , púrpura; hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

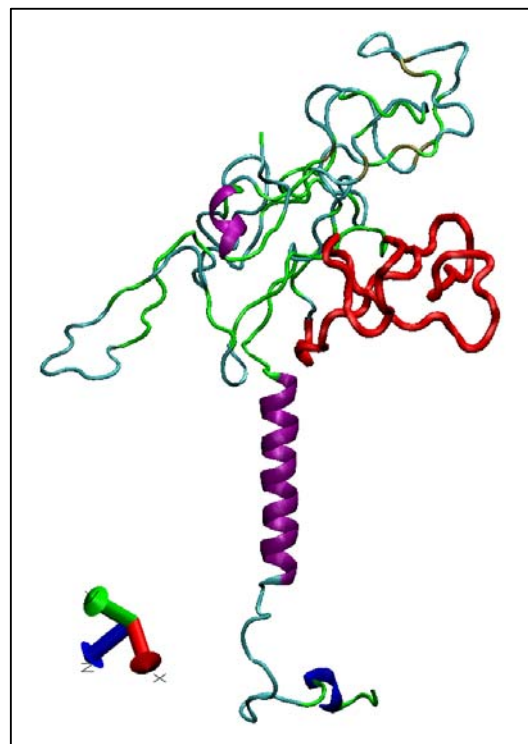


Figura 152: Ubicación de la región antigénica II, en color rojo, en la estructura tridimensional de P35. Código de colores de las estructuras secundarias: hélice α , púrpura; hélice 3-10, azul; loop, cian y coil, verde.

como la más inmunodominante. Desafortunadamente, no se pudieron definir regiones antigénicas inespecíficas exclusivas de P35A, que explicarían la mayor reactividad e inespecificidad de este Ag.

Finalmente, se observó que si bien no se pudieron expresar las otras regiones de P35 (P35C, P35D y P35E), no hubo indicios de que tengan epitopes relevantes estas secuencias.

En este trabajo se dividió P35 en 5 secuencias: P35A, P35B, P35C, P35D y P35E. Si bien se pudieron clonar con éxito las 5, sólo se pudieron expresar las 2 primeras. Se ensayaron diferentes vectores y cepas de expresión, pero no se lograron cambiar los resultados. El motivo que impidió inducir las 3 últimas regiones, también imposibilitó expresar la secuencia completa de P35 (P35T) que también se clonó con éxito, e incluía P35C, P35D y P35E. Si bien no se encontró una causa que explique esto, con el análisis bioinformático se encontraron características distintivas entre la secuencia "expresable" y la "no expresable". Del estudio bioinformático también se observó que las regiones con posibles epitopes se encontraron solamente en las secuencias que se expresaron y principalmente en P35B. Esto concordó con los resultados de los ensayos inmunoquímicos, donde P35B diferenció SIA de SIC mejor que P35A.

4. Anexo A: Evaluación de los programas de predicción de epítopes lineales

En este trabajo se utilizaron los predictores *in silico* de epítopes lineales para complementar y explicar los resultados experimentales.

Existe una amplia variedad de programas para predecir epítopes lineales pero muy poca información bibliográfica sobre su eficiencia, por lo que es muy difícil con la información disponible escoger qué programa emplear. Por eso, se decidió evaluar el desempeño de 5 de los programas más ampliamente utilizados (AAPPred, BCEpred, ABCpred, BEPIpred y Antigenic), contrastando sus predicciones con la información experimental de epítopes lineales ya disponible en la bibliografía (a través de los VPP).

4.1. Selección de las proteínas empleadas: La selección de datos para evaluar los programas es siempre una tarea difícil. Ninguna base de datos es considerada de referencia porque las mismas no son completas y fueron construidas con datos experimentales heterogéneos (Caoili, 2010). Por lo tanto, la evaluación de programas de predicción de epítopes lineales utilizando las bases de datos enteras disponibles no es suficientemente confiable. Teniendo en cuenta esta dificultad, se utilizó un espacio muestral moderado pero muy controlado. Todas las proteínas utilizadas fueron manual y cuidadosamente seleccionadas. Además, a diferencia de los autores de los programas (Davydov y Tonevitsky, 2009; Saha y Raghava, 2006; Saha y Raghava, 2004; Jens y col., 2006; Kolaskar y Tongaonkar, 1990) no se utilizaron epítopes negativos experimentales (regiones no antigénicas), porque no son necesarios para realizar el cálculo del VPP. Por lo tanto, consideramos que nuestros resultados son más fiables que aquellos que evalúan estos programas empleando sensibilidad y especificidad, porque para estimar esta última se precisa de epítopes negativos, cuya determinación es menos confiable que la de los epítopes positivos (Caoili, 2010). Si bien el espacio muestral aquí utilizado fue más pequeño que los empleados en otros trabajos (Davydov y Tonevitsky, 2009; Saha y Raghava, 2006; Saha y Raghava, 2004; Jens y col., 2006; Kolaskar y Tongaonkar, 1990), se realizó una selección meticulosa de los epítopes positivos sobre la base de homogeneidad de los datos experimentales.

4.2. Empleo del VPP únicamente para evaluar los programas: No se empleó el método usual de cálculo de sensibilidad y especificidad, así como tampoco el VPN. El cálculo de sensibilidad permite determinar la proporción de epítopes reales que encuentra la técnica respecto a todos los que existen en el espacio muestral. Por otra parte, el VPP es la proporción de los epítopes

predichos correctamente respecto a todos los epítopes ofrecidos como resultados. El motivo por el cual es posible prescindir del cálculo de la sensibilidad es que, para diagnóstico, es esencial contar con epítopes específicos de la especie causante de la infección a evaluar y ningún epítope con reactividad hacia otros patógenos. En efecto, la sensibilidad sería un parámetro crucial si se precisara encontrar todos los epítopes que posee una proteína, por ejemplo, para desarrollo de vacunas. En ese caso particular, algunos epítopes son esenciales para comenzar la respuesta inmune requerida y no es posible omitirlos. Contrariamente a dicha situación, para utilizar antígenos con fines diagnósticos como es el caso de este trabajo, los epítopes inmunodominantes ya no son primordiales sino que, lo importante es tener únicamente epítopes específicos del parásito que generó la infección que se desea detectar. Puesto que, en este trabajo empleamos estos programas para definir epítopes útiles para diagnóstico, sólo se observó si los resultados de los programas eran verdaderos y no si encontraban todos los epítopes posibles dentro de una proteína, por lo que sólo se calculó el VPP. A su vez, no se calcularon los parámetros de especificidad y VPN, porque para ello se requiere conocer las secuencias que no son epítopes, información difícil de obtener y/o definir con certeza.

Para realizar la evaluación, se seleccionaron 11 proteínas cuyos epítopes lineales habían sido mapeados experimentalmente y se corrieron en los programas. En la figura 153 se muestra como ejemplo los epítopes reales y predichos para una de las proteínas utilizadas para el análisis, la proteína MPV70.



Figura 153: Esquema ejemplo para la secuencia MPV70 donde se muestran los epítopes experimentales, los epítopes predichos por AAPPred, ABCpred, BCEpred, BEPIpred, Antigenic, procedimiento del Consenso débil y procedimiento del Consenso fuerte. En las predicciones de los programas, los sectores color gris oscuro corresponden a los epítopes predichos con alto puntaje antigénico.

En función de los epitopes predichos correctamente, se calculó los VPP para cada programa. También se analizó si emplear consensos de varios programas mejora las predicciones. Para ello, se definieron dos metodologías de "consenso de resultados": Consenso débil y Consenso fuerte (ver punto 2.3.3. de Materiales y Métodos). Para cada una también se halló el VPP. Finalmente, también se calculó el VPP para una predicción azarosa. Los resultados de los VPP obtenidos se muestran en la figura 154. Por ejemplo, para Bepipred, el 45,3 % de los epitopes encontrados, son verdaderos epitopes. De ahí se observa que el AAPPred tuvo el mayor valor medio de VPP, seguido del ABCpred. El programa que dio el valor medio más pequeño fue el BCEpred. Como se trabajó con un panel de proteínas, se calcularon los intervalos de los VPP con una confianza del 90 % para todos los procedimientos de predicción. Sus resultados también se muestran en la figura 154. Por ejemplo para el ABCpred, el verdadero valor del VPP está entre los valores 47,1 y 78,6 %, con una confianza del 90 %.

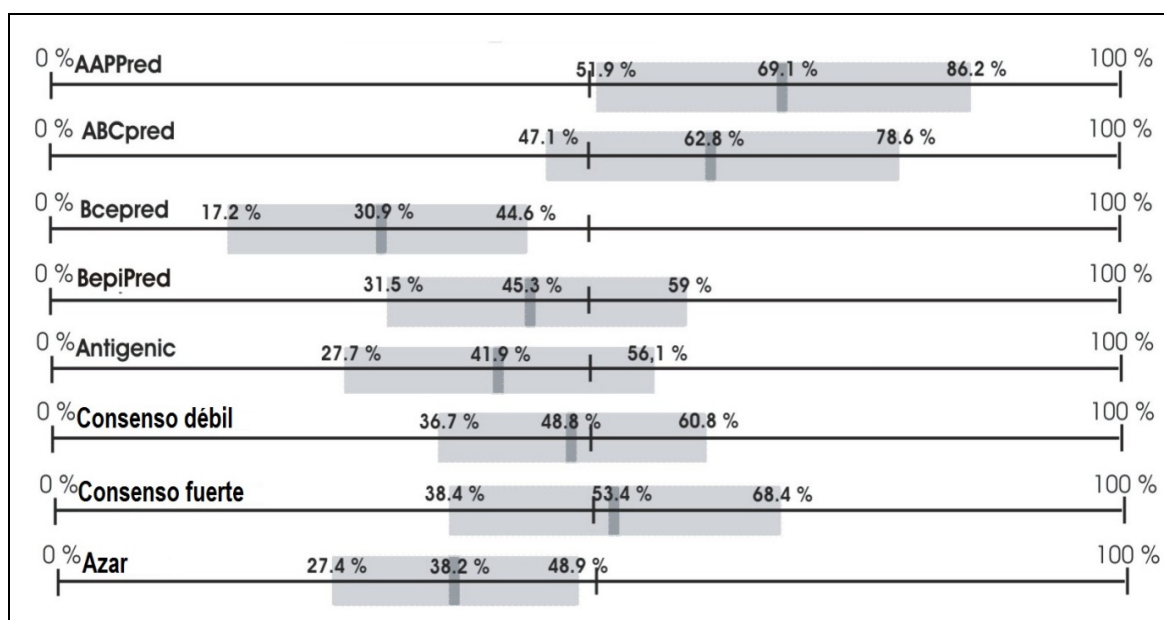


Figura 154: Valores de VPP y sus intervalos con 90 % de confianza, obtenidos para los programas, procedimientos de consensos y selección al azar.

Se calculó también el intervalo de confianza de 90% para la diferencia entre los VPP de los programas y/o procedimientos de predicción, pudiendo considerarse solamente en esta instancia que el espacio muestral para el análisis de cada programa fue el mismo y por lo tanto los datos eran pareados. Esto permitió observar que programas y/o procedimientos tuvieron diferentes VPP. En la tabla 17 se muestran los resultados. En los intervalos que no se contuvo el valor 0 (letra en cursiva y roja) las medias de los VPP no fueron iguales, establecido con una confianza del 90 %. De aquí se observó que los VPP del ABCpred y el AAPPred fueron diferentes y superiores al resto de los programas, asegurado con significancia estadística.

	AAPPred	ABCpred	Bepipred	Antigenic	BCEprep	Cons. d.	Cons. f.
ABCpred	-7,9 a 20,5	-	-	-	-	-	-
Bepipred	<i>10,3 a 37,3</i>	<i>6,8 a 28,3</i>	-	-	-	-	-
Antigenic	<i>0,2 a 54,1</i>	<i>2,3 a 39,5</i>	-15,3 a 22,0	-	-	-	-
BCEprep	<i>19,0 a 57,3</i>	<i>20,9 a 42,8</i>	<i>1,9 a 26,8</i>	-4,1 a 26,1	-	-	-
Cons. D.	<i>2,9 a 37,7</i>	<i>3,5 a 24,6</i>	-11,4 a 18,4	-6,9 a 20,6	<i>3,9 a 31,8</i>	-	-
Cons. F.	-2,7 a 34,1	-5,7 a 24,5	-8,4 a 24,7	-4,8 a 27,7	<i>4,4 a 40,6</i>	-4,4 a 13,7	-
Azar	<i>10,6 a 51,3</i>	<i>12,7 a 36,6</i>	-3,9 a 18,1	-12,3 a 19,8	-17,9 a 3,5	-3,8 a 25	-3,1 a 33,6

Tabla 17: Intervalo de confianza de 90 % obtenido para las diferencias entre los VPP de los programas, consenso de los mismos y procedimiento de azar. Los intervalos que están en letra cursiva y color rojo no abarcaron el valor 0.

Otros trabajos de evaluación de programas de predicción fueron publicados por Blythe y Reimer (Blythe y Flower, 2005; Reimer y col., 2009). El primero evaluó las escalas de propensión en lugar de programas disponibles en internet. Utilizaron 484 escalas de propensión diferentes para predecir la antigenicidad de AAs en proteínas mediante el uso de simples algoritmos; en general, diferentes comparaciones sencillas de los promedios de los valores de las escalas de propensión. En este caso, calcularon los coeficientes de correlación de Matthews y de Información Mutua y concluyeron que el uso de escalas de propensión sólo permitía una predicción de epitopes ligeramente superior a la predicción al azar (Blythe y Flower, 2005). Cabe aclarar que a excepción del algoritmo utilizado por el programa BcePred, que es comparable a los utilizados por Blythe y Flower, los algoritmos utilizados por los otros programas estudiados en nuestro trabajo son muy diferentes y más complejos. En cambio, Reimer y col. evaluaron dos de los cinco programas de predicción aquí estudiados, ABCpred y BepiPred (Reimer y col., 2009). Los parámetros que analizaron en ese caso fueron sensibilidad y especificidad de los programas. Reimer también concluyó que emplear escalas de propensión ofrece predicciones sólo un poco mejores que las predicciones al azar. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad no informan cuántos de los epitopes predichos por el programa son reales. Por el contrario, el análisis que se presenta en este trabajo permite evaluar esta característica.

En el caso de los programas de BcePred y ABCpred, sus VPP fueron determinados por sus autores, utilizando la base de datos completa de BciPep (Saha y col., 2005), pero no calcularon los intervalos de confianza (Saha y Raghava, 2004 y 2006). Los VPP reportados fueron 58,7 % y 65,6 %, para BcePred y ABCpred, respectivamente. Como se muestra en la figura 154, el intervalo de confianza del VPP obtenido con BcePred fue entre 17,2 a 44,6 %,

rango que no incluye el valor previo informado. Pero con ABCpred el rango fue entre 47,1 y 78,6 %, si conteniendo en este caso el valor reportado por ellos. En la figura 154 y tabla 17, se observa que ABCpred fue uno de los programas de predicción que mejores resultados arrojó, mientras que BcePred mostró el menor VPP promedio, inclusive inferior que el del método al azar.

En cuanto al programa AAPPred, los autores no evaluaron el VPP (Davydov y Tonevitsky, 2009). Para este predictor, nuestros resultados mostraron que el VPP osciló entre 51,9 a 86,2 %, con 90 % de confianza, lo que indicó que AAPPred fue el mejor programas de predicción, junto con ABCpred (figura 154). Cabe mencionar que AAPPred utiliza el método sustentado por vectores, también empleado por otros programas actuales como BCpreds (Chen y col., 2007), FBCpred (El-Manzalawy y col., 2008), LEPs (Wang y col., 2011) y COBEpro (Sweredoski y Baldi, 2009).

La principal explicación de la diferencia entre los resultados producidos por los programas analizados es que los algoritmos que utilizan son muy diferentes. Cuando comparamos los resultados producidos por AAPPred con los de BcePred, que comparten 6 de las 7 escalas de propensión, es evidente que los programas arrojaron resultados muy diferentes (ver figura 154 y tabla 17), sugiriendo que el propio algoritmo es el factor que más contribuyó a las diferentes capacidades de predicción de los programa y que las escalas de propensión sí fueron útiles para las predicciones.

Finalmente, la figura 154 y la tabla 17 muestran que emplear varios programas al mismo tiempo para determinar las regiones más antigénicas no mejoró el desempeño individual de los programas con los mejores resultados, AAppred y ABCpred. Además, pudimos afirmar con 90 % de confianza que el consenso fuerte sólo fue superior a BcePred.

5. Anexo B: Evaluación de la proteína de fusión TrxA

Se expresó la proteína TrxA unida a los antígenos en 5 de las 6 proteínas que fueron expresadas exitosamente en este trabajo (P22c, P22L, P30c, P35A y P35B), debido al empleo del vector pET-32a. Por lo tanto, se estimó el efecto de esta proteína de fusión sobre la especificidad de los antígenos, evaluando la reactividad individual de TrxA frente a sueros humanos.

5.1. Clonado, expresión y purificación de la proteína

El vector pET-32a sin ningún inserto se introdujo en una cepa de expresión, *E. coli* BL21 DE3. Luego se indujo TrxA como se indicó en el punto 1.2.1. de Materiales y Métodos. A continuación, se muestra la secuencia aminoacídica que se expresó, indicando en color verde la secuencia propia de TrxA y en amarillo la única secuencia de poli-histidina traducida.

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMI
 APILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFK
 NGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH
 HHHHSSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLG
 TDDDDKAMADIGSEFELRRQACGRTRAPPPPLRSG
 C

La secuencia completa tuvo 189 AAs, siendo los primeros 109 propios de TrxA. El peso molecular de la proteína fue de 20,4 KDa.

Se purificó la proteína de interés como indica el punto 1.2.3.1 de Materiales y Métodos. La figura 155 muestra un PAGE donde se observó el resultado de la purificación. La proteína (banda señalada con la elipse roja) corrió unos pocos KDa más arriba de lo esperado. Si bien la técnica no permitió obtener la proteína con el nivel de pureza según el criterio prefijado (ver punto 1.2.3. de Materiales y Métodos), como control negativo fue adecuada para continuar trabajando.

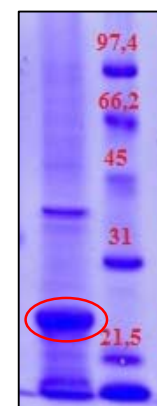


Figura 155: PAGE con la purificación realizada para TrxA al lado de un MPM.

5.2. Dot blot

Para observar las reactividades generales de las diferentes proteínas, se realizó un dot blot con TrxA, P35A, P35B y lisado del parásito para detección de IgG específica, como se detalla en

el punto 1.3.4. de Materiales y Métodos. Se utilizaron 2 mezclas de sueros, una conteniendo 4 SIP (2 SIA y 2 SIC) y otra 4 SIN. Los sueros empleados, ofrecieron previamente señales representativas a cada grupo en ELISA indirecto para IgG. El resultado se muestra en la figura 156. Se observó que el lisado y P35B reaccionaron preferentemente con la mezcla de SIP y no con la mezcla de SIN. P35A reaccionó tanto con la mezcla de SIP como con la de SIN. La proteína TrxA no reaccionó con ninguna de las dos mezclas, a pesar de haber estado contaminada con restos bacterianos de *E. coli* (figura 156), en coincidencia con lo informado por Hiszczyńska-Sawicka y Parmley, que demostraron que las proteínas de *E. coli* no tienen reactividad contra SIN (Parmley y col., 1992; Hiszczyńska-Sawicka y col., 2003).

Si bien 1/1000 fue la dilución del Ac conjugado utilizado en el ensayo cuyos resultados se presentan en la figura 156, resultados similares se obtuvieron con diluciones 1/500 y 1/2000.

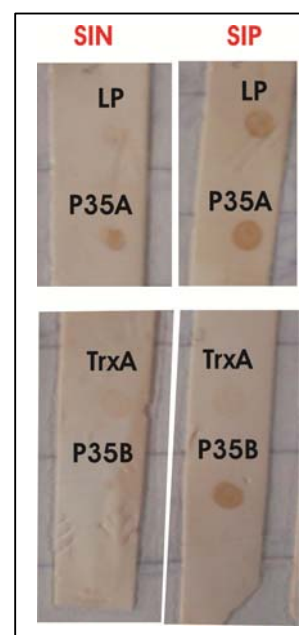


Figura 156: Dot blot con las proteínas P35A, P35B, TrxA y el lisado del parásito (LP).

6. Comparación entre las proteínas

6.1. Obtención de los antígenos

Todos los Ags en este trabajo fueron clonados en la bacteria *E. coli*. P22c se expresó soluble en buenas condiciones, no así P22L, que aparentemente se desnaturalizó en el proceso de solubilización, coincidente con los antecedentes bibliográficos (Parmley y col., 1992). Las fracciones de P30, si bien se pudieron expresar, se requirió de diferentes procesos de purificación para obtener cantidades útiles solubles. No obstante, las proteínas no adquirieron las conformaciones naturales de la proteína *in vivo*, en coincidencia con lo reportado previamente (Burg y col., 1988; Velge- Roussel y col., 1994; Nigro y col., 2003; Selseleh y col., 2012a; Meek y col., 2003; Burg y col., 1988; Makioka y Kobayashi, 1991). En el caso de P35, sólo pudo expresarse soluble la mitad amino terminal de la proteína, mientras que las secuencias que contuvieron la región carboxi terminal no pudieron ser expresadas, en coincidencia con trabajos previos (Babaie y col., 2009).

En la figura 157 se muestra un PAGE en donde se corrieron juntos todos los Ags expresados en el presente trabajo. Cada par de regiones evaluadas dentro de cada proteína (P22, P30 y P35) fue purificada mediante diferentes condiciones. Y de todas, las que indujeron con mayores concentraciones fueron las secuencias de P22. Posiblemente, también fue por esta misma razón que hubo mayor diferencia entre los protocolos de purificación en ese par de Ags; P22L formó cuerpos de inclusión que se generan no sólo cuando la proteína es insoluble, sino también cuando hay altas cantidades de la misma (Sørensen y Mortensen, 2005). P35A y ambas fracciones de P30 también presentaron una fracción del total inducido en el precipitado, indicando que cierta cantidad de las proteínas totales expresadas fueron insolubles, pero sin formar cuerpos de inclusión.

En este trabajo se planteó el cambio de vector de expresión para resolver problemas de antigenicidad en P30c y problemas de expresión en P35. En el primer caso se cambió el vector pQE por pET-32a y en el segundo se ensayaron los vectores pRSET B, pET-32a, pMal-c2X y pET-

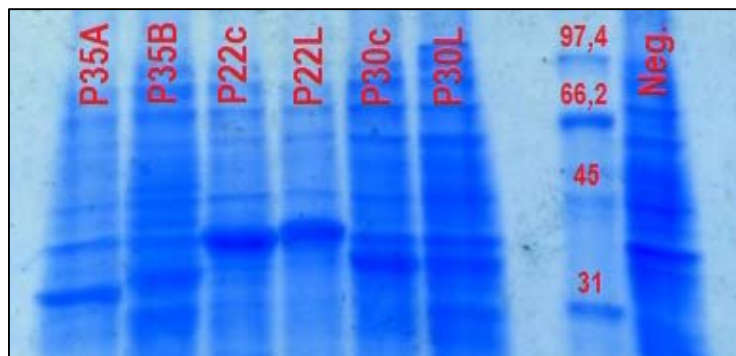


Figura 157: PAGE donde se corrieron muestras con lisados de células que indujeron todas las proteínas recombinantes, un MPM y un control negativo (lisado de células que no expresaron ninguna proteína recombinante; Neg.)

24a. En ninguna situación el cambio de plásmido resolvió los problemas.

6.2. Bioinformática

P22 y P30 pertenecen a la misma familia de proteínas, SAG. En ambas se encontró un dominio SRS, pero en P30 estuvo repetido 2 veces. A su vez, los puentes disulfuros descritos en P30 no se encontraron en P22. Otra diferencia significativa entre estos Ags, fue que a pesar que ambos tienen regiones carboxi terminales escindidas en la maduración postraducciona, en P30 se encontró una región antigénica en esa zona. Por otro lado, si bien compartieron una estructura patrón, las estructuras conformacionales predichas fueron diferentes, por ejemplo: P30 tuvo 2 dominios estructurales, mientras P22 sólo 1.

Paralelamente, P22 y P30 tuvieron mayor cantidad de secuencias hélices y hojas plegadas β que P35, cuya estructura fue principalmente loops y coils. Como las estructuras loops y coils no son tan rígidas como las hélices y hojas plegadas β , una proteína que esté compuesta principalmente por estas estructuras secundarias, será más flexible y no requerirá demasiada estabilidad en su estructura para cumplir sus funciones celulares. A su vez, probablemente ocurrirá lo mismo con la unión de los Acs; tendrá principalmente epitopes lineales o estructurales no tan estrictos en sus requerimientos conformacionales. Esto corresponde a lo observado: los 3 Ags (P22, P30 y P35) se expresaron en *E. coli*, que tiene un ambiente citoplasmático diferente al de *T. gondii* y P35 fue la proteína con regiones clonadas y expresadas más fraccionadas, pero a pesar de ello, fue la que mostró mejor reactividad antigénica diferenciada entre los grupos de sueros.

Comparando las conformaciones predichas para los Ag, los órdenes de calidad (de mayor a menor) dependieron del programa que se haya empleado para analizarlas. Según:

- ANOLEA (valor Z de energía normalizada): P22 (1,62 E/kT) > P30 (6,17 E/kT) > P35 (14,95 E/kT).

- Verify3D (porcentaje de AAs que superaron el valor de 0,15): P30 (94,94 %) > P22 (75,27 %) > P35 (52,43 %).

- Rampage (porcentaje de AAs que tuvieron ángulos diedros poco comunes): P30 (4,16 %) > P35 (6,74 %) > P22 (7,20 %).

Buscando un consenso, se podría afirmar que el orden de calidad de las estructuras predichas de las proteínas fue P30 > P22 > P35. Correspondiendo al orden de los porcentajes de identidad de las secuencias incógnitas con las estructuras primarias de los patrones utilizados (75,3 % para P30, 29 % para P22 y 5,4 % para P35).

6.3. Inmunoquímica

La tabla 18 muestra todas las áreas bajo las curvas ROC obtenidas en todos los inmunoensayos, empleando los diferentes Ags. Las celdas amarillas indican los Ags y valores de mayor área bajo la curva para cada técnica diferente.

En el ELISA indirecto detectando IgG, el mejor Ag para diferenciar "SIA de SIC" fue P35B (0,85). Pero para diferenciar "SIP de SIN" el mejor fue P22c (0,82). Los antígenos P22L, P30c y P30L tuvieron áreas bajo las curvas inferiores a 0,6.

Detectando anticuerpos IgA, mediante ELISA indirecto, P22c fue el Ag con mejor desempeño, tanto para diferenciar "SIA de SIC" como "SIP de SIN" (0,75 y 0,69; respectivamente). Cabe señalar que P30c fue el segundo mejor Ag diferenciando "SIP de SIN" (0,65).

Detectando anticuerpos IgM, con ningún Ag se superó el valor 0,6 en el área bajo la curva ROC.

De todos los ELISAs indirectos, las mayores áreas bajo las curvas fueron detectando IgG empleando los antígenos P35A, P35B y P22c (0,80; 0,85; 0,78; respectivamente, para "SIA contra SIC"; y 0,76; 0,79 y 0,82; respectivamente, para "SIP contra SIN"). Pero cabe señalar que el empleo de la técnica ELISA indirecto en la detección de anticuerpos IgA e IgM pudo tener el número de resultados falsos negativos aumentado debido a la inhibición competitiva con anticuerpos IgG de alta avidéz y también aumentado el número de falsos positivos detectando IgM por la unión inespecífica de anticuerpos naturales o factores reumatoides (Suzuki y col., 2000; Robinson y col., 2004). Estos factores podrían eliminarse utilizando la técnica de ELISA doble sandwich o de inmunocaptura.

En ELISA de avidéz para evaluar anticuerpos IgG, P35B mostró mejores resultados que P22c y alcanzó un área bajo la curva ROC de 1.

Ensayo	Ag	Área bajo la curva	
		SIA vs SIC	SIP vs SIN
ELISA detectando IgG	P35A	0,80	0,76
	P35B	0,85	0,79
	P22c	0,78	0,82
	P22L	0,55	0,50
	P30c	0,50	0,50
	P30L	0,58	0,58
ELISA detectando IgA	P35A	0,60	0,60
	P35B	0,73	0,63
	P22c	0,75	0,69
	P22L	0,53	0,50
	P30c	0,57	0,65
	P30L	0,64	0,57
ELISA detectando IgM	P35A	0,53	0,55
	P35B	0,60	0,59
	P22c	0,60	0,52
	P22L	0,51	0,55
ELISA de avidéz	P35B	1,00	-
	P22c	0,92	-
Dot blot semicuantitativo	P35A	0,68	-
	P35B	0,75	-

Tabla 18: Áreas bajo las curvas ROC de todos los inmunoensayos realizados, empleando los diferentes antígenos. Las celdas amarillas son aquellas que indican los Ags y valores de mayor área bajo la curva para cada técnica diferente.

En la técnica Dot blot semicuantitativo, en donde sólo se evaluaron las fracciones de P35, los resultados concordaron con el resto de los ensayos, con P35B ofreciendo los mejores resultados.

P22 fue la única proteína cuyas comparaciones de áreas bajo las curvas ROC entre las 2 secuencias clonadas (P22c y P22L), en detección de IgG e IgA, no se superpusieron, ofreciendo significancia estadística en su diferencia para distinguir grupos de sueros.

De todos los ensayos para diferenciar "SIA de SIC", el ELISA de avidéz fue el que mejores resultados brindó, seguido por ELISA para detectar IgG, empleando como antígenos P35B, P35A y P22c, en orden decreciente de áreas bajo las curvas.

De todos los ensayos para diferenciar "SIP de SIN", fue P22c el mejor Ag ensayado mediante detección de IgG con ELISA indirecto.

Exceptuando ELISA de avidéz, todos los ensayos se realizaron con un amplio número de muestras para cada grupo de sueros, en promedio 52 sueros para SIA, 51 sueros para SIC y 61 sueros para SIN. Por ello se podría afirmar que los parámetros calculados fueron representativos de los parámetros poblacionales.

Se destaca que P35 es el único antígeno de los evaluados en el presente trabajo, que nunca fue reportado por tener mayor reactividad contra SIP que contra SIA, contrariamente a lo que ocurre con P22 y P30. Con estos dos Ags, los mejores ensayos de diferenciación entre las fases detectando presencia de Acs, fueron observando los isotipos más específicos de la fase aguda, IgA e IgM. Esto se corresponde exactamente con la información bibliográfica en el caso de P30 (Araújo y Ferreira, 2010; Cesbron y col., 1985; Decoster y col., 1988 y 1992; Santoro y col., 1985). A su vez, P35B fue el único Ag que discriminó mejor "SIAS de SIC" que "SIA de SIC", detectando anticuerpos IgG e IgA, por lo que es probable que esta proteína pueda distinguir sueros de personas que están verdaderamente en fase aguda de sueros de personas en fase crónica pero que normalmente se confunden con los primeros.



Conclusión

El objetivo general de este trabajo fue lograr una optimización del diagnóstico de la fase aguda de toxoplasmosis en la embarazada, que permita una real prevención de la infección feto-materna, a través del tratamiento precoz y, alternativamente, que evite dicho tratamiento en los casos innecesarios. Se abordó esta problemática estudiando antígenos del parásito *Toxoplasma gondii*, compuestos fundamentales de las técnicas diagnóstico. Analizando la información precedente, se escogieron las proteínas P22, P30 y P35, pero en el proceso se observó gran disparidad entre las eficiencias reportadas. Esto se atribuyó a procedencias diferentes de los sueros, escasos números de muestras empleadas en algunos estudios, clasificación incierta de los sueros y principalmente, diferencias en el clonado de las proteínas. Por lo tanto, se guió el estudio de las 3 proteínas seleccionadas, teniendo en cuenta estos elementos.

Como se indicó en los puntos 1.2.1. y 2.4. de la Introducción, la reactividad de los Ags depende de la zona geográfica, debido a la distribución diferenciada de las cepas en las regiones. Todos los ensayos inmunoquímicos en este trabajo, se hicieron con sueros de personas que habitan en Argentina, por lo que los resultados obtenidos son válidos para continuar con los estudios de estas proteínas para desarrollo final de un kit diagnóstico a emplearse en nuestro territorio nacional. A su vez, siempre se empleó un elevado número de muestras por lo que los resultados obtenidos son representativos de toda la población (excepto en el ELISA de avidéz).

Se trabajó con sueros pertenecientes a personas sin infección por toxoplasmosis, con infección crónica y con presunta infección aguda. A su vez, este último grupo fue clasificado en dos subgrupos, en función de las posibilidades de que realmente sean sueros de individuos en fase aguda de la infección.

Se dividieron las proteínas en diferentes regiones, se clonaron y se evaluó su antigenicidad. La selección de las regiones y procedimientos de clonado fue mediante la elaboración de una estrategia que permitió observar la influencia de la selección de diferentes regiones de los antígenos a clonar y la variación de los resultados en función del empleo de distintos plásmidos de expresión.

Los ensayos inmunoquímicos realizados fueron ELISAs para detección de anticuerpos IgG, IgA e IgM, ELISA de avidéz y dot blot. Se destaca haber podido concretar una propuesta de ensayo dot blot semicuantitativo, como técnica prototipo para un potencial futuro kit. Paralelamente, se estudiaron las proteínas con herramientas *in silico*, procurando interpretar a nivel molecular resultados previos de los ensayos, así como profundizar en el entendimiento de los posibles antígenos a emplear en el futuro.

Se observó que diferentes regiones de una misma proteína que compartían secuencias aminoacídicas, tuvieron mayores diferencias de las esperables en los resultados experimentales, desde la expresión de las proteínas hasta los resultados inmunoquímicos:

En el caso de la proteína P22, agregar las secuencias del péptido señal y carboxi terminal desencadenó la insolubilización de la proteína y formación de cuerpos de inclusión. Si bien P22L logró solubilizarse, no logró adquirir una conformación apropiada, por cuanto no presentó resultados favorables. En las técnicas inmunoquímicas, el desempeño de P22c y P22L fue muy distinto, con P22c ofreciendo siempre mejores resultados que P22L, establecido con significancia estadística. En la detección de Acs, P22c fue el mejor Ag de todos los ensayados para diferenciar SIP de SIN, encontrándose un área bajo la curva ROC de 0,82. Los mejores resultados obtenidos para diferenciar SIA de SIC con P22, fue mediante la técnica ELISA de avidéz, en donde el área bajo la curva ROC fue 0,82.

Para la proteína P30, se ensayaron 2 secuencias de distintas extensiones. Una de ellas (P30c) ya evaluada por Nigro y col. (Nigro y col., 2003). Se empleó un plásmido distinto para cada secuencia de P30 evaluada en este trabajo. Estos a su vez fueron diferentes al empleado por Nigro y col., pero no se logró mejorar significativamente los resultados de los ensayos diagnóstico por él descriptos (Nigro y col., 2003). Sólo se evaluaron los Ags mediante ELISA para detección de anticuerpos IgG e IgA. Los mejores resultados se consiguieron diferenciando SIP de SIN para IgA empleando P30c, obteniéndose un área bajo la curva ROC de 0,65. Al igual que con P22L, se propuso que la proteína no se obtuvo con la conformación nativa, correspondiéndose a la de información bibliográfica (Araújo y Ferreira, 2010; Cesbron y col., 1985; Decoster y col.; 1988 y 1992; Santoro y col., 1985).

La proteína P35 se dividió en 5 regiones superpuestas. Estas se clonaron junto con la secuencia completa del Ag. Todas se intentaron expresar, pero no se consiguió con ninguna secuencia que contuviera algún segmento de la mitad de la proteína ubicada en la región carboxi terminal. Se probaron diferentes vectores pero no se lograron modificar estos resultados. En los ensayos inmunoquímicos, P35B permitió obtener los mejores resultados para discriminar entre SIA de SIC de todos los Ags evaluados, en detección de IgG y medición de avidéz, obteniéndose áreas bajo las curvas ROC de 0,85 y 1, respectivamente. Por lo expuesto, se desarrolló únicamente con esta proteína una técnica prototipo para un kit diagnóstico, dot blot semicuantitativo, para detección de IgG. No obstante, las áreas bajo las curvas ROC no alcanzaron los valores del ELISA para detección del mismo isotipo de anticuerpo. Las regiones evaluadas de P35 fueron las únicas que diferenciaron mejor SIAS de SIC que la discriminación entre SIA de SIC. Por ello, se propone este Ag para ser empleado para distinguir sueros provenientes de individuos con infección aguda, de sueros con algunas características de este grupo, pero pertenecientes realmente a individuos con infección crónica.

Basado en distintos análisis bioinformáticos, se desarrolló la hipótesis de que los diversos resultados se debieron a características distintivas entre las diferentes regiones de una misma

proteína. En P22c se encontraron 3 regiones antigénicas que explicarían el buen desempeño de este Ag. También se encontraron secuencias antigénicas en P22L que no estarían presentes en P22c, ya sea por no encontrarse en la secuencia o porque, de estar presente, no se encontraría expuesta, que explicaría la alta reactividad inespecífica de P22L. En P30, a partir de análisis bibliográficos, se definieron principalmente 2 regiones antigénicas, una de ellas ubicada en la región carboxi terminal y la otra en 1 de los 2 dominios estructurales de la proteína. Con P35, a partir del estudio bioinformático, se encontraron diferencias significativas entre las secuencias que pudieron expresarse de las que no. A su vez, sólo se encontraron zonas antigénicas importantes en las regiones que se pudieron expresar, principalmente en P35B, correspondiéndose con los resultados experimentales.

Estos análisis indicaron, por lo tanto, la presencia de factores intrínsecos en las secuencias que explicarían los resultados experimentales a los que se arribó con distintas regiones. Esto estaría en coincidencia con el hecho de que los problemas presentados para obtener antígenos eficientes para el diagnóstico, no pudieron ser resueltos variando los plásmidos de expresión.

Para el cumplimiento de los objetivos específicos se desarrollaron una amplia cantidad de procedimientos experimentales y análisis *in silico*. Los resultados siguientes destacan por su novedad y/o nivel de éxito:

- Empleando P22, se encontró por primera vez que la detección de anticuerpos IgA ofrece resultados prometedores para diferenciar las fases de la infección en toxoplasmosis.
- Empleando P35B, mediante ELISA de avidéz se encontraron por primera vez resultados muy prometedores para diferenciar las fases de la infección en toxoplasmosis.
- Se implementó exitosamente una sencilla metodología de diagnóstico dot blot semicuantitativo, para diferenciar SIA de SIC, empleando como antígenos P35A y P35B.
- Por primera vez se propusieron modelos de las conformaciones moleculares de las proteínas P22 y P35.
- A partir de los estudios experimentales de la bibliografía, se definieron en P30 dos principales regiones antigénicas.
- En base al análisis *in silico*, se propuso una hipótesis que explica el buen desempeño inmunoquímico de la secuencia P22c, así como su mal desempeño cuando se agregan las regiones amino y carboxi terminal y se desnaturaliza la proteína.
- En base al análisis *in silico*, se propuso una hipótesis que señala a P35B como la región (dentro de toda la proteína) que concentra todos los epitopes, explicando su buen desempeño inmunoquímico.

- Se demostró la gran variedad de resultados que se obtienen trabajando con regiones de una misma proteína que comparten secuencias, desde el clonado hasta los ensayos inmunoquímicos.

Trabajos a futuro

Para alcanzar el objetivo general propuesto en esta tesis se debería continuar con los estudios. En función de nuestros resultados se propone, respecto a:

- los sueros: armar un grupo de sueros que provengan de individuos en fase crónica, pero con algunas características de sueros de individuos cursando la fase aguda (como presentar anticuerpos IgM). Este grupo de sueros poseería las muestras "problemáticas", por las dificultades para clasificarlas con certeza. Se debería analizar las nuevas técnicas observando su capacidad de discriminar este grupo de sueros de los verdaderos SIA.

- los antígenos: clonar P35B, P22c y otra secuencia de P30 diferente a la evaluada en este trabajo, en levaduras, microorganismos eucariotas igual que *T. gondii*, que le ofrecerían un ambiente citoplasmático de transcripción, traducción y maduración de las proteínas recombinantes más similar al original *in vivo*, permitiendo potencialmente que adquirieran su conformación natural (Prince y col., 1990; Meek y col., 2003; Burg y col., 1988; Makioka y Kobayashi, 1991). En el caso de P30, se propone clonar la región de aminoácidos correspondiente a las posiciones 47 a 180, la cual es el dominio estructural completo que contiene únicamente la región antigénica I.

-los inmunoensayos

> Con P22c ensayar:

a) ELISA doble sandwich o de inmunocaptura detectando IgA e IgM.

b) ELISA de avidez de IgG empleando un panel mayor de sueros para obtener parámetros poblacionales de eficiencia de la técnica.

> Con P30 ensayar:

a) ELISA doble sandwich o de inmunocaptura detectando IgA e IgM.

> Con P35B ensayar:

a) ELISA indirecto detectando IgG. Al emplear un Ag clonado en levaduras se podría obtener sensibilidades y especificidades mayores a 90 %.

b) ELISA doble sandwich o de inmunocaptura detectando IgA e IgM.

c) ELISA de avidéz de IgG empleando un panel mayor de sueros y así obtener parámetros poblacionales de eficiencia de la técnica.



Bibliografía

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. y Pillai, S. (2012) *Anticuerpos y antígenos*. En: *Inmunología celular y molecular*. (Ed.: Igea, J. M.) Elsevier, Barcelona, p.: 89 - 108.

Ajioka, J. W.; Fitzpatrick, J. M. y Reitter, C. P. (2001) *Ultrastructure of a Toxoplasma gondii tachyzoite*. Mol. Med. http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_01/S1462399401002204sup002.htm.

Altcheh, J.; Diaz, N. S.; Pepe, C. M.; Martin, V.; Nigro, M.; Freilija, H. y Angel, S. O. (2006) *Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 Toxoplasma gondii-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 56: 161–165.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990) *Basic local alignment search tool*. J. Mol. Biol. 215:403–410.

Alvarez, P.; Leguizamon, M. S.; Buscaglia, C. A.; Pitcovsky, T. A. y Campetella, O. (2001) *Multiple overlapping epitopes in the repetitive unit of the shed acute-phase antigen from Trypanosoma cruzi enhance its immunogenic properties*. Infect. Immun. 69: 7946-7949.

Ansari, H. R. y Raghava, G P. S. (2010). *Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence*. Imm. Res. 6: 6-10.

Araújo, P. R. B. y Ferreira, A. W. (2010) *High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from T. gondii ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis*. Rev. Inst. Med. Trop. 52: 63-68.

Aubert, D.; Maine G. T.; Villena, I.; Hunt, J. C.; Howard, L. Sheu, M.; Brojanac, S.; Chovan, L. E.; Nowlan, S. F y Pinon, J. M. (2000) *Recombinant antigens to detect Toxoplasma gondii-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay*. J. of Clin. Microbiol. 38: 1144-1150.

Babaie, J.; Miri, M.; Sadeghiani, G.; Zare, M.; Khalili, G. y Golkar, M. (2011) *Expression and Single-step Purification of GRA8 Antigen of Toxoplasma gondii in Escherichia coli* Avicenna J. Med. Biotech. 3: 67-77.

Babaie, J.; Zare, M.; Sadeghiani, G.; Lorgard-Dezfuli, M.; Aghighi, Z. y Golkar, M. (2009) *Bacterial production of dense granule antigen GRA8 of Toxoplasma gondii*. Iran Biomed. J. 3: 145-151.

Beaman, M.; McCabe, R. E.; Wong, S. Y. y Remington, J. S. (1997) *Toxoplasma gondii. En: Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas. Tomo II. 4ta ed.* (Eds: Mandel, G. L.; Bennett, J. E.; Dolin, R.). Medica Panamericana. Buenos Aires, p: 2754-2770.

Beghetto, E.; Buffolano, W.; Spadoni, A.; Del Pezzo, M., Di Cristina, M.; Minenkova, O.; Petersen, E., Felici, F. y Gargano N. (2003) *Use of an Immunoglobulin G Avidity Assay*

Based on Recombinant Antigens for Diagnosis of Primary Toxoplasma gondii Infection during Pregnancy J. of Clin. Microbiol. 41: 5414–5418.

Beghetto, E.; Spadoni, A.; Bruno, L.; Buffolano, W. y Gargano, N. (2006) *Chimeric Antigens of Toxoplasma gondii: Toward Standardization of Toxoplasmosis Serodiagnosis Using Recombinant Products*. J. of Clin. Microbio. 44: 2133–2140.

Béla, S. R.; Oliveira Silva, D. A.; Cunha-Júnior, J. P.; Pirovani, C. P.; Chaves-Borges, F. A. y de Carvalho, F. R. (2008) *Use of SAG2A recombinant Toxoplasma gondii surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 62: 245–254.

Belluzo, M. S.; Ribone; M. E.; Camussone, C.; Marcipar, I.; Lagier, C. (2011) *Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease*. 408: 86-86.

Bertolino, C.; Bouza M. F.; Calani, L.; Cantarutti, N.; Morales, A.; Alvarez, G. Durlach, R.; Kaufer, F., Carral, L. y Fernandez Miranda, L. V. (2011) *Consenso de Toxoplasmosis Congenita, Provincia del Neuquén. Dir. Gral de Atención Primaria de la Sub. de Salud de la Prov. de Neuquén y del Dep. de salud materno-infantil y del adolescente*.

Blythe, M. J. y Flower, D. R. (2005) *Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods*. Protein Sci. 14: 246-248.

Bojar, I. y Szymańska; J. (2010) *Environmental exposure of pregnant women to infection with toxoplasma gondii – state of the art*. Ann. Agric. Environ. Med. 17: 209–214.

Boothroyd, J. C., Hehl, A.; Knoll, L. J. y Manger, I. D. (1998) *The surface of Toxoplasma: more and less* Int. J. for Parasitol. 28: 3-9.

Borges, A. S. y de Castro Fiquereido, J. F. (2004) *Detection of anti-Toxoplasma gondii IgG, IgM and IgA immunoglobulins in the serum, cerebrospinal fluid and saliva of patients with acquired immunodeficiency síndrome and neurotoxoplasmosis*. Arg Neuro-Psiquiatric. 62: 1033-1037.

Bublil, E. M.; Freund, N. T.; Mayrose, I.; Penn, O.; Roitburd-Berman, A.; Rubinstein, N. D.; Pupko, T. y Gershoni, J. M. (2007) *Stepwise prediction of conformational discontinuous B-cell epitopes using the Mapitope algorithm*. Proteins. 68: 294-304.

Burg, J. L.; Perelman, D.; Kasper, L. H.; Ware, P. L. y Boothroyd, J. C. (1988) *Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 141: 3584–3591.

Burkowski, F. J. (2008) *Structural Bioinformatics: An Algorithmic Approach* Chapman y Hall, CRC Press, University of Waterloo, Canada.

Candolfi, E.; Pastor, R.; Huber, R.; Filisetti, D.; Villard O. (2007) *IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women*. *Diag. Microbio. and Inf. Dis.* 58: 83–88.

Caoili, S. E. (2010) *Benchmarking B-Cell Epitope Prediction for the Design of Peptide-Based Vaccines: Problems and Prospects*. *J. Biomed. Biotechnol.* 910524: 1-14.

Cardona, N.; de-la-Torre, A.; Siachoque, H.; Patarroyo, M. A. y Gomez-Marin, J. E (2009) *Toxoplasma gondii: P30 peptides recognition pattern in human toxoplasmosis* *Exp. Parasitol.* 123: 199–202.

Carey, K. L.; Donahue, C. G. y Ward, G. E. (2000) *Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of Toxoplasma gondii*. *Mol. and Bioch. Parasit.* 105:25-37.

Carruthers, V. B. (2006) *Proteolysis and Toxoplasma invasion*. *Int. J. for Parasitol.* 36: 595–600.

Cenci-goga, B. T.; Rossitto, P.V.; Sechi, P.; Mccrindle, C. M. E. y Cullor, J. S. (2011) *Toxoplasma in animals, food, and humans: an old parasite of new concern*. *Foodborne Pathogens and Disease.*8: 751-761.

Cesbron, J. Y.; Capron, A.; Ovlaque, G. y Santoro, F. (1985) *Use of a monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii major surface protein (P30)*. *J. of Immunol. Meth.* 83: 151-158.

Chang, H. T.; Pai, T. W.; Fan, T. C.; Su, B. H.; Wu, P. C.; Tang, C. Y.; Chang, C. T.; Liu, S. H. y Chang, M. D. (2006) *A reinforced emerging methodology for mapping unique peptide motifs in members of protein families*. *BMC. Bioinformatics* 7: 38-43.

Charlton, A. y Zachariou, M. (2008) *Immobilized metal ion affinity chromatography of histidine-tagged fusion proteins*. *Methods Mol. Biol.* 421: 137-150.

Chen, J.; Liu, H.; Yang, J. y Chou, K. C. (2007) *Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale*. *AminoAcids*, 33: 423-428.

Chen, X. Z.; Guo, K.; Chen, Y.; Liu, L. L.; Shen, J. L.; Jiao, Y. M.; Fang, Q. y Sun, X. (2012) *Recombinant expression and immunologic identification of bradyzoite-specific antigen BSR4 of Toxoplasma gondii*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 30: 170-173.

Ching, X. T.; Lau, Y. L.; Fong, M. Y. y Nissapatorn, V. (2012) *Evaluation of Toxoplasma gondii-recombinant dense granular protein (GRA2) for serodiagnosis by western blot*. *Parasitol Res.*

Christian, J.; Sigrist, A.; de Castro, E.; Cerutti, L.; Cuche, B. A.; Hulo, N.; Bridge, A.; Bougueleret, L. y Xenarios, I. (2013) *New and continuing developments at PROSITE Nucleic Acids Res.* 41: D344 - D347.

Contreras, M.; Sandoval, L.; Salinas, P.; Muñoz, P. y Vargas, S. (2000). *Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y Elisa avidéz de IgG en toxoplasmosis reciente y crónica.* Bol. chil. parasitol..55: 1-12.

Creighton, T. E. (1993) En: *Proteins, Structures and Molecular Properties* (Eds.: Freeman, W.H. y Co.) New York, p. 355 a 368.

Cunha-Junior, J. P.; Silva, D. A. O.; Silva, N. M.; Souza, M. A.; Souza, G. R. L.; Prudencio, C. R.; Pirovani, C. P.; Cascardo, J. C. M.; Barbosa, B. F.; Goulart, L. R. y Mineo J. R. (2010) *A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A Toxoplasma gondii tachyzoites, identified by phage display bioselection.* Immunobiol. 215: 26 - 37.

Danishuddin, M.; Chatrath, R. y Singh, R. (2011) *Insights of interaction between small and large subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from bread wheat (Triticum aestivum L.)* Bioinformation. 6: 144 - 148.

Davidson, H. W. y Watts, C. (1989) *Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes.* J.Cell Biol. 109: 85 - 92.

Davydov, Y. I. y Tonevitsky, A. G. (2009) *Prediction of Linear B-Cell Epitopes.* Mol. Biol. 1: 150–158.

Decoster, A.; Caron, A.; Darcy, F. y Capron, A. (1988) *IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis.* The Lancet. 332: 1104 - 1107.

Decoster, A.; Darcy, F.; Caron, A.; Vinatiert, D.; Houze de l'aulnoit, D.; Vittut, G.; Nielt, G.; Heyer, F.; Lecoliertt, B.; Delcroix, M.; Monniert, J. C.; Duhamelt, M y Capron, A. (1992). *Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection* Clin. exp. Immunol. 87: 310-315.

De Fuentes Corripio, I. (1999) *Desarrollo de técnicas de adn para el diagnóstico y caracterización de "Toxoplasma gondii": aplicación a estudios epidemiológicos.* <http://eprints.ucm.es/tesis/vet/ucm-t23305.pdf>.

Delair, E.; Latkany, P.; Gwendolyn Noble, A.; Rabiah, P.; McLeod, R.; Brézin, A. (2011). *Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis.* Ocul. Immunol. Inflamm. 19: 91–102.

Díaz, L.; Zambrano, B; Chacón, G.; Rocha, A. y Díaz S. (2010). *Toxoplasmosis y embarazo.* Rev. Obstet. Ginecol. Venez. 70: 190-205.

Dubey , J.P. (2004) *Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis.* Vet. Parasitol. 126: 57–72.

Dubey, J. P. (1996) *Toxoplasma gondii*. En: *Medical Microbiology, 4th ed.* (Eds: Baron, S.; Peake, R. C.; James, D. A.; Susman, M.; Kennedy, C. A.; Singleton, M. J. D. y Schuenke, S.). The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston. p: 84.

Durlach, R.; Kaufer, F.; Carral, L.; Freuler, C.; Ceriotto, M.; Rodriguez, M.; Freilij, H.; Altcheh, J.; Vazquez, L.; Corazza, R.; Dalla Fontana, M.; Arienti, H.; Sturba, E.; Gonzalez Ayala, S; Cecchini, E.; Salomon, C.; Nadal, M.; Gutierrez, N. y Guarnera, E. (2008) *Consenso argentino de toxoplasmosis congénita*. *Med.* 68: 75-87.

Durlach R, Kaufer F, Carral L, Hirt J. (2003) Toxoplasmic lymphadenitis-clinical and serologic profile. *Clin Microbiol Infect*; 9: 625-631.

El-Manzalawy, Y.; Dobbs, D. y Honavar, V. (2008) *Predicting linear B-cell epitopes using string kernels*. *J. Mol. Recognit.* 21: 243-255.

Elyasi, H.; Babaie, J.; Fricker-Hidalgo, H.; Brenier-Pinchart, M.-P.; Zare, M.; Sadeghiani, G.; Assmar, M.; Pelloux, H. y Golkar, M. (2010) *Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute Toxoplasma gondii infection during pregnancy*. *Clin. and Vac. Immunol.* 17: 1349–1355.

Emini, E. A.; Hughes, J. V.; Perlow, D. S. y Boger, J. (1985) *Induction of hepatitis A virus neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide*. *J. Virol.* 55: 836-839.

Eric, J.; Larsen, P.; Lund O. y Nielsen, M. (2006) *Improved method for predicting linear B-cell epitopes*. *Imm. Res.* 2: 1-7.

Eswar, N.; Marti-Renom, M. A.; Webb, B.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M.; Pieper, U. y Sali A. (2006) *Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER*. En: *Current Protocols in Bioinformatics* (Eds: Wiley, J) Supplement 15, 5.6.1- 15, 5.6.30.

Ferrandiz, J.; Mercier, C.; Wallon, M.; Picot, S.; Cesbron-Delauw, M. F. y Peyron, F. (2004) *Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of Toxoplasma gondii, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:1016–1021.

Foudrinier, F.; Villena, I.; Jaussaud, R.; Aubert, D.; Chemla, C.; Martinot, F. y Pinon; J. M. (2003) *Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis*. *J. Clin. Microbiol.* 41:1681–1686.

Gaberc-Porekar, V. y Menart, V. (2001) *Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography*. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 49: 335-360.

García, V.; Gonzales, V.; Caudana, P.; Vega, J.; Marcipar, I. y Gugliotta, L. (2013) *Synthesis of latex-antigen complexes from single and multiepitope*. Col. and Surf. B-biointer. 1: 384 - 391.

García, V.; Gonzales, V.; Vega, J.; Marcipar, I. y Gugliotta, L. (2012) *Synthesis and characterization of carboxyl and acetal latexes by emulsion polymerization. Application to the production of latex-protein complexes for detecting chagas disease* Lat. A. Ap. Resch.

Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D. y Bairoch A. (2005) *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; En: *The Proteomics Protocols Handbook* (Eds.: Walker, J. M.), Humana Press. pp. 571-607.

Gavira, J. A.; Godoy-Ruiz, R., Ibarra-Molero, B. y Sanchez-Ruiz, J. M. (2012) *Crystal Structure of Thioredoxin Mutant D13E in Hexagonal (p61) Space Group*. Prot. Data bank. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2h75>.

Giacò, L.; Amicosante, M; Fraziano, M.; Gherardini, P. F.; Ausiello, G.; Helmer-Citterich, M.; Colizzi, V. y Cabibbo, A. (2012) *B-Pred, a structure based B-cell epitopes prediction server*. Ad. and Appl. in Bioinf. and Chem. 5: 11-21.

Golkar, M.; Azadmanesh, K.; Khalili, G.; Khoshkholgh-Sima, B.; Babaie, J. y Mercier, C. (2008) *Serodiagnosis of recently acquired Toxoplasma gondii infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 61:31–9.

Golkar, M.; Rafati, S.; Abdel-Latif, M. S.; Brenier-Pincharta, M.-P.; Fricker-Hidalgo, H.; Simab, B., K. Babaieb, J. y Pellouxa, H.; Cesbron-Delauwa, M.-F. y Merciera, C. (2007) *The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute Toxoplasma infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women*. Diag. Microbio. and Inf.. Dis. 58: 419–426.

Gonzalez, V.; García, V.; Vega, J.; Marcipar, I.; Meira G. y Gugliotta, L. (2010) *Immunodiagnosis of chagas disease: synthesis of three latex–protein complexes containing different antigens of Trypanosoma cruzi*. Col. and Surf. B-biointer. 77: 12-17.

Graille, M.; Stura, E. A.; Bossus, M.; Muller, B. H.; Letourneur, O.; Battail-Poirot, N.; Sibai, G.; Gauthier, M.; Rolland, D.; Le Du, M.-H. y Ducancel, F. (2005) *Crystal Structure of the Complex between the Monomeric Form of Toxoplasma gondii Surface Antigen 1 (SAG1) and a Monoclonal Antibody that Mimics the Human Immune Response*. J. Mol. Biol. 354: 447–458.

Gras, L.; Gilbert, R. E.; Wallon, M.; Peyron, F. y Cortina-Borja, M. (2004). *Duration of the IgM response in women acquiring Toxoplasma gondii during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies*. Epidemiol. Infect. 132:541–548.

Guex, N. y Peitsch, M. C. (1997) *Swiss-model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. Electroph.* 18: 2714-2723.

He, Y.; Zhou, Y.; Wu, H.; Kou, Z.; Liu, S. y Jiang, S. (2004) *Mapping of Antigenic Sites on the Nucleocapsid Protein of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. J.Clin.Microbiol.*42: 5309-5314.

He, X. L.; Grigg, M. E.; Boothroyd, J. C.; Garcia, K. C. (2002) *Structure of the immunodominant surface antigen from the Toxoplasma gondii SRS superfamily. Nat. Struct. Biol.*9: 606-611.

Hedman, K.; Lappalainen, M.; Seppäiä, I. y Mäkelä, O. (1989) *Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. J. infect dis.* 159: 736-740.

Hill, D.; Coss, C.; Dubey, J. P.; Wroblewski, K.; Sautter, M.; Hosten, T.; Muñoz-Zanzi, C.; Mui, E.; Withers, S.; Boyer, K.; Hermes, G.; Coyne, J.; Jagdis, F.; Burnett, A.; McLeod, P.; Morton, H.; Robinson, D. y McLeod, R. (2011) *Identification of a sporozoite-specific antigen from Toxoplasma gondii. J. Parasitol.* 2: 328-337.

Hiszczyjska-Sawicka, E.; Kur, J.; Pietkiewicz, H.; Holec, L.; Gasior, A. y Myjak, P. (2005) *Efficient production of the Toxoplasma gondii GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. Acta Parasitol.* 50:249–254.

Hiszczyńska-Sawicka, E.; Brillowska-Dabrowska, S.; Dabrowski, H.; Pietkiewicz, P. Myjak y Kur, J. (2003). *High yield expression and single-step purification of Toxoplasma gondii SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in Escherichia coli. Protein. Expr. Purif.* 27:150–157.

Holec, L.; Gasior, A.; Brillowska-Dabrowska y Kur, J. (2008) *Toxoplasma gondii: enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. Exp. Parasitol.* 119: 1–6.

Holec, L.; Hiszczyńska-Sawicka, E.; Gasior, A.; Brillowska-Dabrowska, A.y Kur, J. (2007) *Use of MAG1 Recombinant Antigen for Diagnosis of Toxoplasma gondii Infection in Humans. Clin. and vac. immnol.* 14:220–225.

Holec-Gasior, L.; Drapala, D.; Lautenbach, D. y Kur, J. (2010) *Toxoplasma gondii: Usefulness of ROPI recombinant antigen in an immunoglobulin G avidity assay for diagnosis of acute toxoplasmosis in humans. Polish J. of Microbiol.* 59: 307-310.

Holec-Gasior, L.; Kur, J. y Hiszczyńska-Sawicka, E. (2009) *GRA2 and ROPI recombinant antigens as potential markers for detection of Toxoplasma gondiispecific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. Clin. Vaccine Immunol.* 16:510–514.

Hoof, R. W. W.; Vriend, G.; Sander, C. y Abola, E. E. (1996) *Errors in protein structures. Nat.* 381: 272-272.

Hruzik, A.; Asif, A. R. y Gro, U. (2011) *Identification of Toxoplasma gondii SUB1 Antigen as a Marker for Acute Infection by Use of an Innovative Evaluation Method*. J. of Clin. Microbio. 49: 2419–242.

Huang, J. y Honda, W. (2006) *CED: a conformational epitope database* BMC Immunol. 7: 7.

Huang, X.; Xuan, X.; Suzuki, H.; Sugimoto, C.; Nagasawa, H.; Fujisaki, K.; Mikami, T. y Igarashi, I. (2002) *Characterization of Toxoplasma gondii SAG2 Expressed in Insect Cells by Recombinant Baculovirus and Evaluation of Its Diagnostic Potential in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* Clin. and Diag. Lab. Immunol. 9: 1343–1347.

Hughes, H. P.; Hudson, L. y Fleck, D. G. (1986) *In vitro culture of Toxoplasma gondii in primary and established cell lines*. Int. J. Parasitol. 16: 317-322.

Humphrey, W.; Dalke, A. y Schulten, K. (1996) *VMD - Visual Molecular Dynamics*. J. Mol. Grap. 14: 33-38.

Hunter, S.; Apweiler, R.; Attwood, T. K.; Bairoch, A.; Bateman, A.; Binns, D.; Bork, P.; Das, U.; Daugherty, L.; Duquenne, L.; Finn, R. D.; Gough, J.; Haft, D.; Hulo, N.; Kahn, D.; Kelly, E.; Laugraud, A.; Letunic, I.; Lonsdale, D.; Lopez, R.; Madera, M.; Maslen, J.; McAnulla, C.; McDowall, J.; Mistry, J.; Mitchell, A.; Mulder, N.; Natale, D.; Orengo, C.; Quinn, A. F.; Selengut, J. D.; Sigrist, C. J.; Thimma, M.; Thomas, P. D.; Valentin, F.; Wilson, D.; Wu, C. H. y Yeats, C. (2009) *InterPro: the integrative protein signature database*. Nucleic Acids Res. 37: D211 - D215.

Huynh, M.-H.; Harper, J. M. y Carruthers, V. B. (2006) *Preparing for an invasion: charting the pathway of adhesion proteins to Toxoplasma micronemes*. Parasitol. Res. 98: 389–395.

Institute of Laboratory Animal Resources, Washington, d.C, U.S. National Academy (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals*. Press, 7th ed; 1996, p. 125.

Jacobs, D.; Vercammen, M. y Saman, E. (1999) *Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of Toxoplasma gondii for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6: 24–29.

Jalallou, N.; Bandehpour, M.; Khazan, H.; Haghighi, A. y Kazemi, B. (2012) *Evaluation of recombinant SAG1 protein for detection of Toxoplasma gondii specific immunoglobulin M by ELISA test* Iranian J. Parasitol. 7: 17-21.

Jalallou, N.; Bandehpour, M.; Khazan, H.; Haghighi, A. y Kazemi, B. (2010) *Recombinant SAG1 Antigen to Detect Toxoplasma gondii Specific Immunoglobulin G in Human Sera by ELISA Test* Iranian J. Parasitol. 5: 1-9.

Janin, J.; Wodak, S.; Levitt, M. y Maigret, B. (1978). *Conformation of amino acid side-chains in proteins*. J. M. Biol. 125: 357-363.

Jens, E.; Pontoppidan, L.; Ole, L. y Morten, N. (2006). *Improved method for predicting linear B-cell epitopes*. Imm. Res. 2 :1-7.

Jens, V. K.; Claus, L.; Ole, L. y Morten N. (2012) *Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking* Plos Comp. Biol. 8: 1-10.

Kaikkonen, L.; Lankinen, H.; Harjunpaa, I.; Hokynar, K.; Soderlund-Venermo, M.; Oker-Blom, C.; Hedman, L. y Hedman, K. (1999) *Acute-Phase-Specific Heptapeptide Epitope for Diagnosis of Parvovirus B19 Infection*. J. Clin. Microbiol. 37: 3952-3956.

Kato, M.; Claveria, F.G.; Maki, Y.; Sanda, K.; Tanaka, T.; Omata, Y.; Nagasaw, H. y Suzuki, N (2007) *Reactivity of Synthetic SAG1 (p30) Peptide Sequences with RH, S273 and Beverley Strain-Induced Anti- Toxoplasma gondii Antibodies*. Pathobiol. 74: 50–56.

Karplus, P. A. y Schulz, G. E. (1985) *Prediction of chain flexibility in proteins*. Naturwissenschaften. 72: 212-213.

Kaufer, F. y Carral L. (2012). *Toxoplasmosis*. <http://es.scribd.com/doc/102467136/0-Toxopla>.

Kim, S. K. y Boothroyd, J. C. (2005) *Stage-Specific Expression of Surface Antigens by Toxoplasma gondii as a Mechanism to Facilitate Parasite Persistence*. J. of Immunol. 174: 8038–8048.

Kolaskar, A. S. y Tongaonkar, P. C. (1990) *A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens*. Febs Lett. 276: 172-174.

Kong, J. T.; Grigg, M. E.; Uyetake, L.; Parmley, S. y Boothroyd, J. C. (2003) *Serotyping of Toxoplasma gondii infections in humans using synthetic peptides*. J. Infect. Dis. 187:1484–1495.

Kotresha D. y Noordin R. (2010) *Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis* APMIS. 118:529–542.

Kotresha, D.; Poonam, D.; Muhammad Hafiznur, Y.; Saadatnia, G.; Nurulhasanah, O.; Sabariah, O., Tan, S. Y.; Izzati Zahidah, A. K. y Rahmah, N. (2012) *Recombinant proteins from new constructs of SAG1 and GRA7 sequences and their usefulness to detect acute toxoplasmosis*. Tropical Biomedicine 29: 129–137.

Krieger, E.; Darden, T.; Nabuurs, S. B.; Finkelstein, A. y Vriend, G. (2004) *Making optimal use of empirical energy functions: force field parameterization in crystal space*. Prot. 57: 678–683.

Kumolosasi, E.; Bonhomme, A.; Beorchia, A.; Lapan, H.; Marx, C.; Foudrinier, F.; Pluot, M. y Pinon, J. M. (1994) *Subcellular localization and quantitative analysis of Toxoplasma*

gondii target antigens of specific immunoglobulins G, M, A, and E. *Microsc. Res. Tech.* 29:231-239.

Lau, Y. L. y Fong, M. Y. (2008) *Toxoplasma gondii: Serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast Pichia pastoris* *Exp. Parasitol.* 119: 373–378.

Lavallie, E. R.; Diblasio, E. A.; Kovacic, S.; Grant, K. L.; Schendel, P. F. y McCoy, J. M. (1993) *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm.* *BioTechnology* 11: 187–193.

Leaver-Fay, A.; Tyka, M.; Lewis, S. M.; Lange, O. F.; Thompson, J.; Jacak, R.; Kaufman, K.; Renfrew, P. D.; Smith, C. A.; Sheffler, W.; Davis, I. W.; Cooper, S.; Treuille, A.; Mandell, D. J.; Richter, F.; Ban, Y. E.; Fleishman, S. J.; Corn, J. E.; Kim, D. E.; Lyskov, S.; Berrondo, M.; Mentzer, S.; Popović, Z.; Havranek, J. J.; Karanicolas, J.; Das, R.; Meiler, J.; Kortemme, T.; Gray, J. J.; Kuhlman, B.; Baker, D. y Bradley, P. (2011) *ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules* *Meth. Enzymol.* 487: 545-574.

Lefevre-Pettazzoni, M.; Bissery, A.; Wallon, M.; Cozon, G.; Peyron, F. y Rabilloud, M. (2007). *Impact of spiramycin treatment and gestational age on maturation of Toxoplasma gondii immunoglobulin G avidity in pregnant women.* *Clin. Vaccine Immunol.* 14:239 –243.

Lefranc, M.-P.; Ehrenmann, F.; Ginestoux, C.; Duroux, P. y Giudicelli V. (2012) *Use of IMGT® databases and tools for antibody engineering and humanization.* En: *Antibody engineering* (Ed.: Chames, P.). Humana Press, Springer, New York, USA. p. 3-37.

Lekutisa, C.; Fergusonb, D. J.P.; Grigga, M. E.; Campsa, M. y Boothroyd, J. C. (2001) *Surface antigens of Toxoplasma gondii: variations on a theme.* *Int. J. Parasitol.* 31: 1285–1292.

Letunic, I.; Doerks, T. y Bork, P. (2012) *SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource* *Nucleic. Acids. Res.* 40: D302-D305.

Li, S.; Galvan, G.; Araujo, F. G.; Suzuki, Y.; Remington, J. S. y Parmley, S. (2000a) *Serodiagnosis of recently acquired Toxoplasma gondii infection using an Enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens.* *Clin. and Diag. Lab. Imm.* 7: 781-787.

Li, S.; Maine, G.; Suzuki, Y.; Araujo, F. G.; Galvan, G.; Remington, J. S. y Parmley, S. (2000b) *Serodiagnosis of recently acquired Toxoplasma gondii infection with a recombinant antigen.* *J. of Clin. Microbiol.* 38: 179-184.

Liu, L.; Liu, T.; Yu, Y.; Cai, Y.; Zhang, A.; Xu, X.; Luo, Q.; Hu, Y.; Song, W.; Lun, Z.; Lu, F.; Wang, Y. y Shen J. (2012) *rROP₂₁₈₆₋₅₃₃: a novel peptide antigen for detection of IgM antibodies against Toxoplasma gondii.* *Foodb. Path. and Dis.* 9: 7-12.

Lourenço, E. V.; Bernardes, E. S.; Silva, N. M.; Mineo, J. R.; Panunto-Castelo, A. y Roque-Barreira; M. C. (2006) *Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 8: 1244-1251.

Lovell, S.C.; Davis, I.W.; Arendall, W.B. III; de Bakker, P.I.W.; Word, J.M.; Prisant, M.G.; Richardson, J. S. y Richardson, D.C. (2002) *Structure validation by C alpha geometry: phi, psi and C beta deviation*. *Prot.: Struct., Func. & Gen.* **50**: 437-450.

Lu, B.; Wu, S.; Shi, Y.; Zhang, R.; Zou, L.; Gao, S.; Lin, M. y Zhou, Y. (2006) *Toxoplasma gondii: Expression pattern and detection of infection using full-length recombinant P35 antigen*. *Exp. Par.* 113: 83–90.

Lüthy, R.; Bowie, J. U. y Eisenberg, D. (1992) *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. *Nat.* 356 :83-85.

Macre, M. de S.; Pires, M; Meireles, L. R.; Angel, S. O. Andrade H. F. (2009) *Serology using rROP2 antigen in the diagnostic of toxoplasmosis in pregnant women*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 51: 283-288.

Makioka, A. y Kobayashi, A. (1991). *Expression of the major surface antigen (P30) gene of Toxoplasma gondii as an insoluble glutathione S-transferase fusion protein*. *J. Parasitol.* **40**: 344–351.

Maksimov, P.; Zerweck, J.; Maksimov, A; Hotop, A.; Grob, U.; Pleyer, U.; Spekker, K.; Däubener, W.; Werdermann, S.; Niederstrasser, O.; Petri, E.; Mertens, M., Ulrich, R. G., Conraths, F. J. y Scharesa, G. (2012) *Peptide Microarray Analysis of In Silico-Predicted Epitopes for Serological Diagnosis of Toxoplasma gondii Infection in Humans*. *Clin. and Vac. Immunol.* 17: 865–874.

Marder, G.; Ulon, S. N.; Bottinelli, O. R.; Meza, Z. D.; Lotero, D. A.; Ruiz, R. M. y Ramos, K. L. (2001) *Prevalencia de toxoplasmosis en barrios periféricos de la ciudad de Corriente* .<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/4-Veterinarias/V-043.pdf>.

Martin, V.; Arcavi, M.; Santillan, G.; Amendoeira, M. R.; De Souza Neves, E.; Griemberg, G.; Guarnera, E.; Garberi, J. C.; Angel; S. O. (1998) *Detection of human Toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant Toxoplasma gondii rop2 protein*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (5):627-631.

Mayrose, I.; Penn, O.; Erez, E.; Rubinstein, N. D.; Shlomi, T.; Tarnovitski Freund, N.; Bublil, E.; Rupin, E.; Sharan, R.; Gershoni, J. M., Martz, E. y Pupko, T (2007a) *Peptide epitope mapping from affinity-selected peptides*. *Bioinformatics* 23: 3244-3246.

Mayrose, I.; Shlomi, T.; Rubinstein, N. D.; Gershoni, J. M.; Ruppín, E.; Sharan, R. y Pupko, T. (2007b) *A graph-based algorithm for epitope mapping using combinatorial phage-display libraries*. *Nucleic Acid Research.* 35: 69-78.

Mccabe, R. E. y Remington, J. S. (1991) *Toxoplasma gondii*. En: Enfermedades Infecciosas: Principios y Prácticas. 3ra. Ed. (Eds.: Mandell, G. L.; Douglas, R. G. y Bennett, J. E.) Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, p. 2219-2232.

McSparron, H.; Blythe, M. J.; Zygouri, C.; Doytchinova, I. A. y Flower, D. R. (2003) *JenPep: A Novel Computational Information Resource for Immunobiology and Vaccinology*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 43: 1276-1287.

Meek, B.; Jan Diepersloot, R.; Van Gool, T.; Speijer, D. y Peek, R. (2003) *IgM recognition of recombinant Toxoplasma gondii antigens by sera of acutely or latently infected humans*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 45: 45-52.

Melo, F. y Feytmans, E. (1997) *Novel knowledge-based mean force potential at atomic level*. J. of Mol. Biol. 267: 207-222.

Metz, C. E. (1978) *Basic Principles of ROC Analysis*. Seminars in Nuclear Medicine. 8: 283-298.

Mineo, J. R. y Kasper, L. H. (1994) *Attachment of Toxoplasma gondii to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30)*. Exp. Parasitol. 79: 11-20.

Misura, K. M.; Chivian, D.; Rohl, C. A.; Kim, D. E. y Baker, D. (2006) *Physically realistic homology models built with ROSETTA can be more accurate than their templates*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 5361-5366.

Mohamed, R. M.; Aosai, F.; Chen, M.; Mun, H. S.; Norose, K.; Belal, U. S.; Piao, L. X. y Yano, A. (2003) *Induction of protective immunity by DNA vaccination with Toxoplasma gondii HSP70, HSP30 and SAG1 genes*. Vaccine. 21: 2852-2861.

Montoya, J. G.; Huffman, H. B. y Remington, J. G. (2004) *Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy*. J. Clin. Microbiol. 42: 4627-4631.

Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. (2004). *Toxoplasmosis*. Lancet. 363:1965-1976.

Morris, G. E. (2008) XXX. En: *Molecular biomethods handbook*. (Eds.: Humana Press) Springer Science+Business Media. New York, p. 619-630.

Moutsopoulos, N. M.; Routsias, J. G.; Vlachoyiannopoulos, P. G.; Tzioufas, A. G. y Moutsopoulos, H. M. (2000) *B-cell epitopes of intracellular autoantigens: myth and reality*. Mol. Med. 6: 141-151.

Munoz, M.; Liesenfeld, O. y Heimesaat, M. M. (2011). *Immunology of Toxoplasma gondii*. Immunol. Rev. 240: 269-285.

Muñiz Hernández, S. y Mondragón Flores, R. (2009) *Toxoplasma gondii, un patógeno asesino re-emergente*. REB 28: 52-58.

Murray, A.; Mercier, C.; Decoster, A.; Lecordier, L.; Capron, A. y Cesbron-Delauw, M. F. (1993) *Multiple B-cell epitopes in a recombinant GRA2 secreted antigen of Toxoplasma gondii*. Appl. Parasitol. 34: 235–244.

Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970). *A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins*. J. of Mol. Biol. 48: 443–453.

Nigro; M.; Gutierrez, A.; Hoffer, A. M.; Clemente, M.; Kaufer, F.; Carral, L; Martin, V.; Guarnera, E. A. y Angel, S. O. (2003) *Evaluation of Toxoplasma gondii recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47:609–613.

Osman, A. A.; Gunnel, T.; Dietl, A.; Uhlig, H. H.; Amin, M.; Fleckenstein, B.; Richter, T. y Mothes, T. (2000) *B cell epitopes of gliadin*. Clin. Exp. Immunol. 121: 248-254.

Pappas, G.; Roussos, N. y Falagas, M. E. (2009) *Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. Int. J. Parasitol. 39:1385–1394.

Patton, S.; Johnson, S. S. y Puckett, K. (1990) *Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in nine populations of dairy goats: compared titers using modified direct agglutination and indirect hemagglutination*. J Parasitol. 76: 74-77.

Parasuraman, S. (2012) *Protein data bank*. J. Pharmacol. Pharmacother. 4: 351-352.

Parker, J. M. R., Guo, D. y Hodges. R. S. (1986) *New Hydrophilicity Scale Derived from Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface High-Performance Liquid Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites*. A. Chem. Soc. 19: 5425-5432.

Parmley, S. F.; Sgarlato, G. D.; Mark, J.; Prince, J. B. y Remington J. S. (1992) *Expression, Characterization, and Serologic Reactivity of Recombinant Surface Antigen P22 of Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 30: 1127-1133.

Pellequer, J. L.; Westhof, E. y Regenmortel (1993) *Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins*. Immunol. Lett., 36: 83-87.

Peng, H.-J.; Chen, X.-G.; y Lindsay, D. S. (2011). *A review: competence, compromise, and concomitance—reaction of the host cell to toxoplasma gondii infection and development*. J. Parasitol. 97: 620–628.

Peng, J. y Jinbo, X. (2011). *RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference*. Prot. 79: 161-171.

Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004) *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis* J Comput Chem. 25: 1605-1612.

Pfrepper, K. I.; Enders, G.; Gohl, M.; Krczal, D.; Hlobil, H.; Wassenberg, D. y Soutschek (2005). *Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:977–982.

Pietkiewicz, H.; Hiszczyjska-Sawicka, E.; Kur, J.; Petersen, E.; Nielsen, H.V.; Stankiewicz, M.; Andrzejewska, I. y Myjak, P. (2004) *Usefulness of Toxoplasma gondii-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis*. J. Clin. Microbiol. 42:1779–1781.

Ponnuswamy, P. K.; Prabhakaran, M. y Manavalan. P. (1980). *Hydrophobic packing and spatial arrangement of amino acid residues in globular proteins*. Biochem. Biophys. Acta., 623: 301-316.

Ponomarenko, J.; Bui, H.-H.; Li, W.; Fusseder, N.; Bourne, P.; Sette, A. y Peters, B. (2008) *Ellipro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes* BMC Bioinformatics. 9: 514-518.

Porstmann, T. y Kiessig, S. T. (1992) *Enzyme immunoassay techniques. An overview*. J. Immunol. Methods 150: 5-21.

Prince, J. B.; Auer, K. L.; Huskinson, J.; Parmley, S. F.; Araujo, F. G y Remington, J. S. (1990) *Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from Toxoplasma gondii* Mol. and Biochem. Parasitol. 43: 97-106.

Punta, M.; Coghill, P. C.; Eberhardt, R. Y.; Mistry, J.; Tate, J.; Boursnell, C., Pang, N.; Forslund, K. Ceric, G. Clements, J. Heger, A., Holm, L.; Sonnhammer, E. L. L.; Eddy, S. R.; Bateman, A. y Finn, R. D. (2012) *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Research Database. 40: D290-D301.

Reimer, U. (2009) *Epitope Mapping Protocols* En: Methods in Molecular Biology (Eds.: Reineke, U. y Schutkowski, M.) Humana Press, Springer Science + Business Media: Berlin, pp. 335-346.

Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C. y Sasisekharan, V. (1963). *Stereochemistry of polypeptide chain configurations*. J. Mol. Biol. 7: 95–99.

Remington, J. S.; Thulliez, P. y Montoya, J. G. (2004) *Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis*. J Clin Microbiol. 42: 941-945.

Remington, J. S.; McLeod, R.; Thulliez, P. y Desmonts, G. (2001) *Toxoplasmosis*. En Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 5th (Eds: Remington, J. S. y Klein, J.) WB Saunders, Philadelphia, PA. p 205–346.

Robert-Gangneux, F.; Commerce, V.; Tourte-Schaefer, C. y Dupouy-Camet, J. (1999). *Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-Toxoplasma*

antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18:648–654.

Robert-Gangneux, F. y Dardé, M.-L. (2012) *Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis.* Clin. Microbiol. Rev. 25: 264-296.

Robinson, S. A.; Smith, J. E. y Millner, P. A. (2004) *Toxoplasma gondii major surface antigen (SAG1): in vitro analysis of host cell binding.* Parasitol. 128: 391-396.

Rubinstein, N. D.; Mayrose, I.; Halperin, D.; Yekutielle, D.; Gershoni, J. M. y Pupko, T. (2008) *Computational characterization of B-cell epitopes.* Molecular Immunol. 45: 3477–3489.

Rubinstein, N. D.; Mayrose, I., Martz, E. y Pupko, T. (2009a) *Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes.* BMC Bioinformatics 287: 1-6.

Rubinstein, N. D.; Mayrose, I. y Pupko, T. (2009b) *A machine-learning approach for predicting B-cell epitopes.* Molecular Immunol. 46: 840–847.

Sabin, A. B. y Feldman, H. A. (1948) *Dyes as microchemical indicator of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma).* Science. 108: 660-663.

Saha, S.; Bhasin, M. y Raghava, G. P. (2005). *Bcipep: A database of B-cell epitopes.* BMC. Genomics., 6: 79.

Saha, S. y Raghava, G. P. S. (2004) *BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties.* En: *Artificial Immune Systems* (Eds.: Nicosia, G.; Cutello, V.; Bentley, P. J. y Timis, J.) Springer, p.: 197-204.

Saha, S. y Raghava, G.P.S. (2006) *Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network.* Prot. 1: 40-48.

Sali, A. y Blundell, T. L. (1993) *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.* J. Mol. Biol. 234:779-815.

Santoro, F.; Afchain, D; Pierce, R; Cesbron, J. Y; Ovlaque, G. y Capron, A. (1985) *Serodiagnosis of toxoplasma infection using a purified parasite protein (P30).* Clin. exp. Immunol. 62: 262-269.

Selseleh, M.; Keshavarz, H.; Mohebbali, M.; Shojaee, S.; Modarressi, M. H.; Eshragian, M. R. y Selseleh, M. (2012a) *Production and evaluation of Toxoplasma gondii recombinant surface antigen 1 (SAG1) for serodiagnosis of acute and chronic toxoplasma infection in human sera.* Iranian J. Parasitol. 7: 1-9.

Selseleh, M.; Keshavarz, H.; Mohebbali, M.; Shojaee, S.; Selseleh, M.; Eshragian, M. R.; Mansouri, F. y Modarress, M. H. (2012b) *Production and evaluation of Toxoplasma gondii recombinant GRA7 for serodiagnosis of human infections.* Korean J Parasitol 50: 233-238.

Sharma, O. P.; Das, A. A.; Krishna, R.; Suresh Kumar, M. y Mathur P. P. (2012) *Structural Epitope Database (SEDB): A Web-based Database for the Epitope, and its*

Intermolecular Interaction Along with the Tertiary Structure Information. J. Proteomics Bioinform. 5: 84-89.

Siachoque, H; Guzman, F.; Burgos, J.; Elkin Patarroyo, M. y Gomez Marin, J. E. (2006) *Toxoplasma gondii: Immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model* Exp. Parasitol. 114: 62–65.

Silva, N. M.; Tafuri, W. L.; Alvarez-Leite, J. I.; Mineo, J. R. y Gazzinelli, R. T (2002) *Toxoplasma gondii: in vivo expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNF p55 receptor and inducible nitric oxide synthase functions*. Microbes. Infect. 4: 261-270.

Smith, T. F. y Waterman, M. S. (1981). *Identification of Common Molecular Subsequences*. J. of Mol. Biol. 147: 195–197.

Sobolev, B. N.; Olenina, L. V.; Kolesarova, E. F.; Poroikov, V. V. y Archakov, A. I. (2005) *Computer design of vaccines: approaches, software tools and informational resources*. Cur. Comp. - Aid. Drug Des. 1: 207-222.

Sollner, J. y Mayer, B. (2006) *Machine learning approaches for prediction of linear B-cell epitopes on proteins*. J. Mol. Recognit. 19: 200-208.

Sørensen, H. P. y Mortensen, K. K. (2005) *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli* J. of Biotechnol. 115: 113–128.

Spessott, W. A. (2004) *Desarrollo de un ensayo Dot Blot para la detección de anticuerpos tipo IgG anti Toxoplasma gondii*. En: *Optimización del diagnóstico para la prevención de la transmisión feto-materna de toxoplasmosis*. (dir.: Marcipar, I. S. y Dalla Fontana, M. L.) Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, p.: 36-45.

Sun, J.; Xu, T.; Wang, S.; Li, G.; Wu, D y Cao, Z. (2011) *Does difference exist between epitope and non-epitope residues? Analysis of the physicochemical and structural properties on conformational epitopes from B-cell protein antigens* Immunome Res. 3:1.

Suzuki, Y.; Ramirez, R.; Press, C.; Li, S.; Parmley, S.; Thulliez, P. y Remington, J. S. (2000) *Detection of Immunoglobulin M Antibodies to P35 Antigen of Toxoplasma gondii for Serodiagnosis of Recently Acquired Infection in Pregnant Women* J. of Clin. Microbiol. 38: 3967–3970.

Sweredoski, M. J. y Baldi, P. (2008) *PEPITO: Improved Discontinuous B-Cell Epitope Prediction Using Multiple Distance Thresholds and Half-Sphere Exposure*. Bioinformatics 12: 1459-1460.

Sweredoski, M. J. y Baldi, P. (2009) *COBEpro: a novel system for predicting continuous Bcell epitopes*. Protein Eng. Des. Sel. 22: 113-120.

Tape, T. G (2013) *The area under an ROC curve*. University of Nebraska Medical Center <http://gim.unmc.edu/dxtests/ROC3.htm>.

Terpe, K. (2006) *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 211–222.

Tomar, N. y De, R. K. (2010) *Immunoinformatics: an integrated scenario*. Immunol. 131: 153-168.

Tomavo, S.; Schwarz, R. T. y Dubremetz, J. F. (1989) *Evidence for glycosylphosphatidyl-inositol anchoring of Toxoplasma gondii major surface antigens*. Mol. Cell. Biol. 9:4576-4580.

Tosatto, S. C. E.; Bindewald, E.; Hesser, J. y Männer, R.. (2002) *A Divide and Conquer Approach to Fast Loop Modeling*. Prot. Eng.; 15: 279-286.

Valiente Gabioud, A. A.; Veaute, C.; Perrig, M.; Galan Romano, F.; Sferco, S. J. y Marcipar, I. S. (2011) *Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of Trypanosoma cruzi FRA protein*. Exp. Parasitol. 127: 672 - 679.

Vallejo, L. F y Rinas, U. (2004) *Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins* Microb. Cell Fact. 3: 11.

Van Gelder, P.; Bosman, F.; De Meuter, F.; Van Heuverswyn, H. y Herion, P. (1993). *Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in Escherichia coli* J. of Clin. Microbiol. 31: 9-15.

Velge- Roussel, F.; Chardes, T.; Mevelec, P.; Brillard, M.; Hoebeke, J. y Bout, D. (1994) *Epitopic analysis of the Toxoplasma gondii major surface antigen SAG1*. Mol. Biochem. Parasitol. 66: 31-38.

Venselaar, H.; Joosten, R. P.; Vroling, B.; Baakman, C. A. B.; Hekkelman, M. L.; Krieger, E y Vriend, G. (2010) *Homology modelling and spectroscopy, a never-ending love story* Eur. Biophys. J. 39: 551–563.

Villena, I.; Aubert, D.; Brodard, V.; Quereux, C.; Leroux, B.; Dupouy, D.; Remy, G.; Foudrinier, F.; Chemla, C.; Gomez-Marin, J. E. y Pinon, J. M. (1999) *Detection of specific immunoglobulin E during maternal, fetal y congenital toxoplasmosis*. J. of Clin. and Micribiol. 37: 3487-3490.

Villena, I.; Aubert, D.; Leroux, B.; Dupouy, D.; Talmud, M.; Chemla, C.; Trenque, T.; Schmit, G.; Quereux, C.; Guenounou, M.; Pluot, M.; Bonhomme, A. y Pinon, J. M. (1998) *Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group*. Scand. J. Infect. Dis. 30: 295-300.

Vita, R.; Peters, B. y Sette, A (2008) *The curation guidelines of the immune epitope database and analysis resource*. Cytometry A.73: 1066-1070.

Wang, H. W.; Lin, Y. C.; Pai, T. W. y Chang, H. T. (2011) *Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification*. J. Biomed. Biotechnol. 2011: 432830.

Wang, Y.; Wang, G.; Zhang, D. Yin, H. y Wang, M. (2013) *Screening and identification of novel B cell epitopes of Toxoplasma gondii SAG1*. Parasites y Vectors. 6:125.

Wiederstein, M. y Sippl, M. J. (2007) *ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. Nucl. Acids Res. 35: W407-W410.

Woodsmall, R. M. y Benson, D. A. (1993) *Information resources at the National Center for Biotechnology Information*. Bull. Med. Libr. Assoc. 3: 282-288.

Wu, K.; Chen, X. G.; Li, H.; Yana, H.; Yang, P. L.; Lun, Z. R.; Zhu, X. Q. (2009) *Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen of Toxoplasma gondii*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64:261–266.

Yang, Y.; Faraggi, E.; Zhao, H. y Zhou, Y. (2011) *Improving protein fold recognition and template-based modeling by employing probabilistic-based matching between predicted one-dimensional structural properties of the query and corresponding native properties of templates*. Bioinformatics 27: 2076-2082.

Yang, Zhang. (2008) *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. BMC Bioinformatics. 9: 40.

Yu, K. y Zhang, T. (2013) *Construction of Customized Sub-Databases from NCBI-nr Database for Rapid Annotation of Huge Metagenomic Datasets Using a Combined BLAST and MEGAN Approach*. PLoS One.;8: 4.

Zhang, Y. (2008) *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. BMC Bioinf., vol 9: 40-48.