



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Master Titulado:

“Expresión de una proteína recombinante de *Toxoplasma gondii* (SAG1) mediante un sistema procarionota”

Realizado por:

YADIRA MARIBEL CÁCERES MACHADO

Directora del proyecto:

Dra. Marbel Torres Arias. PhD.

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 13 de marzo de 2023

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, YADIRA MARIBEL CÁCERES MACHADO, con cédula de CIUDADANÍA # 180356906-8, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual que correspondan relacionados a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Firmado electrónicamente por:
**YADIRA MARIBEL
CACERES MACHADO**

FIRMA Y CÉDULA

YADIRA MARIBEL CÁCERES MACHADO1803569068

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“Expresión de una proteína recombinante de *Toxoplasma gondii* (Sag1) mediante un sistema procariota”

Realizado por:

YADIRA MARIBEL CÁCERES MACHADO

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por:

MARBEL TORRES ARIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



Firmado electrónicamente por:
**YADIRA MARIBEL
CACERES MACHADO**

FIRMA

YADIRA MARIBEL CACERES

FIRMA

MARBEL TORRES ARIAS

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSE RUBEN RAMIREZ

LINO ARISQUETA HERRANZ

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral

ante el tribunal examinador



FIRMA

JOSE RUBEN RAMIREZ



FIRMA

LINO ARISQUETA HERRANZ

Quito, 13 de marzo de 2023

DEDICATORIA

Dedicado a todas las personas que fueron parte de esta importante etapa.

AGRADECIMIENTO

A mis padres Teresa y Edwin por su apoyo incondicional, a mi tutora Dra. Marbel por su guía profesional, paciencia y aliento para no rendirme.

Artículo de tesis

Expresión de una proteína recombinante de toxoplasma gondii (SAG1) mediante un sistema procariota

Yadira Cáceres Machado, Marbel Torres Arias^{1,2,*}

1 Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Maestría en Biomedicina.

2 Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura, Laboratorio de Inmunología y Virología; Centro de Investigación de Nanociencia y Nanotecnología.

* Autor de Correspondencia: marbel.torres@uisek.edu.ec;

Resumen El *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular, agente causal de la toxoplasmosis que es una enfermedad generalmente asintomática que ataca principalmente a inmunodeprimidos y mujeres embarazadas provocando graves consecuencias, este parásito contiene 5 proteínas principales, de las cuales, el antígeno de superficie 1 (SAG 1) constituye hasta el 5% del total de la proteína del *T. gondii*, y la mayoría de anticuerpos se reactivan contra SAG 1, por tanto es la proteína más inmunogénica, por lo cual, es un candidato idóneo de investigación para el desarrollo diagnóstico y preventivo, por lo tanto, se justifica la producción, purificación e identificación de la proteína recombinante SAG1, realizada después de la transfección genética de un plásmido en bacterias *Escherichia coli*. Finalmente, se obtuvo la presencia de la proteína recombinante SAG1 mediante western blot, proteína que podrá ser utilizada en un futuro para el diagnóstico o control mediante pruebas como ELISA o pruebas de inmunocromatografía.

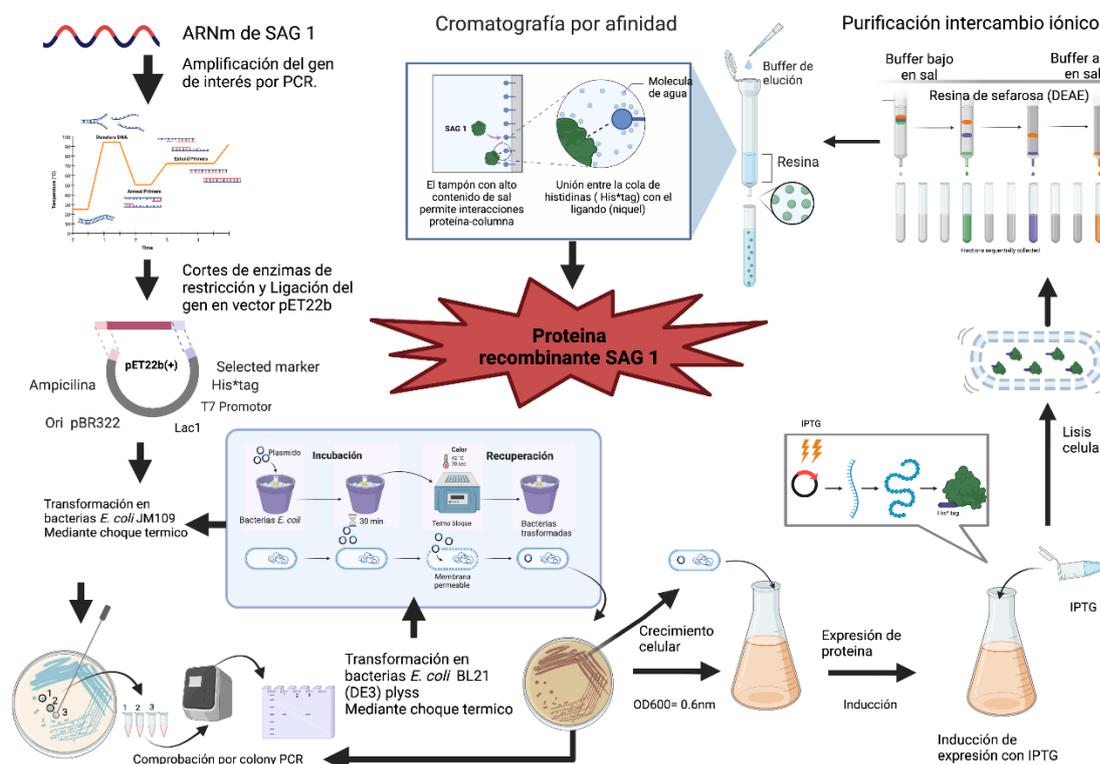
Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis. proteínas recombinantes, SAG1, clonación

Abstract:

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite, causative agent of toxoplasmosis which is a generally asymptomatic disease that mainly attacks immunocompromised and pregnant women causing severe consequences. This parasite contains 5 major proteins, of which surface antigen 1 (SAG 1) constitutes up to 5 % of the total *T. gondii*, and most antibodies are reactivated against SAG1, making it the most immunogenic protein and therefore a suitable research candidate for diagnostic and preventive development. Therefore, the production, purification and identification of the recombinant SAG1 protein, performed after genetic transfection of a plasmid in *Escherichia coli* bacteria, is justified. Finally, the presence of the recombinant SAG1 protein was obtained by western blot, a protein that could be used in the future for diagnosis or control by ELISA or immunochromatography tests.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, recombinant proteins, SAG1, cloning.

Obtención de la proteína recombinante SAG 1 .



1. Introducción

La toxoplasmosis es la enfermedad zoonótica más común a nivel mundial, sin embargo, la mayoría de personas infectadas no presentan síntomas. El agente causal de esta enfermedad es el parásito *Toxoplasma Gondii* que es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (cerebro) y hematorreteniana (ojo) e incluso puede atravesar la barrera placentaria (Galván, 2014), razones que justifican la necesidad de profundizar en el estudio de este parásito y su forma de diagnóstico (Correa et al., 2021). El *T. gondii* fue descubierto por primera vez en 1908 por Charles Nicolle y Manceaux en un roedor y desde ese año se ha descrito su infección en varios animales incluido el ser humano. En 1948 Albert Sabin y Harry Feldman publican acerca del “dye test”, prueba que permitió analizar las muestras de suero humano, en busca del parásito. (Innes, 2008).

La toxoplasmosis causa un impacto socioeconómico, especialmente en el cuidado de niños con ceguera o retraso mental, sin contar con el sufrimiento humano. Este parásito puede afectar a mujeres embarazadas y dar complicaciones a personas inmunodeprimidas, lo que lo convierte en un problema de salud pública a nivel global (Montoya & Remington, 2008). Se calcula que del 20 al 30 % del mundo presenta positividad para *Toxoplasma gondii* (Werner Apt, 2014). En Chile se reporta que un 40 % de la población presenta el parásito, y 1 de cada 1000 niños adquieren un caso congénito, esto difiere dependiendo de las costumbres alimenticias, economía y el factor social de cada país. Por ejemplo, la prevalencia en Estados Unidos es del 23 %, en Colombia del 60 % y en Brasil el 82 % (Rosso et al., 2007).

En Ecuador, se conoce que somos una población propensa a zoonosis, la toxoplasmosis empieza de 4 a 5 años, siendo la región litoral la zona con mayor prevalencia hasta los 20 años de edad (Sánchez et al., 2020a). Sin embargo, a nivel nacional, no se han realizado estudios serios para determinar la incidencia de infección por *T. gondii* en ningún nivel de población, a excepción de contadas revisiones sobre la enfermedad (Bravo-Yáñez & Latorre-Barragán, 2020). Se han realizado estudios en diferentes lugares como

Riobamba que, de 403 mujeres en edad fértil, el 26.8 % tuvo presencia de IgG anti *T. gondii*, relacionado con los malos hábitos higiénicos y convivencia con animales de corral y mascotas (Sánchez et al., 2020b). En otro estudio realizado en Quito, de una muestra de cien mujeres el 60 % tuvo contacto con el parásito previo a su embarazo (Pacheco & Fernández, 2019), en 2019 el INEC reportó egresos de 66 personas con *T. gondii*. Con este antecedente y con el fin de implementar estrategias de control, se realizan exhaustivos estudios en las proteínas que conforman el *T. gondii*, mismas que influyen en la inmunidad de los humanos.

Para la optimización del diagnóstico es importante contar con pruebas como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), ante lo cual, el Ecuador importa kits comerciales, lo que provoca el aumento del costo de los exámenes para embarazadas. La falta de pruebas de diagnóstico fabricadas en el Ecuador, limita el tamizaje de toxoplasmosis congénita, optando por las pruebas rápidas que contienen una sensibilidad entre 90 y 95 % (Advin, 2021; Biotech Inc, 2019), en comparación con los ELISA que alcanzan entre el 95 a 100 % de sensibilidad (Murata et al., 2020; Ratio Diagnostics, 2018).

La fácil transmisión por la contaminación de comida, agua o contacto directo con las heces de los felinos infectados, así como consumo de quistes tisulares en carne mal cocida, hace necesario proveer de una rápida solución para detectar y combatir este parásito (Elmore et al., 2010).

El 90 % de los casos de toxoplasmosis son asintomáticos, el 10 % restante presenta enfermedades descritas en la tabla 1. Entre las manifestaciones clínicas están el agrandamiento de ganglios no supurados y la presencia de hiperplasia de células reticulares, principalmente en folículos germinativos (Restrepo, 2007). En algunos casos se puede presentar un cuadro agudo con sintomatología variable que desencadenaría en un cuadro crónico seguido de una fase latente de toxoplasmosis. Para tratar la toxoplasmosis en el embarazo se recomienda la espiramicina en los primeros tres meses con el fin de prevenir el contagio materno fetal, sin embargo, cuando la enfermedad se haya transmitido al feto se debe tratar con primetamina (antiparasitario) + sulfadiazina y ácido fólico, la duración del tratamiento en la madre va a depender de la infección del feto en donde se puede extender hasta el nacimiento y continuar con el neonato si aun presenta la enfermedad (Espinoza et al., 2022; Hotop et al., 2012). En pacientes inmunodeprimidos se utiliza primetamina + sulfadiazina y leucovorina (protege de la toxicidad hematológica de la primetamina) (Coto et al., 2021).

Tabla 1. Formas clínicas de la toxoplasmosis

Enfermedad	Descripción	Referencia
Toxoplasmosis aguda febril	El parásito llega a los ganglios linfáticos regionales donde produce una linfadenitis epitroclear y axilar.	Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003)
Linfadenopatía toxoplasmósica	Presenta un aumento de nódulos linfáticos durante semanas o meses.	
Toxoplasma congénito	Las mujeres embarazadas que presentan una forma aguda o tienen una reactivación del <i>T. gondii</i> , pueden transmitirlo por vía transplacentaria, atacando al feto.	(Jones et al., 2003)
Toxoplasmosis en inmunodeprimidos	Principalmente el parásito alcanza el sistema nervioso central provocando una encefalitis.	
Toxoplasmosis neonatal	Entre los hallazgos más importantes se encuentra la hidrocefalia interna, convulsiones, calcificaciones cerebrales y retardo psicomotor.	
Toxoplasmosis ocular	Se presenta como retinocoroiditis y uveítis. Las lesiones oculares se presentan por la ruptura de un quiste y las sustancias antigénicas para combatir la infección.	(Frenkel & Ruiz, 1973)

Las fases de la enfermedad van a depender de la forma clínica que se presente, sin embargo, la que tiene más repercusiones en el ser humano es la toxoplasmosis congénita. La infección aguda puede durar alrededor de 4 meses, sin embargo, los anticuerpos anti toxoplasma se forman entre los 7 a 14 días y la respuesta mediada por las células se presentan de 14 a 30 días. La infección crónica puede durar hasta 12 meses seguida de una posible fase latente (Galván-Ramírez & Mondragón-Flores, 2017).

El diagnóstico de toxoplasmosis es imprescindible para un tratamiento rápido y oportuno de la enfermedad sobre todo en mujeres embarazadas o inmunodeprimidos.

Es así que existen técnicas denominadas métodos indirectos y directos, en el primer caso se detectan anticuerpos generados por la infección, para el segundo caso se detecta la presencia del agente infeccioso como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas de diagnóstico para detección de la toxoplasmosis

	Pruebas	Proteínas de uso	Descripción	Referencia
Screening	Pruebas de inmunocromatográfica	SAG 2, SAG3, GRA7	Es una prueba de oro coloidal, es rápida, económica, pequeña, de fácil almacenamiento y no requiere de mucha tecnología.	(Yang et al., 2022)
Pruebas confirmatorias	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	Usan antígenos nativos obtenidos de taquizoítos cultivados.	La técnica más sensible y específica consta de un antígeno o anticuerpo en fase sólida y un antígeno o anticuerpo marcado por una enzima que genera una reacción de óxido-reducción que junto al sustrato se precipita formando un producto colorido cuantificable.	(Liyanage et al., 2021; Ybañez et al., 2020)
	Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	Proteínas recombinantes SAG1, GRA1, GRA 7	Se basa en la interacción antígeno-anticuerpo, donde se fijan los taquizoítos a un portaobjetos, se superpone el suero del paciente y detecta la interacción con anticuerpos conjugados a moléculas fluorescentes.	
	Transferencia western (WB)	Distintas combinaciones	Se produce con la interacción del suero con el antígeno de <i>T. gondii</i> previamente transferido a una membrana desde un gel de poliacrilamida.	
	Prueba de avidéz	MIC 3	Los valores del test de avidéz son bajos y aumentan dependiendo de la duración de la enfermedad.	(Montoya, 2002)
Pruebas de seguimiento	Diagnóstico molecular mediante PCR	El gen rep contiene más de 300 copias en el genoma El gen b1 de SAG1	Genera replicaciones de una secuencia específica de ADN. Los genes utilizados para detección de toxoplasma son: gen B1 y región repetitiva REP	(Brenier-Pinchart et al., 2021; Döşkaya et al., 2019; Montoya, 2002; Wang & Yin, 2014a)
Pruebas infecciones graves o potencialmente peligrosas	Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica		Permite localizar antígenos de toxoplasma en células cultivadas mediante anticuerpos específicos marcados y un anticuerpo secundario que posee una peroxidasa o fosfatasa unida.	(Montoya, 2002)
	Histología	Usan antígenos nativos obtenidos de taquizoítos cultivados.	En tejido o en frotis de líquido corporal se detectan taquizoítos o quistes en ganglio linfático con tinción de wright, hematoxilina & eosina.	(Montoya, 2002; Stansfeld, 1961)
	Cultivo celular		Permite conocer la viabilidad del protozoario, principalmente en lactantes. Para el toxoplasma se usan las líneas celulares de células vero de mono verde de áfrica y fibroblastos humanos (HFF).	(Montoya, 2002)

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado, que pertenece al reino protozoario, ubicado en la phylum Apicomplexa, clase Esporozoa, familia Sarcocystidae (Levine, 1977). El *T. gondii* es reportado aproximadamente en 200 especies de mamíferos y aves (Galván, 2014); siendo los felinos los principales hospederos debido a que son los únicos animales que eliminan oocistos en sus heces (Elmore et al., 2010). *T. gondii* posee tres formas parasitarias: quiste, bradizoito y taquizoito, siendo este último el que infecta al ser humano, la superficie del taquizoito tiene 5 proteínas principales, la que se encuentra en mayor proporción es la denominada SAGs ("surface antigens"), antígenos de superficie anclados por glicosilfosfatidilinositol (GPI), antígenos de *T. gondii* más inmunogénicos y que se encuentran en mayor cantidad (Couvreur et al., 1988; Johnson et al., 1983; Suzuki et al., 1996), por esta razón se ha elegido el antígeno de superficie 1 (SAG1) con el fin de ser utilizado para futuras pruebas diagnósticas u otras investigaciones.

Tabla 3. Proteínas recombinantes de *T. gondii*, su purificación y aplicación

Proteína	Plásmido	Enzimas de restricción	Transformación	Purificación	Aplicación	Referencia
Antígenos de superficie						
SAG 1	pET32a	Enzimas de restricción	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Columna de agarosa Ni ²⁺ -NTA (QIAGEN)	ELISA. inmunotransferencia.	(Jalallou et al., 2012)
SAG2 (p22)	pPROExHT-b	BamHI HindIII	<i>E. coli</i> DH5α	Columna de agarosa Ni ²⁺ -NTA (QIAGEN)	Immunofluorescencia ELISA. inmunotransferencia.	(Singh et al., 2015)
SAG3 (P43)	pcDNA3	BamHI HindIII	<i>E. coli</i> TOP10	No especifica	Inmunización vacunación	(Sudan et al., 2019)
Antígenos de gránulos densos						
GRA1(P24)	pET30	<i>SacI</i> <i>EcoRV</i>	<i>E. coli</i> strain Rosetta (DE3)pLysS	Ni ²⁺ - ácido iminodiacético -Sepharose (Novagen).	ELISA. inmunotransferencia.	(Tomasz Ferra et al., 2019)
GRA4	pET-SUMO TAR	Enzimas de restricción	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Columna de agarosa Ni ²⁺ -NTA (QIAGEN)	inmunotransferencia Vacunación	(Hanafiah et al., 2020)
GRA5	pUET 1	BglII HindIII	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Ni ²⁺ - ácido iminodiacético -Sepharose (Novagen).	ELISA. inmunotransferencia.	(Holec-Gasior & Kur, 2010)
GRA6						
GRA8	pET-21a	NdeI AgeI	<i>E. coli</i> strain Rosetta (DE3)	Anti-DYKDDDDK G1 affinity resin (GenScript, USA)	ELISA. inmunotransferencia.	(Jirapattharasate et al., 2021)
GRA14	pET-28a	Hind III EcoRI	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Columna de agarosa Ni ²⁺ -NTA (QIAGEN)	inmunotransferencia. Inmunización	(Pagheh et al., 2019)
Antígenos Roptri						
ROP1(P66)	pET28b	BamHI XhoI	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Columna de agarosa Ni ²⁺ -NTA (QIAGEN)	Recombinación Inmunotransferencia Dot blot	(Javadi Mamaghani et al., 2020)
ROP2 (P54)	pQE31	Bam HI Hin dIII.	<i>E. coli</i> M15	Columna de agarosa Ni ²⁺ -NTA (QIAGEN)	ELISA. inmunotransferencia. Inmunización.	(Martin et al., 1998)
ROP4	pHis	BamHI HindIII	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Columna Ni ²⁺ - His-Bind (Novagen)	ELISA. inmunotransferencia. Inmunización.	(Dziadek et al., 2009)

Antígenos micronemas						
MIC1	pUET1	BglII EcoRV	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Ni ²⁺ unido a ácido iminodiacético- agarosa. (Novagen)	ELISA Inmunotransferencia	(Holec et al., 2008)
MIC3	pGEX-KG		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		ELISA Inmunotransferencia LAT (aglutinación por látex)	(Jiang et al., 2008)
Antígeno de membrana apical 1 (AMA1), una proteína localizada en orgánulos secretores específicos (micronemas)						
AMA1	pET30 Ek/LIC	Bgl II Xho I	<i>E. coli</i>	Ni ²⁺ - ácido iminodiacético - Sepharose (Novagen).	ELISA. inmunotransferencia	(Ferra et al., 2020)
AMA1C	pET30 Ek/LIC	Bgl II Xho I	<i>E. coli</i>	Ni ²⁺ - ácido iminodiacético - Sepharose (Novagen).	ELISA. inmunotransferencia	(Ferra et al., 2020)
AMA1N	pET30 Ek/LIC	Bgl II Eco RV	<i>E. coli</i>	Ni ²⁺ - ácido iminodiacético - Sepharose (Novagen).	ELISA. inmunotransferencia	(Ferra et al., 2020)

La tabla 3 nos presenta varios posibles candidatos de proteínas recombinantes, sin embargo, nos enfocamos en la proteína SAG1 identificada por Handman et al. (1980) y ocho años después Burg et al. clonó el gen SAG1 completo con 1100 kb encargadas de codificar 336 aminoácidos, que sintetizan la proteína (30kDa), la cual contiene un ligando glicosilfosfatidilinositol (GPI) que interviene en la unión de la membrana del parásito con la célula huésped, información que fue confirmada en el estudio donde se neutralizó la proteína logrando la caída de la invasión en la línea celular estudiada (Grimwood & Smith, 1992; Mineo & Kasper, 1994).

La respuesta inmunológica del huésped, inducida por SAG1 puede ser celular, que es la principal protección inmunitaria e incluye diferentes tipos de linfocitos y de citocinas que actúan con un mecanismo de citotoxicidad, dado por la reacción contra el principal antígeno de superficie (la proteína SAG), por otro lado, la inmunidad protectora que se presenta de manera parcial se induce por los lisados de taquizoítos y por el antígeno SAG1 (Smith & Johnson, 1988; Wang & Yin, 2014b).

Para crear una proteína recombinante se debe tomar en cuenta que la proteína SAG 1 nativa, se modifica después de la eliminación de la secuencia de señal, el terminal C y el anclaje del GPI, en el proceso de traducción. Para esto se recomienda clonar la parte madura de la proteína que va de los residuos 49 a 323, por lo general, se utilizan 6 residuos histídicos en el extremo N-terminal (Harning et al., 1996; Sánchez et al., 2020b), con el fin de ser purificada con éxito, por tanto, es importante tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Por esta razón, se han presentado varios métodos de purificación y enfoques cromatográficos estándar, descritos en la Tabla 4. Los más comunes se los realiza de dos maneras por centrifugación o fraccionamiento de sal y tampón de intercambio (Perez, 2016; Wingfield, 2015).

Tabla 4. Métodos de purificación de proteínas

Método	Características	
Extractos crudos	Se debe extraer la proteína por ejemplo con la trituración del músculo seguido de centrifugaciones en diferente tiempo y velocidad para separar las fracciones de interés.	
Precipitación y Solubilización Diferencial	Se puede precipitar en soluciones salinas concentradas, como el sulfato de amonio. Se debe eluir con fracciones crecientes de sulfato de amonio e ir recolectando cada fracción.	
Centrifugación en gradiente de sacarosa:	Se prepara un gradiente decreciente de sacarosa, seguido de ultracentrifugaciones, donde las proteínas van a separarse en relación al líquido y viscosidad del azúcar, por tanto, se puede separar la proteína, fraccionar el gradiente y recolectarlo.	
Diálisis	Este procedimiento sirve para intercambiar el solvente que se encuentra junto a la proteína. Por tanto, la membrana permite intercambiar agua e iones pero no la proteína hasta tener un equilibrio dentro y fuera de la membrana.	
Cromatografía	Cromatografía de columna	Se aplican dos fases una estacionaria y una móvil (tampón de lavado) la muestra se separa en función del tiempo y el volumen.
Consiste en la separación de proteínas a través de un polímero poroso	Cromatografía de intercambio de iones	Se aplica en función de la interacción electrostática de las proteínas y la resina. Las proteínas se separan de la matriz mediante el cambio de pH, concentración de sales o la fuerza iónica del tampón.
	Cromatografía de permeación en gel (tamiz molecular)	Se utiliza para una separación en base del tamaño de las proteínas utilizando Sephadex G, dextrano, agarosa o poliacrilamida
	Cromatografía de afinidad	Se utiliza un complejo de ligando y proteína específica para luego mediante el cambio de pH o solución salina se obtenga la proteína de interés.
	Cromatografía en papel	Se realiza en una capa de celulosa saturada de agua (fase estacionaria) y se la coloca en un tanque con solución (fase móvil).
	Cromatografía de capa fina	Se utiliza una fase estacionaria con una sustancia adsorbente en placas de vidrio y la separación se da de forma ascendente por capilaridad dependiendo de la polaridad de la fase sólida y el solvente.
	Cromatografía de gases	La fase móvil es un gas inerte como helio o nitrógeno, el cual pasa por una columna a alta presión que contiene líquido en una superficie sólida.

(Coskun, 2016; Crowe et al., 1994; Thomas, 2019; Young et al., 2012)

Cromatografía colorante-ligando		Las enzimas tienen la capacidad de unirse al colorante Cibacron Blue F3GA y su elución se realiza mediante variación del pH o intercambio iónico.
Cromatografía pseudoafinidad	de	Utiliza distintos ligandos como colorantes o metales por ejemplo la cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) con níquel, cobre, zinc, entre otros.
Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	de	La fase estacionaria consta de columnas con presiones atmosféricas a través de las cuales se pasa la fase líquida con velocidades de flujo altas.

Las proteínas recombinantes son muy utilizadas por su extensa aplicación en biología molecular, así como por su uso comercial. Las áreas de aplicación avanzan gracias al aumento de organismos manipulados genéticamente (Palomares et al., 2004). Por lo tanto, el objeto de este estudio es obtener una proteína recombinante con el fin de implementar pruebas de diagnóstico y nuevas alternativas para mejorar las estrategias de salud pública, prevención, control y desarrollo de la industria biotecnológica en el país.

2. Metodología

2.1. Área de Estudio:

La presente investigación es de tipo experimental, todos los procesos se realizaron en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Y su desarrollo aporta a las áreas de Inmunología y Biotecnología.

Este tipo de estudios que utilizan solo tecnología informática, no requieren de una aprobación previa del Comité de Ética, debido a que no se realizan estudios en seres humanos, animales o daños al medio ambiente.

2.2. Obtención de plásmidos y clonación en bacterias *E. coli* JM109

Se utilizó el gen SAG 1 del GenBank: AY217784.1 y las enzimas de restricción en Hind III y XhoI en el plásmido pET22b+, clonados en las bacterias *Escherichia coli* JM109 proporcionados por la Universidad de las Fuerzas Armadas.

2.3. Expresión de SAG 1 en bacterias *E. Coli* BL21 y lisis celular

Las células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) plyss, se cultivaron en medio LB que consta de 10 g de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl más 10 mg/ml de antibiótico de ampicilina (AMP) y se cultivó toda la noche a 37 °C a 210 rpm. Se realizó la transformación de bacterias *E. coli* JM109 a bacterias *E. coli* BL21 mediante choque térmico. La confirmación de la transformación se realizó mediante colony PCR.

Las colonias se cultivaron con medio LB más AMP, descrito previamente, durante una hora hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.6 nm. Con el OD deseado se indujo con isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM. Las bacterias se incubaron durante 8 horas a 37 °C con agitación de 210 rpm y se centrifugó cada hora a tres mil rpm durante 20 min a 4°C. Finalmente, se preparó sulfato de sodio de electroforesis en gel de policrilamida (SDS-PAGE) con concentración al 4 % y 9 %.

Para la lisis celular las bacterias inducidas se suspendieron en buffer de fosfato salino (PBS 10X) seguidas de presión sónica 110W en el equipo (Branson Ultrasonics) de 40 pulsos con intervalos de un minuto.

2.4. Purificación cromatográfica de la proteína SAG 1

La purificación de proteínas se realizó en columnas de (Dietilaminoetil (DEAE-sefarosa)), con 5 eluciones de 12 tiempos cada uno y todas las fracciones se concentraron. La purificación de la proteína SAG1 se llevó a cabo en las columnas de afinidad inmobilizadas con níquel y todas las fracciones fueron cuantificadas en el equipo Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y concentradas por centrifugación de 8000g durante 15 minutos, utilizando Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit,

2.5. Caracterización SAG 1 mediante western blot

Las proteínas SAG1 fueron separadas en un gel de policrilamida de 9 % y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida en buffer de transferencia towbin (tris base 25 mM, glicina 192 mM, pH: 8.3, metanol al 20 %), se ensambló el cassette y se colocó en la cámara del equipo Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) por tres tiempos de 25 V por 7 minutos. Se realizó 6 lavados de 10 minutos con TBS 1X (tris base 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.5) el cual se realizó después de cada incubación. Se incubó con 3 ml de bloqueo (BSA 5 %, buffer de TTBS (Buffer TBS, Tween 20.01 %)). Se incubó con anticuerpos IgG de *T. gondii* durante toda la noche. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante una hora y media en una dilución 1:2000. Finalmente, se preparó la solución de sustrato del kit Claruty ECL en proporción 1:1. Se incubó y reveló en quimioluminiscencia en el equipo ChemiDoc MP.

2.6. Análisis estadísticos:

Para la presente investigación los datos obtenidos de las curvas de crecimiento, así como las cuantificaciones de proteínas se realizaron en el programa GraphPad Prism 8, los geles fueron editados usando el programa imagen lab 6.

3. Resultados

3.1. Análisis de transformación de bacterias *E. coli* BL21

Las bacterias transformadas en *E. coli* BL21 se observan de forma redonda y blanca como se indica en la figura 1a y la verificación de la misma se encuentra demostrada mediante colony PCR en la figura 1b.

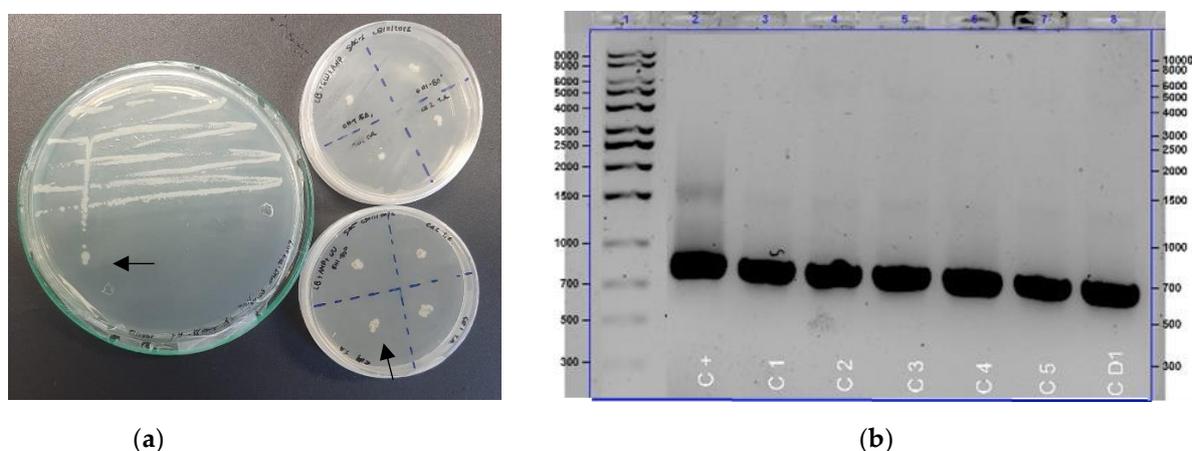


Figura 1. Transformación en bacterias BL21: (a) Colonias blancas y redondeadas transformadas de SAG 1, sembradas en medio de LB Broth más Bacto-agar con ampicilina (b) Gel de agarosa de Colony PCR de bacterias transformadas. Línea 1. Marcador de diez mil pares de bases, línea 2. Control positivo de plásmido de SAG 1, línea 3 a 8 ensamblaje correcto de seis construcciones de plásmidos.

3.2. Inducción de SAG 1 con IPTG

Las bacterias *E. coli* BL21 previamente transformadas fueron inducidas con IPTG, tienen un patrón de crecimiento ascendente hasta la hora 7 como se puede observar en la curva de tiempo y densidad óptica (OD) representados en la figura 2, contienen bandas visibles en el tamaño 30 KDa mismas que no se observan en BL21.

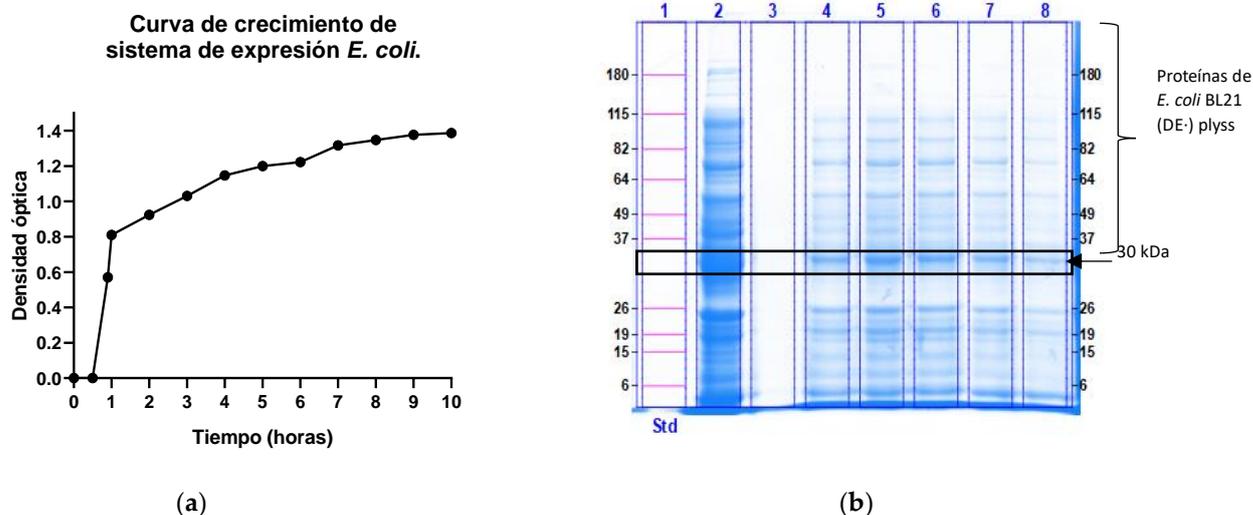


Figura 2. Inducción de SAG1: (a) Curva de crecimiento de *E. coli* inducidas por 1mM IPTG incubadas en intervalos de una hora; (b) Niveles de expresión en gel de electroforesis. Línea 1. Marcador 180 KDa, Línea 2. BL21, Línea 3. *E. coli* antes de la inducción con IPTG, Línea 4, 5, 6, 7, 8: son muestras en orden cronológico luego de la inducción con IPTG cada hora durante 5 horas. Observando la presencia de la producción de la proteína de interés con 30 KDa.

3.3. Lisis celular y purificación por cromatografía de intercambio iónico

La lisis se realizó mediante sonicación con lavados previos de buffer de fosfato salino de PBS y se obtuvo fracciones con concentraciones variables de 5 a 28 mg/l, verificando la presencia de las proteínas en el sobrenadante mediante un gel de poliacrilamida de 4 % y 9 % presente en la figura 3a. La purificación por intercambio iónico se realizó en columnas de DEAE, y se puede observar presencia de bandas en las distintas eluciones (3b).

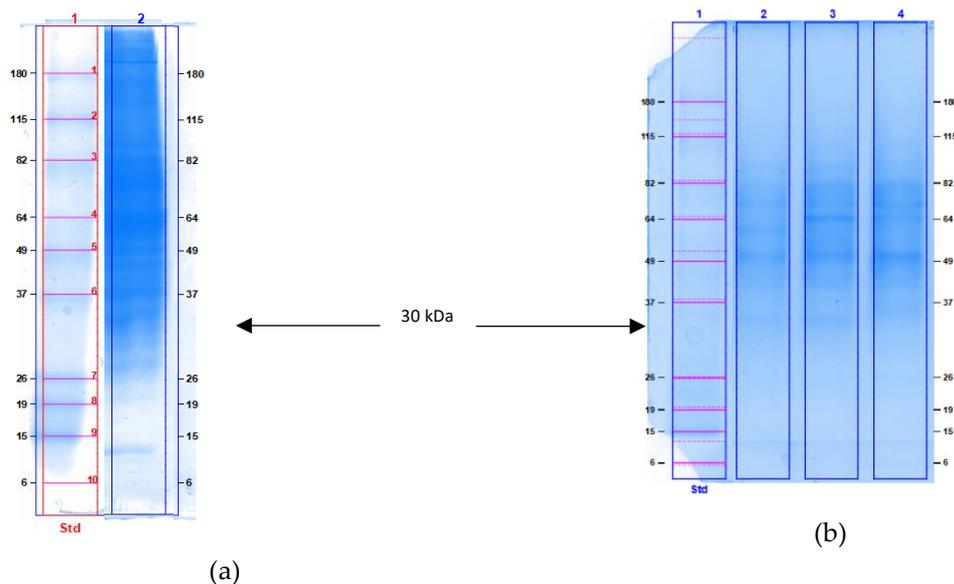


Figura 3. Purificación. (a) Lisis Celular de bacterias previamente inducidas. Línea 1. Marcador molecular de proteínas 180 KDa; línea 2. Lisis bacterianas. (b) Purificación por intercambio iónico. Línea 1. Marcador molecular de proteínas 180 KDa, línea 2. Muestras concentradas de la elución 2. línea 3. Muestras concentradas de la elución 3. línea 4. Muestras concentradas de la elución 4.

3.4. Caracterización de la proteína SAG1 mediante western blot

El Western blot de la proteína recombinante SAG1 se realizó en membrana de nitrocelulosa donde se observa el revelado positivo para antígenos IgG positivos para toxoplasma (figura 4) y las diferentes eluciones previamente concentradas seguidas de la presencia de las bandas en el tamaño de 30 KDa.

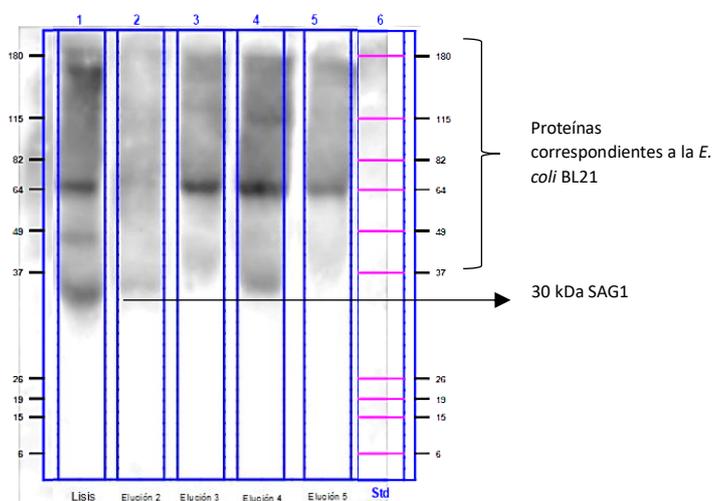


Figura 4. Caracterización de la proteína: El western blot se desarrolló con anticuerpos positivos para *T. gondii*. Línea 1. Lisis celular. Línea 2. Fracciones elución 2. Línea 3. Fracciones elución 3. Línea 4. Fracciones elución 4. Línea 5. Fracciones elución 5. Línea 6. Marcador de 180 KDa.

3.5 Purificación de SAG1 por cromatografía de afinidad

En la figura 5 se observa el carril 2 de purificación por intercambio iónico que se realizó en columnas de DEAE y en el carril 3 se observa la purificación por afinidad, obteniendo una concentración de 2,598 mg/ml.

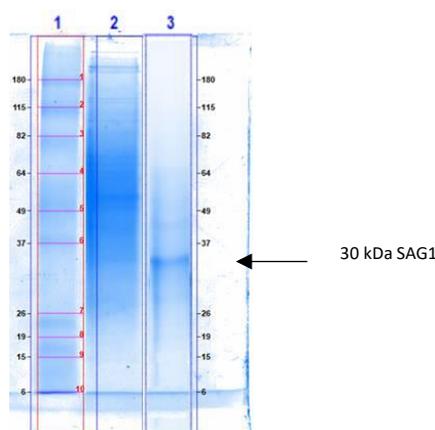


Figura 5. Purificación: Cromatografía de afinidad. Línea 1. Marcador de 180 KDa. Línea 2. Purificación por cromatografía de intercambio iónico; Línea3. Fracciones concentradas de SAG 1.

3.6 Rendimiento

El rendimiento para un cultivo de 50 ml de bacterias es de aproximadamente 40 mg/ml de lisis celular, seguido de la concentración obtenida de la columna DEAE de sefarosa para finalmente obtener de 3 a 5 fracciones de 0,200 mg/ml por cada mililitro de purificación, concentrando 2.598 mg/ml de proteína SAG1.

Cultivo	Lisis	Cromatografía por separación de iones	Cromatografía por afinidad
50 ml	40 mg/ml aprox. en 1.5 ml	16mg/ml aprox. en 1.5 ml	0.200mg/ml aprox. en 1 ml

4. Discusión

En los últimos años se han desarrollado métodos y técnicas para producir y purificar proteínas recombinantes con fines farmacológicos, investigativos en función y estructura de proteínas o para la fabricación de enzimas, de igual manera en el campo de la medicina se han realizado varios estudios para el análisis de la capacidad diagnóstica de las proteínas recombinantes y la unión con su anticuerpo, con la intención de agilizar la detección de las enfermedades, como es el caso de la toxoplasmosis que puede prevenir problemas en mujeres en gestación e inmunodeprimidos principalmente (Schumann et al., n.d.).

En el Ecuador, todas las pruebas comerciales son de importación, por lo cual, nuestro objetivo es producir una proteína recombinante para encaminar futuros ensayos diagnósticos.

Se estudian distintos antígenos que poseen potencial diagnóstico, que permitan realizar pruebas más precisas, sensibles, específicas y confiables (Kotresha & Noordin, 2010). SAG1 ha tenido un amplio análisis como proteína recombinante, pero todos sus ensayos han tenido resultados variados, lo que puede deberse

a la distinta elección de fracciones del gen, distintas experimentaciones de clonación o ensayos diagnósticos, sin embargo, se debe tener en claro que dicha proteína solo se encuentra presente en la forma infectante de taquizoito del *Toxoplasma gondii*, por lo tanto no puede diagnosticar la forma latente de la enfermedad (Pfrepper et al., 2005; Wu et al., 2009).

En el estudio se utilizó el fragmento del gen que corresponde al mencionado en el NCBI: AY217784.1, con el vector pET22b+, clonado en la cepa JM109 de *E. coli* seguido de su expresión en la cepa *E. coli* BL21, la cual se seleccionó por su capacidad de minimizar la degradación de la proteína buscada. El vector pET y la cepa *E. coli* BL21 es la combinación más común, por ello se ha realizado la expresión de cientos de proteínas (Burgess, 2009; Piriz, 2014). El vector pET22b fue elegido por distintas características como: la secuencia pelB que permite dirigir a la proteína de interés hacia el espacio periplásmico de la célula huésped, lo que facilita la formación de enlaces disulfuro para su plegamiento, presenta un promotor T7 que se induce por IPTG, contiene un gen Amp^R el cual confiere a la proteína resistencia a la ampicilina, tiene una secuencia de 6 histidinas para facilitar la purificación y posee un sitio de clonación múltiple (Gasperin, 2015; Piriz, 2014).

La proteína SAG1 al ser la más inmunogénica, induce una gran respuesta inmune, además de ser encontrada en la mayoría de cepas de *T. gondii* (Aubert et al., 2000). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la proteína es muy variante y compleja y por lo general la expresión de SAG1 en *E. coli* es insoluble, por tanto, pierde la reactividad inmune, una de las razones puede ser su mal plegamiento (Aubert et al., 2000; Chen et al., 2001). Se ha demostrado que el *T. gondii* es específico para el diagnóstico de toxoplasmosis en humanos, sin embargo, existen otras Apicomplexas como *Neospora caninum* y *Hammondia* spp. que no parasitan al ser humano, pero presentan más del 90 % de similitud con SAG1, en consecuencia, se debe tener en cuenta por si en un futuro infectan al hombre (Gondim et al., 2017).

Una vez purificadas las proteínas, la utilización de los diferentes tipos de técnicas inmunológicas tanto como ELISA, western blot, fusión con nanopartículas, pruebas de inmunocromatografía e incluso el desarrollo de una plataforma de nanoanticuerpos serían las futuras direcciones de este trabajo.

5. Conclusiones

La proteína obtenida en este estudio, tiene el tamaño de 30KDa. La combinación del vector/cepa elegida dio resultados favorables para la obtención de la proteína recombinante SAG1, misma que fue expresada en bacterias de *E. coli* BL21 inducidas con una concentración de 1mM de Iptg. Este ensayo se repitió en varias ocasiones para obtener un número de muestras estadísticamente significativas, finalmente, se realizaron las pruebas de caracterización, mismas que reconocen *Toxoplasma gondii*.

La proteína recombinante de SAG1 podría ser un buen candidato para realizar futuros experimentos de western blot, ELISA, nanopartículas, vacunas, entre otros utilizados tanto en diagnóstico como en terapias antigénicas.

Finalmente, en 50 ml de cultivo se obtuvo una concentración variable de entre 5 a 28 mg/ml de proteínas después de la lisis celular, iniciando la purificación con una concentración de 1 mg/ml con un rendimiento de 0,200 mg/ml de proteína SAG 1.

Financiamiento/Fondos: Esta investigación fue financiada Universidad de las fuerzas armadas ESPE y por la DII-UISEK-.

Agradecimientos: A la Dra. Marbel Torres que gracias a su guía y paciencia concluí el desarrollo de mi trabajo de fin de maestría y los Maestros de la Universidad Internacional SEK por contribuir con mi superación académica.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias citadas

- Advin. (2021). TOXO IgG/IgM Cassette (Suero/Plasma) Ficha Técnica. Reactlab. <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2021/03/Inserto-Advin-Toxoplasma-IgGIgM-WTGM-C32.pdf>
- Aubert, D., Maine, G. T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., Brojanac, S., Chovan, L. E., Nowlan, S. F., & Pinon, J. M. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1144–1150. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1144-1150.2000>
- Biotech Inc. (2019). Prueba Rápida OnSite Toxo IgG/IgM-(Suero / Plasma) Página 1 de 2.
- Bravo-Yáñez, & Latorre-Barragán. (2020). Vista de Una revisión actualizada de *Toxoplasma gondii* en Ecuador: dónde estamos y a dónde vamos desde aquí. *Revista Dilemas Contemporáneos: Educación, Política y Valores*, 8(1), 1–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.46377/dilemas.v8i1.2462>
- Brenier-Pinchart, M. P., Robert-Gangneux, F., Accoceberry, I., Pichard, S., Garnaud, C., Fricker-Hidalgo, H., Lévêque, M. F., Hoarau, G., Pelloux, H., Bastien, P., Sterkers, Y., & Varlet-Marie, E. (2021). Multicenter Comparative Assessment of the TIB MolBiol *Toxoplasma gondii* Detection Kit and Four Laboratory-Developed PCR Assays for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(8), 1000–1006. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2021.05.010>
- Burgess, R. (2009). Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In *Methods in Enzymology* (Vol. 463, Issue C, pp. 259–282). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63017-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63017-2)
- Chen, X. G., Gong, Y., Hua-Li, Lun, Z. R., & Fung, M. C. (2001). High-level expression and purification of immunogenic recombinant SAG1 (P30) of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 23(1), 33–37. <https://doi.org/10.1006/PREP.2001.1483>
- Correa, P., de Araujo, J., Rodriguez, M., Baldino, F., Martins-Duarte, E., Almeida, N., Attias, M., Barrantes, F., Baleeiro, P., & de Souza, W. (2021). Morphological and biochemical repercussions of *Toxoplasma gondii* infection in a 3D human brain neurospheres model. *Brain, Behavior, and Immunity - Health*, 11(100190), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.BBIH.2020.100190>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Coto, F., Murillo, F., & Rocha, S. (2021). Encefalitis por *Toxoplasma gondii* en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Médica Sinergia*, 6(10). <https://doi.org/10.31434/RMS.V6I10.723>
- Couvreur, G., Sadak, A., Fortier, B., & Dubremetz, J. F. (1988). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 97(1), 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0031182000066695>
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D., & Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. In A. J. Harwood (Ed.), *Protocols for Gene Analysis. Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 31, pp. 371–387). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:371/COVER>
- Döşkaya, M., Pullukçu, H., Karakavuk, M., Şahar, E. A., Taşbakan, M. S., Taşbakan, M. I., Yılmaz, M., Can, H., Döşkaya, A. D., & Gürüz, A. Y. (2019). Comparison of an in house and a commercial real-time polymerase chain reaction targeting *Toxoplasma gondii* RE gene using various samples collected from patients in Turkey. *BMC Infectious Diseases*, 19(1042). <https://doi.org/10.1186/S12879-019-4666-Z/TABLES/1>
- Dziadek, B., Gatkowska, J., Brzostek, A., Dziadek, J., Dzitko, K., & Długonska, H. (2009). *Toxoplasma gondii*: The immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*, 123(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2009.06.002>
- Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, 26(4), 190–196. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2010.01.009>
- Espinoza, J., López, E., Dabanch, J., & Cruz, R. (2022). Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la infección por *Toxoplasma gondii*. *Revista Chilena Infectol*, 39(2), 132–137. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182022000200132>

- Ferra, B., Holec-Gasior, L., Gatkowska, J., Dziadek, B., & Dzitko, K. (2020). Toxoplasma gondii Recombinant antigen AMA1: Diagnostic Utility of Protein Fragments for the Detection of IgG and IgM Antibodies. *Pathogens*, 9(1), 43. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9010043>
- Frenkel, J., & Ruiz, A. (1973). Toxoplasmosis humana - Una Revisión. *Acta Médica Costarricense*, 16(1), 5–73. <http://hdl.handle.net/20.500.11764/2175>
- Galván, M. de la L. (2014). *Toxoplasmosis Animal* (1ra. Ed.). Universidad de Guadalajara. https://www.researchgate.net/publication/298214396_Toxoplasmosis_Animal
- Galván-Ramírez, M. de la L., & Mondragón-Flores, R. (2017). *Toxoplasmosis Humana* (M. Ramos-Escamilla, Ed.; 1ra Ed.). ECORFAN. https://www.ecorfan.org/libros/BOOK_TOXOPLASMOSIS.pdf
- Gasperin, J. (2015). Clonación y expresión de la conotoxina recombinante cal26a de *Conus californicus* en *Escherichia coli* [(Tesis para la obtención del grado de Maestro en Ciencias), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/657/1/242751.pdf>
- Gondim, L., Mineo, J., & Schares, G. (2017). Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology*, 144(7), 851–868. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000063>
- Grimwood, J., & Smith, J. E. (1992). *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Experimental Parasitology*, 74(1), 106–111. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90144-Y](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90144-Y)
- Hanafiah, M., Helmi, T. Z., Sutriana, A., Priyowidodo, D., & Fihiruddin, F. (2020). Cloning and expression of *Toxoplasma gondii* GRA-4 recombinant protein as a toxoplasmosis diagnostic kit candidate. *Veterinary World*, 13(10), 2085–2091. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2085-2091>
- Handman, E., Goding, J. W., & Remington, J. S. (1980). Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 124(6), 2578–2583.
- Harning, D., Spenter, J., Metsis, A., Vuust, J., & Petersen, E. (1996). Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 3(3), 355–357. <https://doi.org/10.1128/CDLI.3.3.355-357.1996>
- Holec-Gasior, L., & Kur, J. (2010). *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. *Experimental Parasitology*, 124(3), 272–278. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2009.10.010>
- Holec, L., Gasior, A., Brillowska-Dabrowska, A., & Kur, J. (2008). *Toxoplasma gondii*: Enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. *Experimental Parasitology*, 119(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2007.12.002>
- Hotop, A., Hlobil, H., & Groß, U. (2012). Efficacy of Rapid Treatment Initiation Following Primary *Toxoplasma gondii* Infection During Pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 54(11), 1545–1552. <https://doi.org/10.1093/CID/CIS234>
- Jalallou, N., Bandehpour, M., Khazan, H., Haghighi, A., & Kazemi, B. (2012). Evaluation of Recombinant SAG1 Protein for Detection of *Toxoplasma gondii* Specific Immunoglobulin M by ELISA Test. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(4), 21.
- Javadi Mamaghani, A., Seyyed Tabaei, S. J., Ranjbar, M. M., Haghighi, A., Spotin, A., Ataee Dizaji, P., & Rezaee, H. (2020). Designing Diagnostic Kit for *Toxoplasma gondii* Based on GRA7, SAG1, and ROP1 Antigens: An In Silico Strategy. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(4), 2269–2283. <https://doi.org/10.1007/S10989-020-10021-X>
- Jiang, T., Gong, D., Ma, L., Nie, H., Zhou, Y., Yao, B., & Zhao, J. (2008). Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in swines. *Veterinary Parasitology*, 158(1–2), 51–56. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.07.035>
- Jirapattharasate, C., Udonsom, R., Prachasuphap, A., Jongpitisub, K., & Dhepakson, P. (2021). Development and evaluation of recombinant GRA8 protein for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in goats. *BMC Veterinary Research*, 17(27), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12917-020-02719-3/FIGURES/6>

- Johnson, A. M., McDonald, P. J., & Neoh, S. H. (1983). Monoclonal Antibodies to Toxoplasma Cell Membrane Surface Antigens Protect Mice from Toxoplasmosis. *The Journal of Protozoology*, 30(2), 351–356. <https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.1983.TB02929.X>
- Jones, J., Lopez, A., & Wilson, M. (2003). Congenital toxoplasmosis. *American Family Physician*, 67(10), 2131–2138. <https://doi.org/10.1097/00006254-200105000-00025>
- Kotresha, D., & Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS*, 118(8), 529–542. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0463.2010.02629.X>
- Levine, N. D. (1977). Taxonomy of Toxoplasma. *The Journal of Protozoology*, 24(1), 36–41. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1977.tb05278.x>
- Liyanage, K. L. D. T. D., Wiethoelter, A., Hufschmid, J., & Jabbar, A. (2021). Descriptive Comparison of ELISAs for the Detection of Toxoplasma gondii Antibodies in Animals: A Systematic Review. *Pathogens*, 10(5), 605. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10050605>
- Martín-Hernández, I., & García-Izquierdo, S. (2003). Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*, 28(3), 19–27.
- Martin, V., Arcavi, M., Santillan, G., Amendoeira, M. R. 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. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(5), 627–631. <https://doi.org/10.1128/cdli.5.5.627-631.1998>
- Mineo, J. R., & Kasper, L. H. (1994). Attachment of Toxoplasma gondii to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Experimental Parasitology*, 79(1), 11–20. <https://doi.org/10.1006/EXPR.1994.1054>
- Montoya, J. G. (2002). Laboratory Diagnosis of Toxoplasma gondii Infection and Toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(1), S73–S82. <https://doi.org/10.1086/338827>
- Montoya, J. G., & Remington, J. S. (2008). Management of Toxoplasma gondii infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 47(4), 554–566. <https://doi.org/10.1086/590149/2/47-4-554-TBL007.GIF>
- Murata, F. H. A., Previato, M., Frederico, F. B., Barbosa, A. P., Nakashima, F., Faria, G. M. de, Silveira Carvalho, A. P., Meira Strejevitch, C. da S., Pereira-Chioccola, V. L., Castiglioni, L., de Mattos, L. C., Siqueira, R. C., & Brandão de Mattos, C. C. (2020). Evaluation of Serological and Molecular Tests Used for the Identification of Toxoplasma gondii Infection in Patients Treated in an Ophthalmology Clinic of a Public Health Service in São Paulo State, Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 472. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00472>
- Pacheco, J., & Fernández, M. (2019). Programa educativo sobre toxoplasmosis en embarazadas que asisten al Centro de Salud de la parroquia rural Once de Noviembre, ciudad de Latacunga, provincia de Cotopaxi. (Tesis previo la obtención del título de Licenciada en Enfermería), Universidad Técnica de Ambato. <https://1library.co/document/y44mrr0y-universidad-t%C3%A9cnica-ambato-facultad-ciencias-salud-carrera-enfermer%C3%ADa.html>
- Pagheh, A. S., Sarvi, S., Gholami, S., Asgarian-Omran, H., Valadan, R., Hassannia, H., Ahmadpour, E., Fasihi-Ramandie, M., Dodangeh, S., Hosseni-khah, Z., & Daryani, A. (2019). Protective efficacy induced by DNA prime and recombinant protein boost vaccination with Toxoplasma gondii GRA14 in mice. *Microbial Pathogenesis*, 134. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.103601>
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., & Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 267, 15–52. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:015>
- Perez, A. (2016). Créditos Institucionales.
- Pfreppe, K. I., Enders, G., Gohl, M., Krczal, D., Hlobil, H., Wassenberg, D., & Soutschek, E. (2005). Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(8), 977–982. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.8.977-982.2005>
- Piriz, F. (2014). Subclonado y expresión de la secuencia codificante para Cu/Zn superóxido Dismutasa humana 1en Escherichia coli [Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1463/1/uy24-16025.pdf>
- Ratio Diagnostics. (2018). Antigen-Coated Microtitration Strips.

- Restrepo, M. (2007). Toxoplasmosis: Zoonosis parasitaria. CES Medicina. <https://www.redalyc.org/pdf/2611/261120985004.pdf>
- Rosso, F., Agudelo, A., Isaza, Á., & Montoya, J. (2007). Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colombia Médica*, 3, 38. <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v38n3/v38n3a14.pdf>
- Sánchez, R., Barba, M., Ramos, Y., & Brossard, E. (2020a). Algunas variables epidemiológicas relacionadas con la toxoplasmosis en mujeres en edad fértil en Riobamba. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. <https://orcid.org/0000-0002-7563-1697>
- Sánchez, R., Barba, M., Ramos, Y., & Brossard, E. (2020b). Algunas variables epidemiológicas relacionadas con la toxoplasmosis en mujeres en edad fértil en Riobamba. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39. <https://orcid.org/0000-0002-7563-1697>
- Schumann, W., Carlos, L., & Ferreira, S. (n.d.). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Retrieved February 4, 2023, from www.sbg.org.br
- Singh, H., Tewari, A. K., Mishra, A. K., Maharana, B., Sudan, V., Raina, O. K., & Rao, J. R. (2015). Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domesticated ruminants by recombinant truncated SAG2 enzyme-linked immunosorbent assay. *Tropical Animal Health and Production*, 47(1), 171–178. <https://doi.org/10.1007/S11250-014-0703-5/TABLES/3>
- Smith, D. B., & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67(1), 31–40. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90005-4)
- Stansfeld, A. G. (1961). The histological diagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. *J. Clin. Path*, 14, 565. <https://doi.org/10.1136/jcp.14.6.565>
- Sudan, V., Tewari, A. K., & Singh, H. (2019). Detection of Antibodies Against *Toxoplasma gondii* in Indian Cattle by Recombinant SAG2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Acta Parasitologica*, 64(1), 148–151. <https://doi.org/10.2478/S11686-018-00016-6/METRICS>
- Suzuki, Y., Yang, Q., Yang, S., Nguyen, N., Lim, S., Liesenfeld, O., Kojima, T., & Remington, J. S. (1996). IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. *The Journal of Immunology*, 157(6).
- Thomas, L. (2019, February 26). Protein Purification Techniques. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Purification-Techniques.aspx>
- Tomasz Ferra, B. I., Holec-Gąsior, L., Gatkowska, J. I., Dziadek, B., Dzitko, K., Graźlewska, W. I., & Lautenbach, D. (2019). The first study on the usefulness of recombinant tetravalent chimeric proteins containing fragments of SAG2, GRA1, ROP1 and AMA1 antigens in the detection of specific anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in mouse and human sera. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217866>
- Wang, Y., & Yin, H. (2014a). Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 180. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>
- Wang, Y., & Yin, H. (2014b). Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 180. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>
- Werner Apt, B. (2014). Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 485–528. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70065-3](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70065-3)
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, 6.1.1-6.1.35. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0601S80>
- Wu, K., Chen, X. G., Li, H., Yan, H., Yang, P. L., Lun, Z. R., & Zhu, X. Q. (2009). Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(3), 261–266. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2009.02.009>
- Yang, Y., Huang, Y., Zhao, X., Lin, M., Chen, L., Zhao, M., Chen, X., Yang, Y., Ma, G., Yao, C., Huang, S., & Du, A. (2022). Development of an Immunochromatographic Test Based on Rhoptyr Protein 14 for Serological Detection of *Toxoplasma gondii* Infection in Swine. *Animals*, 12(15), 1929. <https://doi.org/10.3390/ANI12151929/S1>
- Ybañez, R. H. D., Ybañez, A. P., & Nishikawa, Y. (2020). Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 204. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00204/BIBTEX>

Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201100155>