



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología**

**Evaluación del antígeno excretor/secretor y de  
membrana de *Toxoplasma gondii* para la detección de  
la infección en pacientes en fase aguda mediante  
Western blot**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo  
Parasitólogo

**AUTOR**

José Luis PASCO ESPINOZA

**ASESORES**

Dr. Juan Atilio JIMENEZ CHUNGA

Manuela Renee VERÁSTEGUI PIMENTEL

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Pasco, J. (2024). *Evaluación del antígeno excretor/secretor y de membrana de Toxoplasma gondii para la detección de la infección en pacientes en fase aguda mediante Western blot*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	José Luis Pasco Espinoza
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74120587
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0009-0007-7773-5119">https://orcid.org/0009-0007-7773-5119</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Juan Atilio Jimenez Chunga
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06281952
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-6431-8371">https://orcid.org/0000-0002-6431-8371</a>
<b>Datos de coasesor</b>	
Nombres y apellidos	Manuela Renee Verástegui Pimentel
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08604175
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-7500-1353">https://orcid.org/0000-0002-7500-1353</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Enrique Walter Mamani Zapana
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	02414092
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Liz Erika Cruz Pio
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41509033
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Francisco Talledo Rivera

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25625144
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	Salud pública y zoonosis
Grupo de investigación	Inmunología parasitaria de humanos y animales de importancia en salud pública
Agencia de financiamiento	No corresponde
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorios de Investigación y Desarrollo País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Martín de Porres Urbanización: Ingeniería Calle: Av. Honorio Delgado 430 Latitud: -12.023552 Longitud: -77.0563689
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2022- Octubre 2023
URL de disciplinas OCDE	Enfermedades infecciosas <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO  
MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)**

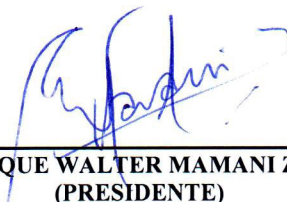
Siendo las *10:11* horas del 26 de enero del 2024, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **JOSÉ LUIS PASCO ESPINOZA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20230109407, el titulado expuso su tesis: **EVALUACIÓN DEL ANTÍGENO EXCRETOR/SECRETOR Y DE MEMBRANA DE *Toxoplasma gondii* PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN EN PACIENTES EN FASE AGUDA MEDIANTE WESTERN BLOT**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota *19* calificado: *aprobado con máximas honores*.


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **JOSÉ LUIS PASCO ESPINOZA** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las *11:23* horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de diciembre de 2024.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. ENRIQUE WALTER MAMANI ZAPANA  
(PRESIDENTE)

  
\_\_\_\_\_  
DR. JUAN ATILIO JIMENEZ CHUNGA  
(ASESOR)

  
\_\_\_\_\_  
Mg. MIGUEL ANGEL FRANCISCO TALLEDO RIVERA  
(MIEMBRO)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. LIZ ERIKA CRUZ PIO  
(MIEMBRO)



## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo JUAN ATILIO JIMENEZ CHUNGA en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 000299-2022-D-FCB/UNMSM de la tesis, cuyo título es “EVALUACIÓN DEL ANTÍGENO EXCRETOR/SECRETOR Y DE MEMBRANA DE TOXOPLASMA GONDII PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN EN PACIENTES EN FASE AGUDA MEDIANTE WESTERN BLOT”, presentado por el Bachiller José Luis Pasco Espinoza para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 7 % de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.



Firmado digitalmente por JIMENEZ  
CHUNGA Juan Atilio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 19.01.2024 09:41:52 -05:00

Firma del Asesor \_\_\_\_\_

DNI: 06281952

Nombres y apellidos del asesor: JUAN ATILIO JIMENEZ CHUNGA



## **DEDICATORIA**

A mi madre, por su preocupación, cariño y amor incondicional, que en paz descanse.



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimientos a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por formarme y prepararme como profesional.

Al Dr. Juan Jiménez por la guía y preocupación durante todo el tiempo desde el inicio del proyecto, por la confianza, su experiencia y conocimientos aportaron a la culminación del proyecto.

A la Dr. Manuela Verástegui, por recibirme en el laboratorio, por la confianza, por permitirme realizar la tesis y apoyarme incondicionalmente en momentos difíciles, su orientación y experiencia permitieron que el trabajo sea completado de manera exitosa.

A la Dr. Maritza Calderón, por su empuje, por su apoyo y aconsejarme en poder seguir y culminar el trabajo, su respaldo en el laboratorio fue crucial, por su conocimiento en el tema y su aporte al trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Inmunología, en especial a Edith Málaga, Carlos Neyra, Valeria Rubio, Solange Custodio, Oscar Nizama, Octavio Zapata, Edson Bernal, Nancy Chile, gracias a su amistad, paciencia, cariño, y sus ganas de compartir sus conocimientos, sin su apoyo, el trabajo no hubiera sido posible.

A mi familia, a mis padres, hermana Gisela, tío Freddy, abuela María, por su amor, su apoyo incondicional, y soporte en momentos difíciles.

Al laboratorio de Inmunología, Enfermedades Infecciosas, perteneciente al LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y a todo el personal, por permitirme realizar el trabajo en sus instalaciones.

## LISTAS DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>AM</b>	Antígeno de membrana
<b>Dpi</b>	Días post infección
<b>E/S</b>	Excretorios / Secretorios
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzima
<b>GRA</b>	Antígeno presente en los gránulos densos de <i>T. gondii</i>
<b>HAI</b>	Hemaglutinación indirecta
<b>Hepes</b>	Solución tampón que permite mantener estable el pH para células de crecimiento rápido
<b>IMC</b>	Complejo de membrana interna
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia Indirecta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IL-12</b>	Interleucina-12
<b>kDa</b>	Unidad de masa atómica
<b>LLC-MK2</b>	Células Epiteliales de riñón de mono Rhesus
<b>Me49</b>	Cepa avirulenta de <i>Toxoplasma gondii</i> con genotipo II
<b>NK</b>	Células Asesinas
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b>RF</b>	Medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente de migración

<b>RH</b>	Cepa virulenta de <i>Toxoplasma gondii</i> con genotipo I
<b>ROP</b>	Proteínas del bulbo de las roptrias de <i>T. gondii</i>
<b>RPMI</b>	Medio del instituto del Memorial de Roswell Park
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>T CD4</b>	Linfocitos T cooperadores
<b>T CD8</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamina, N,N,N',N'-tetrametiletildiamina o N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina
<b>TLA</b>	Antígeno Total Lisado
<b>TLR</b>	Receptores Tipo Toll
<b>WB</b>	Western blot

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Agente etiológico .....	3
2.2 Biología del parásito <i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
2.2.1 Estructuras celulares.....	3
2.2.2 Estadíos.....	9
2.3 Ciclo biológico .....	13
2.3.1 Fase sexual.....	15
2.3.2 Fase asexual.....	15
2.4 Fases de la Toxoplasmosis .....	16
2.4.1 Fase aguda.....	16
2.4.2 Fase crónica .....	17
2.5 Cepas.....	18
2.6 Respuesta inmune a <i>Toxoplasma gondii</i> .....	18
2.6.1 Respuesta inmune innata.....	18
2.6.2 Respuesta inmune adaptativa.....	19
2.7 Pruebas diagnósticas .....	20
2.7.1 Hemaglutinación indirecta (HAI).....	20
2.7.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	21
2.7.3 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA) .....	21
2.7.4 Técnica de Western blot (WB).....	22
2.7.5 PCR.....	23
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Objetivo general .....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1 Materiales.....	25
5.1.1 Material biológico .....	25
5.2 Métodos .....	25
5.2.1 Mantenimiento del cultivo celular .....	25
5.2.2 Infección del cultivo celular .....	26
5.2.3 Obtención de antígeno total lisado (TLA) .....	26
5.2.4 Obtención de antígeno excretos/secretos (E/S) .....	26

5.2.5 Obtención del antígeno de membrana (AM) .....	27
5.2.6. Obtención de suero en fase aguda y crónica en modelo de ratas.....	27
5.2.7 Obtención de suero humano para el procedimiento de Western blot.....	28
5.2.8 Prueba de Western blot.....	29
5.2.9 Análisis de las bandas antigénicas.....	30
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
6.1 Obtención del antígeno total lisado (TLA) .....	31
6.2 Obtención de antígenos excretorios secretorios (E/S).....	31
6.3 Obtención de antígenos de membrana (AM) .....	32
6.4 Obtención de suero en fase aguda y crónica en modelo de ratas.....	34
6.5 Resultados de la prueba de Western blot de suero de ratas y humanos.....	35
6.5.1 Determinación del Western blot de suero de ratas infectadas contra los antígenos: Antígeno total lisado (TLA), Excretorios/Secretorios (E/S) y antígenos de membrana (AM) 35	
6.5.2 Determinación del Western blot de sueros humanos contra los antígenos: Antígeno total lisado (TLA), Excretorios/Secretorios (E/S) y antígenos de membrana (AM) de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	38
6.5.3 Frecuencias de bandas inmunoreactivas .....	54
6.6 Análisis de las bandas antigénicas .....	63
6.6.1 Sensibilidad y Especificidad .....	63
6.6.2 Patrones de bandas inmunoreactivas .....	66
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>XI. ANEXO .....</b>	<b>85</b>
<b>XII. APÉNDICE .....</b>	<b>93</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Las zoonosis afectan significativamente la salud humana, animal y los ecosistemas. Se estima que aproximadamente el 20 % de enfermedades humanas y decesos en países en vía de desarrollo son a causa de alguna zoonosis (Grace et al., 2011). Se reconocen 56 zoonosis (Leptospirosis, cisticercosis, tuberculosis, leishmaniosis, brucelosis, echinococcosis, toxoplasmosis, tripanosomiasis, etc.) entre las más importantes, de las cuales se sabe que juntas son responsables de aproximadamente 2.7 millones de muertes y alrededor de 2.5 millones de enfermedades en humanos (Grace et al., 2012).

Una de las zoonosis que afectan al ser humano es la toxoplasmosis, infección causada por el parásito apicomplexa *Toxoplasma gondii* y que representa un peligro constante ya que causa significativos niveles de morbilidad y mortalidad para las poblaciones de riesgo. En países en vías de desarrollo, en Latinoamérica por ejemplo, resulta un peligro mayor ya que debido a sus climas cálidos, al escaso conocimiento de la población y el mal manejo por parte de las instituciones de la salud, el parásito encuentra la forma de llegar a infectar al hombre y sumado a esto su estadio de ooquiste es sumamente resistente y contamina el medio ambiente persistiendo por amplios periodos de tiempo (El Bissati et al., 2018). Se le puede considerar como uno de los parásitos con mayor éxito en la Tierra debido a la presencia y a la amplia gama de hospederos que infecta, incluyendo a animales de sangre caliente y algunas especies de sangre fría y se estima que ha infectado a más de un tercio de la población mundial humana (Djurković-Djaković et al., 2019). A pesar de que la enfermedad ha sido conocida y estudiada por mucho tiempo, aún siguen existiendo brotes de infección por *Toxoplasma gondii*, y su frecuencia y gravedad representan un gran reto para la salud pública (Boyer et al., 2011). Los brotes en Latinoamérica son bastante recientes, incluyendo brotes a causa del agua contaminada en Brasil (Minuzzi et al., 2021) y brotes en comunidades amazónicas (Blaizot et al., 2020).

En el Perú no hay estudios que documenten sobre la seroprevalencia de la toxoplasmosis para la población en general; sin embargo, existen estudios de la seroprevalencia en mujeres gestantes ya que son un grupo de riesgo para esta infección. Se ha registrado una alta seroprevalencia de toxoplasmosis en madres gestantes, en un porcentaje de 97.6 % y 97.4 % en los hospitales de Loreto “Felipe Arriola Iglesias” y “César Garayar García” respectivamente (Reátegui & Vela 2011). En Lambayeque, en el distrito de Mórrope, la prevalencia de toxoplasmosis fue de 35,8 % de un total de 218 mujeres embarazadas que fueron escogidas aleatoriamente (Silva et al., 2020). Estos datos resultan preocupantes, pues si la infección ocurre durante la gestación (fase aguda), el resultado sería la transmisión vertical del parásito, lo cual es perjudicial para el neonato, pues la infección puede ocasionar hidrocefalia, microcefalia, coriorretinitis, retraso en el desarrollo neuropsicomotor, pérdida auditiva neurosensorial y otros síntomas y signos que pueden manifestarse luego de años desde la concepción (Rorman et al., 2006)

La otra población de riesgo son las personas inmunosuprimidas; en pacientes con VIH por ejemplo, el parásito puede llegar a infectar el sistema nervioso central, esto puede llegar a

provocar encefalitis, convulsiones y en algunos casos más graves dejar secuelas como hemiparesia y hasta la muerte (Cáceda et al., 2000), incluso, pero con muy poca frecuencia, se han reportado casos de pacientes VIH positivos con toxoplasmosis intramedular (Pérez et al., 2017). Para ambas poblaciones en riesgo resulta importante y oportuno conocer la fase de la infección en la que se encuentran, ya que es en la fase aguda donde se da la toxoplasmosis congénita y las complicaciones en pacientes inmunocomprometidos, este último resultado de la reactivación de una infección latente, en estado crónico (Ferreira et al., 2008).

La infección se diagnostica mediante la búsqueda de anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii*, se utilizan pruebas como inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Cozon et al., 1998). Para los estudios de seroprevalencia en mujeres gestantes realizados en Perú la técnica que se usó para diagnosticar la infección fue la de ELISA (Reátegui & Vela 2011; Silva et al., 2020), estas pruebas se basan en la búsqueda de la inmunoglobulina G y M (IgG e IgM) en los sueros de los pacientes y se ha observado que estos resultados pueden llegar a ser contradictorios cuando se requiere diagnosticar la fase aguda de la infección, esto debido a que los anticuerpos IgM contra *T. gondii* pueden estar presentes mucho tiempo después de la infección en algunos pacientes, provocando así un mal diagnóstico de la fase aguda (Marcolino et al., 2000). La técnica de ELISA indirecta no puede detectar títulos bajos de anticuerpos IgG, resulta un buen marcador para la infección, pero no para definir el tiempo de la infección; por otra parte, la IgM específica, con esta misma técnica, ha sido reportada en altas concentraciones en pacientes en fase crónica (Contreras et al., 2000). Se han realizado estudios para estandarizar una prueba confirmatoria mediante la técnica de Western Blot, donde utilizaron el antígeno total lisado (TLA) (González et al., 2018). Además en otro estudio utilizaron la misma técnica pero para diagnosticar la toxoplasmosis congénita, no para un diagnóstico de la fase aguda en forma preventiva (Machado et al., 2010). También se ha estandarizado la técnica de Western blot en modelo murino para la detección de IgM e IgG utilizando antígeno total lisado (Romero 2016). El uso del antígeno total lisado (TLA) de *Toxoplasma gondii* para esta técnica puede dar como resultado bandas para el efectivo diagnóstico de la infección; sin embargo, se ha observado que antígeno puede ocasionar reacciones cruzadas y no es muy eficiente para detectar la fase aguda (González et al., 2018).

El objetivo del presente proyecto es obtener los antígenos excretorios/secretorios y antígenos de membrana de *Toxoplasma gondii* para enfrentarlos, utilizando la técnica de Western blot, con sueros de ratones infectados, sueros de pacientes inmunocompetentes y sueros de pacientes VIH positivos, con el fin de obtener una prueba confirmatoria de la fase aguda de la infección por toxoplasmosis, al analizar y comparar el patrón de bandas inmunoreactivas de la fase crónica y fase aguda.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Agente etiológico

La toxoplasmosis es causada por el parásito protozoario *Toxoplasma gondii*. Fueron Nicolle y Manceaux quienes en 1908 describieron por primera vez al protozoario (Nicolle & Manceaux, 1908), quienes lo aislaron a partir de células mononucleares del hígado y bazo de *Ctenodactylus gundi*, una especie de roedor perteneciente a la familia Ctenodactylidae procedente de África. En un primer momento fue considerado una especie más de *Leishmania*; sin embargo, un año más tarde, se concluyó que se trataba de otra especie y debido a su forma arqueada (del griego toxon = arcos) y al nombre de la especie del hospedero donde fue encontrado, decidieron denominarlo *Toxoplasma gondii* (Dubey, 2016). Su clasificación taxonómica fue aceptada en el año 1973, muchos años después de su descubrimiento, siendo esta la siguiente (Grandia et al., 2013): Phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidiida, suborden Eimeriina, familia Sarcocystidae, género *Toxoplasma*, especie *Toxoplasma gondii*

### 2.2 Biología del parásito *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* puede presentar diferentes conformaciones celulares dependiendo de la etapa de su ciclo celular en el que esté: ooquiste, taquizoíto, bradizoíto, esporozoíto y quiste tisular, los cuales tienen importancia en la transmisión, mecanismos de invasión y desarrollo de la enfermedad ocasionada por este microorganismo (Dubey et al., 1998).

#### 2.2.1 Estructuras celulares

##### 2.2.1.1 Apicoplasto

El apicoplasto es la organela producto de la endosimbiosis primitiva secundaria en donde una célula eucariota primitiva fue engullida y secuestrada por una célula eucariota profotosintética. La organela está compuesta de 4 membranas, las dos membranas internas son propias del endosimbionte primario, la tercera membrana pertenece a un endosimbionte secundario y la cuarta y última membrana externa está relacionada con el sistema endomembranoso del huésped primitivo. Es esencial para la supervivencia del parásito, presenta su propio genoma el cual consta de un ADN circular de 35 kb, y codifica una cantidad limitada de proteínas las cuales son sintetizadas en ribosomas citoplasmáticos, también participa en la síntesis de lípidos (McFadden et al., 1996; Roos et al., 1999).

##### 2.2.1.2 Citoesqueleto

El citoesqueleto de *Toxoplasma gondii* es altamente dinámico y complejo, para permitirle no solamente la motilidad, sino también la invasión a la célula hospedera. Se compone del complejo apical, que a su vez está constituido por el conoide, los anillos polares y pre conoidales y dos microtúbulos cortos centrales; microtúbulos; el anillo polar posterior; la

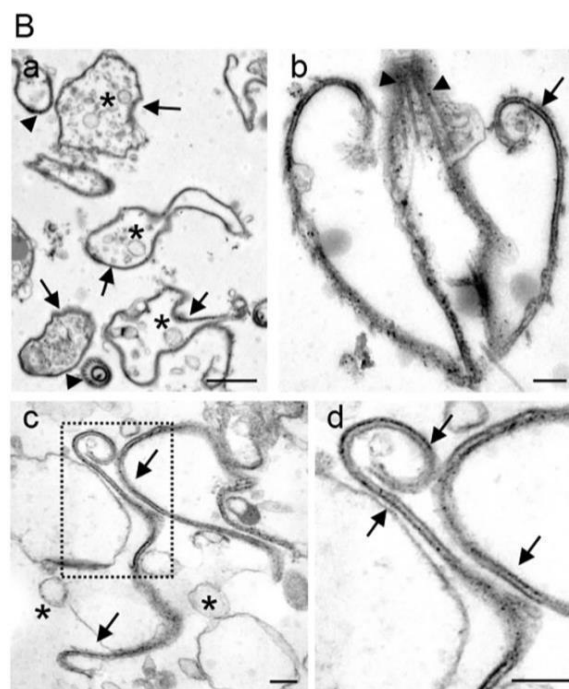


red de citoesqueleto compuesta de filamentos entrelazados y el complejo membranal interno, el cual está debajo de la membrana plasmática y se compone de vesículas aplanadas y rectangulares unidas entre sí (Nichols & Chiappino, 1987; Galván & Mondragón, 2017)

### 2.2.1.3 Complejo de membrana interno

Se conoce como película de *Toxoplasma gondii* a la estructura compuesta de tres membranas que se encuentra en todos los parásitos apicomplejos y está conformada por la membrana plasmática y el complejo de membrana interna (IMC). El IMC es un complejo de doble membrana que está dispuesto en vesículas aplanadas conocidas como alvéolos (Figura N° 1) y están alrededor de todo el parásito, desde la región citosólica, estos alvéolos se conforman de microtúbulos formándose desde el anillo apical. Una de las funciones del IMC es conservar la integridad estructural de toda la película, siendo las proteínas IMC 7, IMC 12 e IMC 14 importantes para esta labor, y además son los componentes más abundantes de la película. Otra función importante que se le atribuye al IMC es servir como un espacio para el almacenamiento de calcio, pero también es usada por las estructuras llamadas glideosomas como una plataforma para la motilidad, y también se a visto que es importante durante el ensamblaje de los parásitos durante su replicación (Cruz et al., 2021).

Las proteínas IMC están provistas de repeticiones de alveolina EKIVEVP, EVVR y VPV, las cuales están conformadas por regiones que contienen a los aminoácidos valina y prolina en gran cantidad, actualmente se conocen 14 proteínas del complejo interno de membrana (IMC) que se encuentran distribuidas también en el citoesqueleto del parásito y juegan un papel importante durante el ciclo celular de *Toxoplasma gondii* (Anderson et al., 2011).



**Figura N° 1.** Imágenes captadas por microscopía electrónica de transmisión. Se observan las muestras obtenidas luego de aislar la fracción de película de *Toxoplasma*

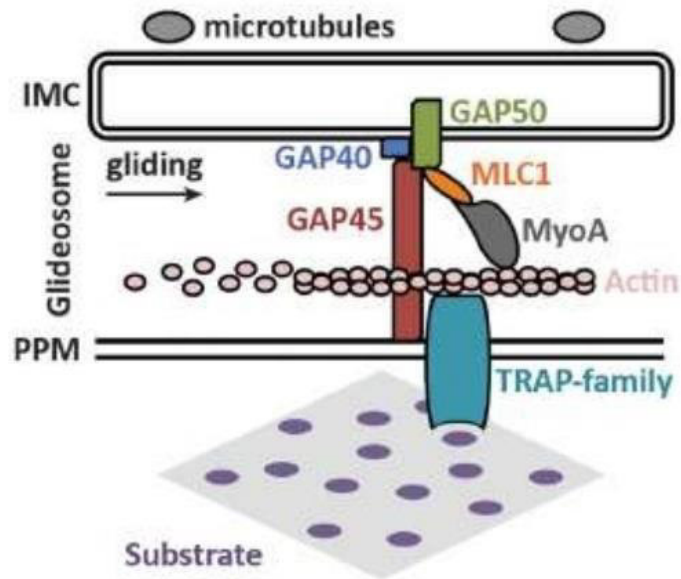
*gondii*, las flechas señalan las vesículas grandes y los asteriscos las pequeñas, ambas derivadas de la película (Cruz et al., 2021).

#### **2.2.1.4 Glideosoma**

El glideosoma es un complejo macromolecular que hace posible la motilidad del parásito, este complejo está compuesto por proteínas de adhesión que son secretadas desde la parte apical del parásito pero que se unen a los receptores de la membrana celular; de esta manera el parásito es capaz de impulsarse y poder translocar las uniones de proteínas receptor hacía atrás a medida que se desplaza, todo esto mediante el uso del motor actina-miosina que se encuentra unido al complejo de membrana interna (IMC). La energía necesaria para activar el complejo glideosoma está formado por miosina A y actina (Figura N° 2) estas proteínas deben interactuar con las proteínas secretadas para la adhesión, además de la actina y miosina, está la enzima aldolasa que también brinda energía mediante la actividad glicolítica (Souza et al., 2010).

Algunas proteínas que son importantes para mantener la integridad de la película de *Toxoplasma gondii* también son importantes para la actividad motora y estructural del glideosoma, estas proteínas son las GAP (“gliding-associated protein” o “proteínas asociadas al deslizamiento”), las más importantes son las GAP45, GAP50, GAP40, mantienen la integridad de la membrana cuando el parásito se desplaza. Ya que estas proteínas son indispensables para la subsistencia del parásito, y además que algunas de estas proteínas se mantienen altamente conservadas en los apicomplejos, se han señalado para aplicarlas como dianas terapéuticas (Berdión 2015).

Para que el complejo del glideosoma tenga contacto con la superficie o sustrato y el parásito pueda deslizarse, el glideosoma se une a las proteínas TRAP (“thrombospondin-related anonymous protein” o “proteína anónima relacionada con la trombospondina”). Finalmente todas las proteínas que se secretaron desde los orgánulos apicales como gránulos densos (GRA), roptrias (ROP) y micronemas, se van secretando de manera sucesiva, también servirán para la invasión del parásito a la célula huésped (Dubey et al., 1998; Berdión 2015).



**Figura N° 2. Mecanismo macromolecular del glideosoma.** Se observa el mecanismo de movimiento de *T. gondii*, todas las proteínas en conjunto sujetas mediante TRAP al sustrato (Berdión 2015)

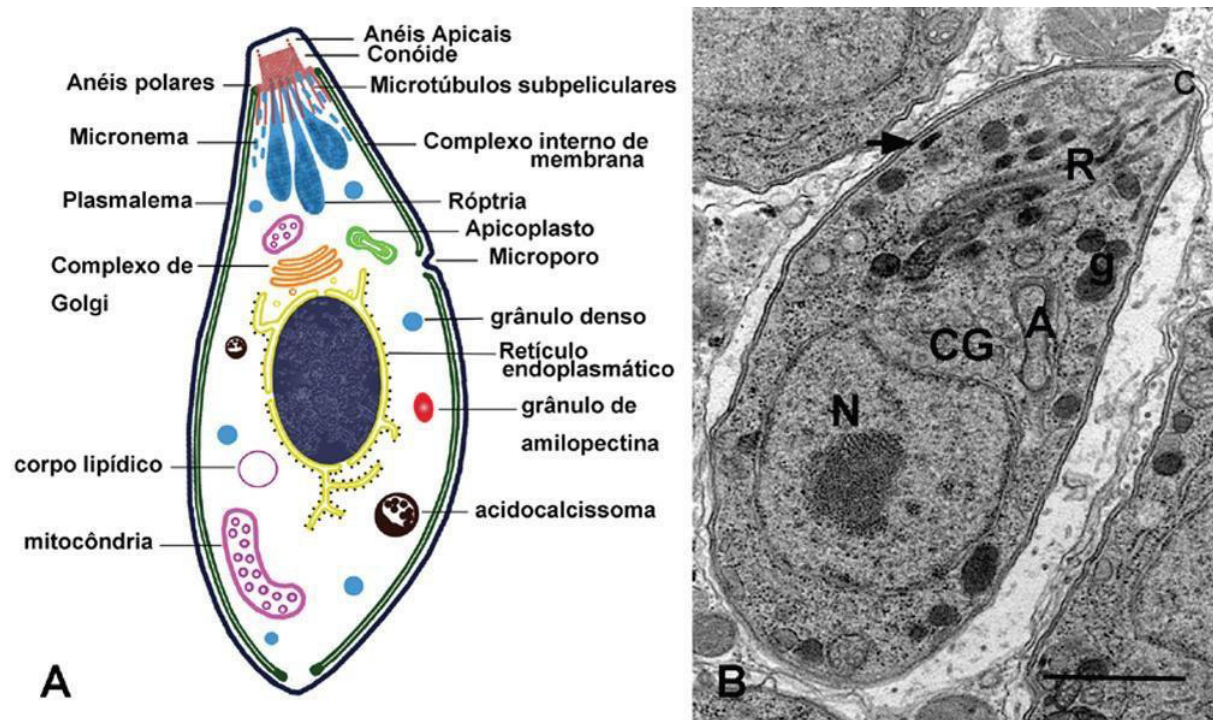
### 2.2.1.5 Red subpelicular

Aparte de los microtúbulos localizados debajo de la película del parásito, existe una red subpelicular debajo del complejo de membrana interna conformado por filamentos de 8 a 10 nm de grosor, que se conectan entre sí. Las proteínas IMC 1 e IMC 2 son dos de las proteínas que forman parte de la estructura de esta red, se las compara con dos proteínas también encontradas en el género *Euglena* de las cuales se comparte 42 % de identidad y 55 % de similitud con dos estructuras de la especie *Euglena gracilis*. La red subpelicular está extendida a lo largo de todo el cuerpo del parásito de manera uniforme y finaliza en el complejo basal, una estructura de forma redonda que se encuentra en el extremo posterior, de donde se han caracterizado proteínas como TgMoRN1, TgCentrin 2 y la cadena ligera dineína (Souza et al., 2010).

### 2.2.1.6 Micronemas

Los micronemas se encuentran en el extremo anterior de parásito (Figura N° 3), son estructuras pequeñas que miden entre 50 nm x 250 nm. El retículo endoplasmático del parásito sintetiza las proteínas que conforman el contenido de los micronemas, estas proteínas se dirigen al retículo endoplasmático gracias a una secuencia de aminoácidos que está en la porción N-terminal. Las proteínas del micronema son glucosiladas al pasar por el aparato de golgi y se les denomina MIC 1, MIC 2, MIC 3 y así sucesivamente. Se conocen 11 proteínas MIC identificadas, estas proteínas se caracterizan en su mayoría por tener dominios adhesivos en gran variedad, algunas como MIC 6, 7, 8 y 9 son similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF), la MIC 3 y 8 son similares a lectinas; también existen las proteínas MIC 2 que son proteínas similares a integrinas y las proteínas MIC 1 y 2 que son

similares a trombospodina, estas similitudes son aprovechadas por el parásito e interaccionan o ayudan a la interacción con las proteínas de las superficie de la célula hospedera (Souza et al., 2010). Una de las funciones de estas proteínas es la de ayudar al parásito en la adhesión a la superficie de célula huésped; por ese motivo, el contenido de los micronemas es liberado mediante un proceso mediado por el catión de calcio divalente, justo cuando el protozooario tiene el primer contacto con la célula hospedera, las proteínas ya liberadas cumplen la función de adhesinas. Otra proteína secretada por el micronema que ayuda en la formación de la unión móvil es el antígeno de membrana apical (AMA 1), esta proteína también es secretada en un inicio, cuando el parásito está ingresando en la célula huésped (Lovett et al., 2002).



**Figura N° 3. Morfología general de la forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.** (A) Representación esquemática. El esquema se construyó a partir de secciones aleatorias del parásito observadas en microscopía electrónica de transmisión. (B) Corte longitudinal donde varias de las estructuras representadas en (A) están marcadas: N - núcleo, c - conoide, R - roptria, A - apicoplasto, CG - complejo de Golgi, g - gránulo denso, flecha - micronema, VP - vacuola parasitófora (Souza et al., 2010).

### 2.2.1.7 Roptrias

En comparación con los micronemas, las roptrias son orgánulos mucho más grandes, en forma de pera, la porción más delgada está conectada al extremo apical del parásito, y la zona más ancha apunta hacia el lado opuesto de la zona apical del parásito (Figura N° 3). Aproximadamente son ocho roptrias que se encuentran en los taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, están rodeadas por una membrana, el interior tiene un pH ácido y dentro están contenidas proteínas básicas llamadas ROPs y RONs. Las proteínas contenidas en las roptrias son sintetizadas en el retículo endoplasmático y presentan una péptido señal de

secuencia YXXfi y LL, la ruta que siguen es pasar por el aparato de Golgi para luego acumularse en las roptrias (Souza et al., 2010). Se han confirmado 29 proteínas ubicadas en las roptrias, 24 de estas han sido localizadas en la porción más ancha que apunta al lado opuesto de la zona apical, estas son llamadas ROPs, las otras 5 proteínas se encuentran en la porción más delgada que está conectada al extremo apical, llamada cuello del orgánulo y las proteínas que se encuentran en esta zona se llaman RONS (Boothroyd y Dubremetz, 2008).

Durante la invasión a la célula huésped, las roptrias secretan su contenido de manera secuencial a las secreción de los micronemas, la secreción de las roptrias consta de algunas proteínas ROPs (ROP 1, 2, 3, 4 y 18) junta con algunas proteínas de gránulos densos (GRA 7). Las proteínas son secretadas en pequeñas vesículas que están ordenadas al interior del citoplasma y del núcleo de la célula previo al ingreso del parásito, y también posterior a la formación de la vacuola parasitófora (Carruthers et al., 1999).

### **2.2.1.8 Gránulos densos**

Los gránulos densos son orgánulos que tienen un aspecto de esfera, tienen alrededor de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro y se encuentran en diferentes espacios del parásito (Figura N° 3). Se ha observado mediante microscopía electrónica de transmisión que la zona del orgánulo es uniformemente electrodensa, lo que indica que la concentración de proteínas es alta, también estudios de cinética de infección de *T. gondii* demuestran que el contenido de los gránulos densos se libera justamente al finalizar la entrada del parásito en las células huésped (Cesbron et al., 2008). De esta manera una de las diferencias con los orgánulos como los micronemas y las roptrias que vacían su contenido durante la adhesión e invasión a la célula huésped, los gránulos densos lo hacen cuando el parásito se encuentra en el espacio intracelular de la célula huésped, esto permite al parásito liberar las proteínas en el momento oportuno para establecer la infección. Otra diferencia es la localización de estos orgánulos al momento de secretar su contenido, ya que las roptrias y micronemas están en la región apical de parásito y desde ahí secretan su contenido en el momento de la adhesión e invasión, mientras que los gránulos densos se localizan en la región lateral y posterior desde donde secreta todo su contenido cuando el parásito ya ingresó (Mercier et al., 2005).

Las proteínas localizadas en los gránulos densos o también llamadas GRA, tienen función de interactuar con las membranas de la red intravacuolar para estabilizarlas, esta función las realiza las GRA2, GRA4 y GRA6. Por otro lado las proteínas GRA3, GRA5, GRA7 y GRA8 se unen a la membrana de la vacuola parasitófora. Las proteínas GRA son usadas por el parásito para formar la red vesiculo-tubular intravacuolar y la membrana de la vacuola parasitófora (MVP), que imposibilita la unión con el lisosoma de la célula huésped, evitando así que el parásito sea afectado por los mecanismos intracelulares de defensa (Chaturvedi et al., 1999).

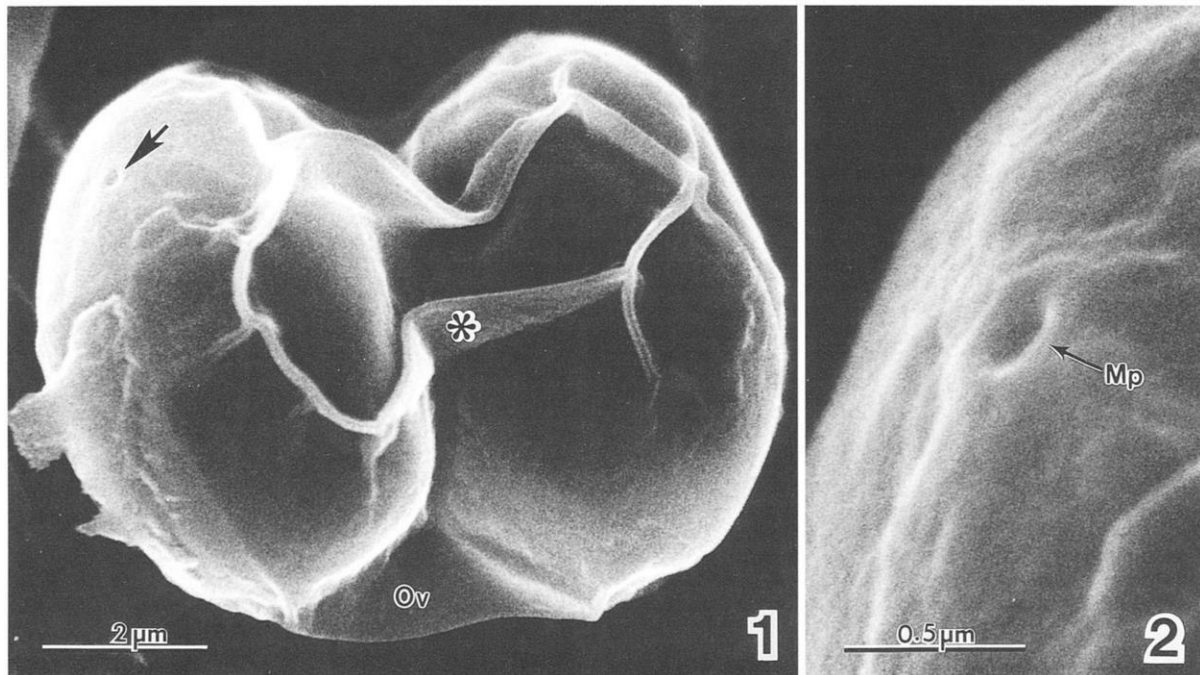
## 2.2.2 Estadíos

### 2.2.2.1 Ooquiste

Para *Toxoplasma gondii* el ooquiste es el estadio parasitario clave en su epidemiología. Tienen una conformación ovoide y un tamaño de aproximadamente de 10 a 12  $\mu\text{m}$ . Los ooquistes son expulsados en las heces de los felinos al medio ambiente, pero como ooquistes inmaduros no esporulados, luego, cuando maduran o esporulan, estos originan ooquistes con 2 esporoquistes, y cada esporoquiste está conformado por 4 esporozoítos, es decir, cada ooquiste cuenta con 8 esporozoítos infecciosos (Speer et al., 1998). Los ooquistes que eliminaron los felinos luego de haberse infectado con cualquiera de los tres estadíos infecciosos (taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos) pueden mantenerse viables hasta 18 meses después; sin embargo depende mucho de las condiciones ambientales como la humedad (Ferguson et al., 1975).

Los ooquistes están cubiertos por un velo delgado electrolúcido reticulado y una interna ligeramente electrodensa. Otros estudios han sugerido la existencia de 5 capas en la pared del ooquiste, sin embargo, esto parece estar determinado por la etapa de maduración del mismo ooquiste (Galván y Mondragón, 2017). Así mismo, en la superficie de la pared del ooquiste se ubica un micrópilo, el cual es un hundimiento discoide conformado por tres capas, las cuales son continuas con las otras 3 capas que pertenecen al resto de la pared del ooquiste. La capa del medio presenta forma de copa y es gruesa, en comparación a la capa interna y externa las cuales son delgadas (Speer et al., 1998).

Actualmente, se desconocen las funciones biológicas que podría realizar el micropilo; sin embargo, se ha visto que en el proceso de la ruptura del ooquiste causada por enzimas digestivas, la estructura del micrópilo se ve afectada, permitiendo la liberación de los estadios infecciosos. Se ha visto conformaciones parecidas a suturas también en la superficie de los ooquistes y que, durante el proceso de exquistación (ruptura de la superficie del ooquiste por enzimas digestivas), acontece una separación entre estas suturas con la capa interna. Los ooquistes pueden dejar de ser viables si son expuestos a tintura concentrada de yodo a 7 % o a yoduro de potasio 5 %, a exposición a amoníaco (28 %) y en agua en ebullición (Dubey et al., 1998; Galván y Mondragón, 2017).



**Figura N° 4. Micrografías electrónicas de barrido de ooquistes de *T. gondii*.** 1. Ooquiste que muestra el velo del ooquiste (Ov) y la pared (\*) que se han derrumbado alrededor de los 2 esporoquistes. El micropilo (flecha) aparece como una depresión en el ooquiste; X 23000. 2. Gran aumento del micropilo (Mp) que se muestra en la Figura N° 1; X 100000 (Speer et al., 1998).

### 2.2.2.2 Taquizoíto

El taquizoíto o también conocido como trofozoito, es el estadio infeccioso asexual del parásito, tiene forma de media luna y un tamaño aproximado de 2 x 6  $\mu\text{m}$ , con un extremo anterior o apical puntiagudo, y el extremo posterior de forma redondeada. Esta forma del parásito se compone de organelas como núcleo, aparato de Golgi, una sola mitocondria, retículo endoplasmático liso y rugoso, ribosomas, apicoplasto, también se compone de cuerpos de inclusión y citoesqueleto. También tiene un conjunto de organelas situadas en el extremo apical las cuales tienen una distribución polarizada, estas son roptrías, conoide, micronemos y, gránulos densos, lo cuales tienen gran relevancia y participación en la secreción, invasión celular y motilidad del parásito (Kasper 1989; Dubey 2016).

Los taquizoítos pueden secretar productos de su metabolismo, moverse, y evadir la respuesta inmune del hospedero debido a la estructura del películo, la cual está conformada por la membrana plasmática y el complejo membranal interno, esta última consiste en un grupo de vesículas aplanadas (Russell y Sinden, 1981).

Acerca de las organelas secretoras, los taquizoítos pueden secretar componentes a partir de distintas organelas como los micronemas, gránulos densos y roptrías; esto puede ocurrir durante la proliferación en una vacuola parasitófora o durante la invasión a la célula hospedera (Dubey 2016).

Otra estructura importante en los taquizoitos son las roptrias, las cuales tienen forma de sacos alargados que acaban en el extremo apical del taquizoito, en forma de delgados tubos que llegan hasta el conoide. El cuello de las roptrias, ubicado en el extremo anterior, es electrodenso, mientras que la parte posterior, también llamada bulbo presenta partes vesiculares. El contenido secretado de las roptrias contiene la maquinaria enzimática necesaria para controlar algunas funciones del huésped, y también para facilitar la penetración a la célula, entre las proteínas que son secretadas por las roptrias, un grupo de quinasas genera mayor interés debido a que podrían tener un efecto importante en la expresión génica del huésped (Boothroyd y Dubremetz, 2008). Las roptrias incluyen lípidos y también proteínas en su estructura, proteínas importantes como RONS y ROPs, las cuales provienen del cuello y del bulbo, respectivamente. Acerca de las proteínas RONS, cumplen un rol importante en el ensamblaje de la unión móvil, la cual es una unión momentánea entre la membrana plasmática del parásito y la célula huésped, esta unión móvil es de suma importancia a lo largo de la primera fase de la invasión activa del parásito, y de igual modo importante para la formación de la vacuola parasitófora (VP). Las proteínas ROP intervienen en el transcurso de la infección, dirigiéndose a distintos blancos dentro de la célula huésped (Bradley y Sibley 2007; Chang et al., 2015).

Un factor importante que se ha identificado como factor estimulante de la penetración (PEF), cumple un rol importante en la actividad enzimática de los parásitos toxoplasmáticos para lisar la célula huésped (Lycke & Norrby, 1966). Se presume que el PEF se estaría produciendo a partir de las roptrias, y que junto con ROP-1 y, en conjunto con otras moléculas, podrían estar involucradas en la estimulación de la penetración en la célula blanco, sin embargo, aún no se conoce del todo la secuencia peptídica de ROP-1 y tampoco se han evidenciado actividades proteolíticas que puedan dar a concluir la actividad en conjunto con el PEF (Lycke et al., 1975).

Los taquizoitos también presentan micronemas en su extremo apical los micronemas, las cuales son estructuras de 30 nm de diámetro aproximadamente. Los micronemas contienen en su interior proteínas llamadas MIC, que se asocian entre sí en la superficie del taquizoitos para formar complejos, estas proteínas son secretadas mediante un proceso dependiente de calcio, y son cruciales en el proceso de adhesión e invasión a la célula huésped. Se han descrito algunos de estos complejos como TgMIC1/MIC4/MIC6, y de estos, los componentes TgMIC1 y TgMIC4 tienen dominios adhesivos y son importantes para la virulencia del parásito (Mendonça y Roque 2014). Las proteínas MIC estarían siendo exocitadas hacia la superficie del taquizoito y trasladadas por un movimiento fundamentado en actina desde el extremo anterior hacia el posterior y posteriormente siendo expulsadas a través de un proceso de *capping* (Rugarabamu et al., 2015).





**Figura N° 5. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de un taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.** Se observan en la micrografía: Apicoplasto (Ap), micronemas (Mn), roptrias (Rop), conoide (C), gránulos densos (Gd), núcleo (N), mitocondria (M). Escala= 1  $\mu$ m. Extraído y modificado de Galván y Mondragón, 2017.

Los gránulos densos en los taquizoitos son estructuras en forma de esferas, envueltos por una sola membrana, de un tamaño de aproximadamente 200 nm de diámetro, y están localizados a lo largo de todo el cuerpo del parásito. Los gránulos densos son designados con la abreviatura GRA, y se conocen más de 25 proteínas las cuales se catalogan como GRA 1, GRA2, GRA3, etc. Se ha estudiado que las proteínas GRA6 y GRA10 presentan alta inmunogenicidad y GRA1 y GRA2 son importantes en la virulencia y en la inducción de la respuesta inmune, por lo cual han sido estudiadas como candidatos para vacunas (Rezaei et al., 2019).

### 2.2.2.3 Bradizoito y esporozoitos

Los bradizoitos, esporozoitos y taquizoitos no difieren en cuanto a estructura, son muy similares, todos presentan sistemas Golgi, Retículo endoplasmático, apicoplastos y cantidad similar de roptrías, sin embargo, hay algunos organelos y cuerpos de inclusión que están presentes o sobreexpresados solamente en algunos estadios. Los micronemos por ejemplo, están en menor cantidad en taquizoitos, en los esporozoitos en cantidad intermedia, pero en los bradizoitos existe un alto número de micronemos (Galván y Mondragón, 2017). Los bradizoitos tienen menor cantidad de gránulos densos a comparación de los taquizoitos y esporozoitos. Los esporozoitos y bradizoitos tienen gránulos de amilopectina, de gran tamaño y en gran cantidad, mientras que en taquizoitos estos son mínimos o ausentes (Speer et al., 1998).

### 2.2.2.4 Quistes tisulares

Los quistes tisulares son la forma persistente del parásito, pueden estar en los tejidos del hospedero durante toda su vida. Tienen un tamaño aproximado de 10-100  $\mu\text{m}$  y están repletos de miles de bradizoitos. Son resistentes a la respuesta inmune del hospedero, resisten los procesos gastrointestinales y son infecciosos, lo que promueve fácilmente su transmisión por carne mal cocida (Sullivan et al., 2009).

Los quistes tisulares pueden estar presentes en tejidos musculares o en tejidos neuronales, encontrándose en cerebro, ojos y músculos esquelético y cardiaco, de igual manera pueden estar presentes en órganos viscerales como riñones, hígado y pulmones (Dubey, 2016).

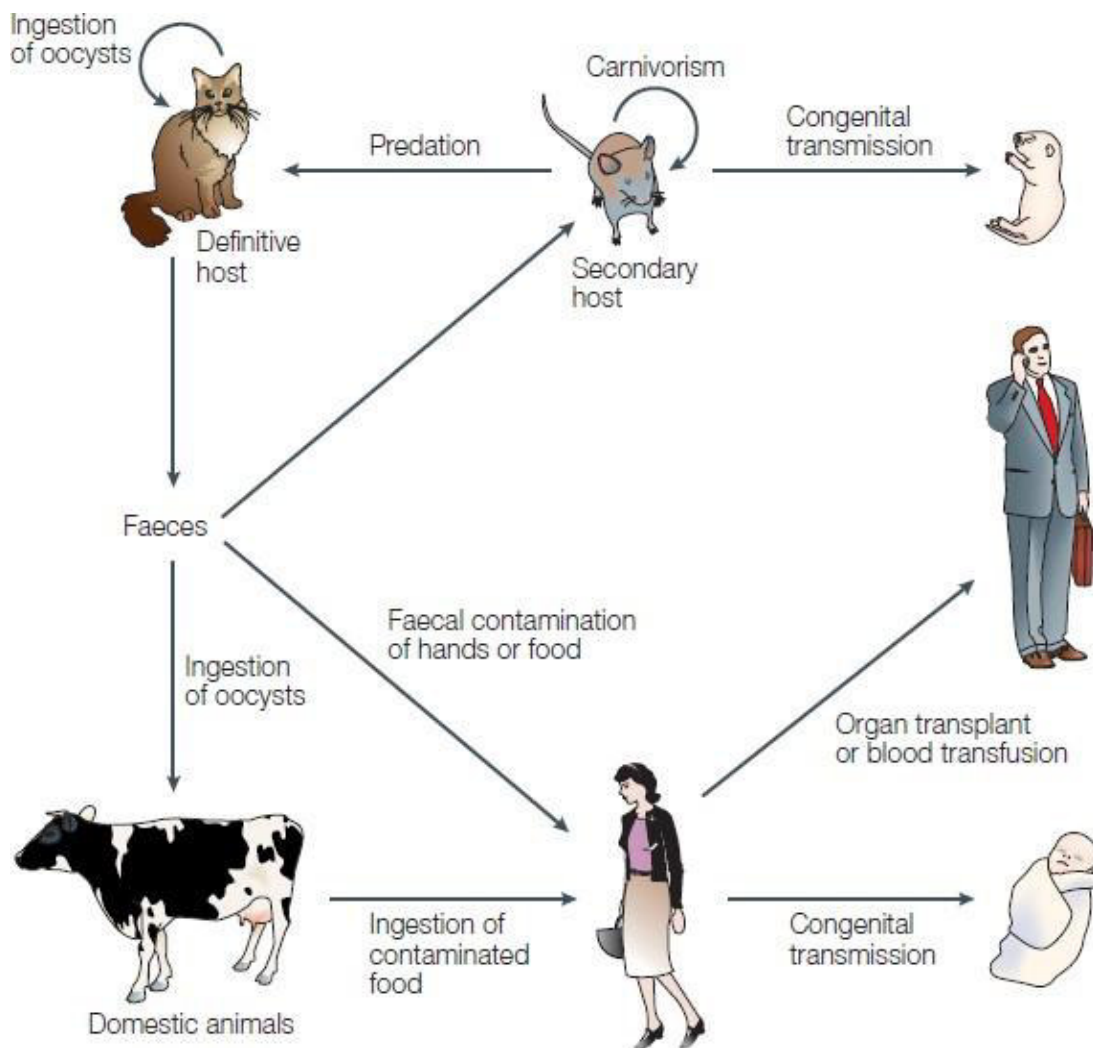
## 2.3 Ciclo biológico

Los protozoarios pueden reproducirse de manera sexual y asexual, aunque ciertas especies pueden utilizar ambas de forma alternada o simplemente emplear las dos dependiendo de las condiciones que enfrente el parásito. La reproducción sexual de estos parásitos se lleva a cabo en el epitelio intestinal de los felinos ya sean domésticos o silvestres, luego se da la eliminación de ooquistes por breves periodos de tiempo después de la infección inicial, estos ooquistes aún necesitan permanecer entre 48 a 72 horas en el medio ambiente para esporular y de esta forma convertirse en ooquistes infecciosos (Ordoñez y Maza, 2019).

En *Toxoplasma gondii* el hospedero definitivo puede ser algún espécimen de la familia Felidae, solamente en ellos se produce el estadio Ooquiste, que llevan los esporozoitos, la forma sexual de *T. gondii*, por lo tanto los felinos son los principales reservorios de infección. Los gatos se infectan con el parásito por depredación, al cazar roedores que albergan quistes tisulares localizadas en el cerebro u otros órganos, estos quistes tisulares están llenos de miles de bradizoitos producidos asexualmente, los cuales a su vez fueron taquizoitos que, ante la respuesta inmune del huésped, cambiaron su morfología a bradizoitos. Una vez que el gato ingiere los quistes tisulares, estos se liberan en el intestino delgado e invaden las células, se reproducen asexualmente, y luego sexualmente, formando los ooquistes los cuales se expulsan junto con las excretas, estos ooquistes son liberados por

los gatos sólo por 1 o 2 semanas, aunque la cantidad que liberan es enorme. Los ooquistes liberados pueden tardar hasta cinco días en volverse infecciosos (esporular), como resultado se forman dos esporoquistes, conteniendo cada uno de ellos cuatro esporozoitos, pueden llegar a ser altamente resistentes, soportar bajas temperaturas, ausencia de agua, desinfectantes y sobrevivir durante meses, pero se a observado que pueden morir a la temperatura de 70 °C expuestos durante 10 minutos (Aliberti 2005).

Animales domésticos y también roedores son los hospederos intermediarios (Figura N° 6), que pueden infectarse con los ooquistes expulsados por el felino, formando quistes tisulares en ellos y en los roedores habiendo transmisión congénita e infección por carnivorismo. Los humanos, también hospederos intermediarios, pueden infectarse ingiriendo los ooquistes expulsados por los felinos mediante contaminación fecal de manos o contaminación fecal en comidas y aguas, también ocurre la contaminación mediante la ingesta de quistes tisulares cuando el alimento es carne de ganado que fueron infectadas por ooquistes. Durante la fase aguda es posible la infección por transfusión de sangre y la transmisión congénita, debido a la presencia del estadio taquizoíto en sangre durante esta fase de la infección (Aliberti 2005; Grandía et al., 2013).



**Figura N° 6. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.** Extraído y modificado de Aliberti 2005

### **2.3.1 Fase sexual**

Como ya se ha mencionado, la fase sexual solamente ocurre en felinos por la ingesta de quistes tisulares que se encuentran, por ejemplo en ratones, pero también, con menos frecuencia, por ooquistes esporulados. Cuando el parásito resistente a los ácidos estomacales llega al intestino, se liberan los esporozoitos si el felino consumió ooquistes, si consumió un quiste tisular lo que se liberan son los bradizoitos. Ya sean esporozoitos o bradizoitos, ambos llegan al intestino delgado y penetran las células epiteliales en donde comienzan a reproducirse asexualmente, luego de 2 a 15 días empieza la fase sexual, la formación de gametos (Raiden et al., 2013).

Durante la gametogonia, se da la formación del gameto masculino llamado microgameto y del gameto femenino llamado macrogameto. El microgameto penetra al macrogameto y se forma el cigoto, dando lugar al ooquiste. Los ooquistes se dirigen hacia el lumen del intestino y son liberados en las heces del hospedero definitivo, el cual llega a liberar alrededor de un millón de ooquistes no esporulados por día, sin embargo no lo hará durante toda su vida, los felinos solamente liberarán ooquistes durante 15 a 21 días aproximadamente y no volverán a hacerlo el resto de su vida, siempre y cuando se mantengan inmunocompetentes. Para que los ooquistes puedan lograr infectar a otro hospedero, es necesario que pasen por una fase llamada esporogónica, con la finalidad de que esporulen y sean infectivos, para esto los ooquistes necesitan ciertos factores ambientales, como la humedad correcta y temperatura cálida, cuando se cumplen estas condiciones los ooquistes tardan en esporular hasta 5 días después y logran mantenerse infectivos durante meses ya que son muy resistentes cuando las condiciones ambientales son adversas (Esteves et al., 2011).

### **2.3.2 Fase asexual**

Cuando un hospedero intermediario consume ooquistes esporulados o quistes tisulares, estos llegan al aparato digestivo, donde, por acción enzimática, son destruidos y liberan esporozoitos que, al llegar al intestino delgado e invadir las células epiteliales, se diferencian en taquizoitos, los cuales son de replicación rápida e invaden monocitos, transportándose vía sanguínea para llegar los tejidos en donde los taquizoitos comenzarán a diferenciarse en su estadio de replicación lenta o bradizoitos y posteriormente estos formarán los quistes tisulares. Cuando se trata de quistes tisulares consumidos por algún hospedero intermediario, de la misma manera, son destruidos por la acción de los jugos gástricos liberando en el intestino delgado en este caso a los bradizoitos que invaden las células epiteliales, se diferencian en taquizoitos y estos comenzarán el ciclo hasta llegar a formar quistes tisulares (Salazar 2017).

## 2.4 Fases de la Toxoplasmosis

Al igual que muchos parásitos que cambian su morfología para evadir el sistema inmune o para regular la respuesta inmune del hospedero expresando distintas proteínas que intervienen en diferentes vías, *Toxoplasma gondii* exhibe 3 distintas etapas en las cuales cambia su morfología, dependiendo de la fase en la que se encuentre la infección, pueden ser taquizoitos, bradizoitos (dentro de los quistes tisulares) y esporozoitos (se encuentran en los ooquistes), pero el parásito no sólo muestra una diferente morfología, sino que también cambian las proteínas que expresan en su superficie por ejemplo, esta diferencia se hace más evidente cuando el parásito se encuentra en la etapa de replicación rápida, llamadas taquizoitos (Béla et al., 2008).

### 2.4.1 Fase aguda

En general se le considera como fase aguda a una infección parasitaria desde la inoculación del parásito hasta aproximadamente 1 a 2 meses después. Durante esta fase, el parásito se encuentra en replicación rápida, y se le conoce como taquizoito, replicándose en cualquier célula del huésped que sea nucleada, también células dendríticas y macrófagos. Los taquizoitos muestran en su superficie proteínas que están ancladas a glicosilfosfatidilinositol (Anclaje GPI); casi todas se encuentran dentro de las familias de las proteínas de superficie 1 (SAG1) o también SAG2, estos antígenos han sido estudiados y se ha visto que juegan un papel importante en la invasión de la célula huésped, en la regulación de inmunidad y atenuación de la virulencia (Béla et al., 2008).

En algunos animales como es en el caso de las ratas, la fase aguda termina a los pocos días de la infección, algunos estudios consideraron como fase aguda a las ratas que fueron cinco y diez días post infectadas, como es el caso de las ratas Wistar, en donde se evaluó la actividad de colinesterasa durante de la fase aguda de la infección por *Toxoplasma gondii* durante la fase aguda (Tonin et al. 2013). También fueron usadas ratas Sprague dawley, infectadas con  $\geq 10^4$  taquizoitos de la cepa RH en donde se detectaron anticuerpos a los 3 a 5 días post infección y llegando a un pico máximo de 1:4000 y 1:16000 aproximadamente a los 9 días, lo cual corresponde a una fase aguda; las ratas en general se muestran muy resistentes frente a la infección por toxoplasmosis, sin mostrar síntoma alguno durante la fase aguda (Lunde y Jacobs, 1963).

En el hospedero humano la toxoplasmosis aguda se caracteriza por síntomas como fiebre prolongada, inflamación de los ganglios (linfadenopatías), erupciones en la piel (exantema), dolor de faringe posterior, pero no hay un compromiso sistémico. Si los pacientes son inmunocompetentes, la infección aguda no causa mayores problemas, y sin tratamiento logran superar la infección, sin embargo, permanecerán infectados de por vida, lo que se conoce como fase crónica (Pino et al., 2009). Si la infección ocurre durante la gestación (fase aguda), el resultado sería la transmisión vertical del parásito, lo cual es perjudicial para el neonato ya que la infección puede ocasionar hidrocefalia, microcefalia, coriorretinitis, calcificaciones intracerebrales o aborto espontáneo. También puede presentarse retraso en

el desarrollo neuropsicomotor, pérdida auditiva neurosensorial y otros síntomas y signos que pueden manifestarse luego de años desde la concepción (Rorman et al., 2006)

#### **2.4.2 Fase crónica**

La fase crónica es la fase en donde el parásito pasa a una etapa de replicación lenta, en donde cambia su morfología a lo que se conoce como bradizoito, este cambio de taquizoito a bradizoito es causada probablemente por la respuesta inmune del hospedero. Miles de bradizoitos están agrupados en los quistes tisulares, los cuales se pueden alojar en diferentes órganos y en tejidos musculares en donde se enquistan y pueden persistir durante toda la vida del hospedero. La cepa Me49 de *T. gondii*, durante la infección crónica, llega a afectar el cerebro en ratones, los quistes se alojan en él produciendo lesiones inflamatorias graves, inflamación meningovascular provocando infiltración linfoplasmocitaria en las meninges, también puede afectar el bazo, produciendo agotamiento linfocitario, acumulación de fagocitos y células plasmáticas y hemorragia (Zoghroban et al., 2023). En ratas puede suceder lo mismo, dependiendo de la cepa del parásito, pues hay algunas que han perdido la capacidad de formar quistes además de que las ratas son bastante resistentes a la infección y en algunos casos la infección no logra establecerse del todo; sin embargo, el título de anticuerpos es importante cuando se quiere diagnosticar la fase crónica, las ratas albinas Wistar infectadas con la cepa RH tipo I muestran altos títulos de anticuerpos ( $\geq 1:320$ ) durante meses luego de la infección, aún cuando fueron negativas para PCR anidada y tampoco se encontraron quistes tisulares en cerebro, lengua ni tejidos diafragmáticos, esto demuestra que algunas cepas RH han perdido la capacidad de formar quistes tisulares, y que la serología juega un papel importante (Asgari et al., 2013)

En humanos, durante la fase crónica de la infección, luego de aproximadamente 1 a 2 meses después del contacto inicial con el parásito, la infección no progresa y en muchos casos es asintomática. Si la infección ocurrió tiempo atrás, con la fase crónica ya establecida, los quistes tisulares en el hospedero llenos de bradizoitos de replicación lenta pueden reactivarse y convertirse nuevamente en la forma de replicación rápida conocida como taquizoito, esta reactivación sucedería si el paciente es inmunodeficiente o inmunosuprimido; por ejemplo, en pacientes con SIDA, pacientes trasplantados que reciben inmunosupresores o también pacientes que reciben tratamiento contra el cáncer, desencadenando afecciones como encefalitis agudas, abscesos cerebrales, convulsiones, puede dejar secuelas como hemiparesia e incluso podría causar la muerte (Dupont et al., 2012). Últimas investigaciones también han demostrado una relación entre la disminución de la fertilidad en hombres y mujeres con una infección latente; en algunos pacientes también los trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, trastorno obsesivo-compulsivo, bipolaridad, ansiedad y parkinson se le atribuyó a la toxoplasmosis en fase crónica (El sharazly et al., 2023).

## 2.5 Cepas

Las cepas de *T. gondii* difieren en virulencia, distribución o preferencias por ciertas especies, capacidad para la formación de quistes y otras características que pueden ser observadas en cultivo celular. Según el genoma de *T. gondii* se conocen tres cepas clonotípicas (Tipo I, II y III). En el tipo I se encuentra la cepa RH, la cual es considerada la más virulenta y es letal en ratones de la cepa BALB/c, cuando se han infectado con taquizoitos vía intraperitoneal. La cepa RH también se caracteriza por su rápido crecimiento *in vitro* y por su motilidad, además se ha observado que no forman quistes (Khan et al., 2011).

En el genotipo II están las cepas Me49 y 76K, las cuales se consideran como cepas avirulentas o se dice que son cepas de virulencia intermedia pero que sí provocan una fuerte respuesta inflamatoria, además la cepa Me49 puede formar quistes con facilidad. Los ratones pueden sobrevivir cuando son infectados con alguna de estas cepas. El genotipo III comprende las cepas VEG y NED, son de virulencia baja y pueden formar quistes en animales. Los genotipos II y III son bastante usados *in vitro* para estudiar el cambio del parásito de taquizoito a su estadio de reproducción lenta o bradizoito, y así formar quistes (Mercier et al., 2011).

## 2.6 Respuesta inmune a *Toxoplasma gondii*

La respuesta inmunitaria compleja y protectora contra *T. gondii* y otros parásitos intracelulares implica la interacción de la inmunidad innata, la inmunidad humoral y la inmunidad celular adquirida, las cuales se enfocan en diferentes etapas del parásito. La producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T CD4+ y CD8+ es esencial para una respuesta inmunitaria adaptativa efectiva. Además, los anticuerpos desempeñan un papel importante en la defensa, en colaboración con las células T. La respuesta inmune impele al parásito al estrés y la eliminación por completo de este; sin embargo, en algunos pacientes, el estrés provocado por la respuesta inmune obliga al parásito a pasar al estadio de replicación lenta bradizoito y a la posterior formación de quistes lo que se traduce como una fase crónica (Sasai y Yamamoto, 2019)

### 2.6.1 Respuesta inmune innata

Al inicio de la infección, fase aguda, la respuesta innata del huésped es la primera línea de defensa del huésped contra *T. gondii*, los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) son los primeros en reconocer al patógeno, estos pueden ser receptores tipo Toll, lectinas tipo C y receptores tipo NOD. Cuando los PRR reconocen algún componente del parásito se activa la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 12 (IL-12), las cuales cumplen un rol importante en las demás respuestas inmunes posteriores (Berdión 2015). El reconocimiento del parásito por parte del sistema inmune es el primer paso y la posterior producción de IL-12 por neutrófilos y monocitos es crucial; en ratones el reconocimiento se da por los receptores tipo *Toll* (*Toll Like Receptor* o TLR) las cuales son una familia de 10 a

13 proteínas pertenecientes al sistema inmune innato que se encuentran en humanos y ratones, cuya función es reconocer componentes derivados de patógenos y actuar de forma inmediata en la detección de patógenos, en ratones el receptor TLR 11 y el TLR 12 reconocen proteínas derivadas de *T. gondii* parecidas a profilinas que el parásito usa para la invasión a la célula huésped, pero en humanos el receptor TLR 11 no es funcional y el receptor TLR 12 no se encuentra en el genoma humano, sin embargo, ambas se expresan en los compartimentos endosómicos ubicados en el citosol, al igual que los receptores TLR 3, TLR 7, TLR 8, TLR 9 en humanos, aunque estos receptores reconocen ácidos nucleicos, se presume que serían estimulados por el ácido nucleico de *T. gondii* y así cumplirían la función que realizan los receptores TLR 11 y TLR 12 en ratones. Luego de darse el reconocimiento del parásito por los TLRs, se inicia la producción de IL-12 (Dupont et al., 2012).

La IL-12 también puede ser producida por células dendríticas, cuando sus correceptores CCR5 reconocen la ciclofilina-18 (C-18), la cual es una proteína propil isomerasa secretada por *T. gondii*. La importancia de la IL-12 radica en que activa las células *Natural Killer* (NK), células T CD4+ y T CD8+ las cuales producen interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) el cual será el mediador principal para iniciar la comunicación con los macrófagos. El IFN- $\gamma$  actúa sobre los macrófagos activándolos, haciendo que estos tengan la capacidad de fagocitar y destruir los taquizoítos que estén presentes solamente en el medio extracelular, ya que no son efectivos contra la forma intracelular del parásito. Se ha observado que la presencia de IFN- $\gamma$  y su acción induce al parásito a diferenciarse de taquizoítos a bradizoítos, esto en el espacio intracelular se traduce a que la vacuola parasitófora, producida durante la invasión celular, se convierta en un quiste tisular. El IFN- $\gamma$  también provoca que los macrófagos produzcan el factor de necrosis tumoral (TNF) y junto con IFN- $\gamma$ , ambas inducen a los macrófagos a la producción de ROS y RNS (Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) las cuales actúan sobre el parásito causándole la muerte (Aliberti 2005; Sasai y Yamamoto, 2019).

### **2.6.2 Respuesta inmune adaptativa**

La activación del sistema inmune y la posterior activación de las células dendríticas deja como resultado la producción de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ . En ratones, la respuesta inmune ante *T. gondii* es altamente dependiente de IL-12 cuando se da la presencia simultánea de IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ ; de esta manera los ratones están protegidos eficazmente contra la infección. Las células T CD4+, T CD8+ citotóxicas y NK que proliferaron en la respuesta innata gracias a la producción de IL-12 por parte de macrófagos y células dendríticas, producen IFN- $\gamma$  en alta concentración, pero de las tres, las células NK son las que producen un valor importante de IFN- $\gamma$ , debido a la estimulación por IL-12 producida por las células dendríticas CD8+ $\alpha$  cuando migran al lugar de invasión del parásito. La importancia de la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK se ha estudiado en ratones recombinantes carentes de linfocitos B y T que fueron infectados con *T. gondii* y tratados con IL-12 con la finalidad de aumentar la producción de IFN- $\gamma$  por parte de NK, independientemente de los linfocitos, logrando aumentar la resistencia a la infección por el parásito durante la fase aguda (Aliberti 2005). Por otro lado, cuando se observa una



respuesta inmune ausente de INF- $\gamma$ , y por lo tanto carente de células T CD8+ y NK, la resistencia a la infección en fase aguda se ve afectada, y los ratones quedan más susceptibles (Hunter et al., 1994). También están involucradas enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) la cual no es indispensable durante la fase aguda de la infección, sin embargo, durante la fase crónica, se ha observado que su ausencia llega a ser letal debido a la acumulación del parásito en el cerebro, puesto que iNOS produce óxido nítrico que elimina la toxoplasmosis en el cerebro de los fetos en ratones. Otra enzima importante de mencionar es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que está involucrada con el metabolismo del triptófano, y se encarga de detener la propagación del parásito en fibroblastos, células del glioma, macrófagos y células de retinoblastoma, todo esto a partir de la producción de IDO, estimulado por IFN- $\gamma$  (Sasai y Yamamoto, 2019).

Diferentes factores secretados por *T. gondii* como factores de virulencia, proteínas secretoras excretoras, son reconocidos por diversas células, como las células presentadoras de antígenos, ya sean macrófagos y/o células dendríticas, que a su vez reclutan a monocitos y neutrófilos mediante las quimiocinas CCL2 y CXCL2. Los monocitos Ly6C<sub>alto</sub>CCR2+ y neutrófilos que son reclutados le sirven al parásito para su diseminación sistémica al infectarlos, afectando el control de la infección, mientras que IFN- $\gamma$  sigue combatiendo la infección y la infección sistémica. A pesar de que los monocitos Ly6C<sub>alto</sub>CCR2+ ayuden al parásito a diseminarse, tienen un aspecto positivo, ya que ayudan a producir IL-10, una citoquina antiinflamatoria producida por células T reguladoras FOXP3+CD4+ para evitar la encefalitis causada por el parásito durante la fase aguda, aunque también se ha detectado durante etapas tardías de la infección, en la fase crónica (Biswas et al., 2015). Otra citoquina importante es la IL-33, la cual se le atribuyen tanto respuesta proinflamatorias como respuestas que suprimen la inflamación, por un lado ayuda a reclutar monocitos en el cerebro cuando se da la infección por *T. gondii* mediante la producción de CCL2, generando una respuesta inmune fuerte; en contraste, IL-33 también puede provocar la supresión de la respuesta Th1 activando la respuesta Th2, es decir una respuesta antiinflamatoria (Nascimento et al., 2017).

## **2.7 Pruebas diagnósticas**

### **2.7.1 Hemaglutinación indirecta (HAI)**

El método de HAI se basa en la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero del paciente para aglutinar eritrocitos sensibilizados con antígenos de *Toxoplasma gondii*. Es importante mencionar que este método ha sido sustituido en muchos laboratorios por técnicas más sensibles y específicas, pero aún se utiliza en algunos contextos. El primer paso es sensibilizar los eritrocitos; para ello se obtiene una suspensión al 10 % de glóbulos rojos de carnero o conejo en solución salina, luego los glóbulos rojos son sensibilizados con el antígeno de *T. gondii*, y son lavados. Lo siguiente es preparar los sueros de los pacientes a testear, para esto se hacen diferentes diluciones dobles para luego proceder con la aglutinación, en donde se enfrentan los sueros de los pacientes con los eritrocitos sensibilizados, se dejan incubando durante dos horas y luego se realiza la lectura, para esto se valora el patrón de diseminación aglutinados en el fondo del pocillo. Un título de 1:16 o

superior se toma como positivo para la infección (Kindt et al., 2007). El aspecto negativo de la prueba radica en que suele dar falsos negativos en madres gestantes, por lo que la prueba requiere una segunda prueba de confirmación (Dubey 2016).

### **2.7.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica que puede ser usada en el diagnóstico serológico para ser utilizada con el fin de detectar y también cuantificar anticuerpos específicos contra una variedad de patógenos. El uso del IFI para *Toxoplasma gondii* sigue los mismos pasos que han sido estandarizados, primero se hace una preparación del antígeno, se obtienen partes del parásito que hayan sido procesados, como proteínas citoplasmáticas o de membrana y se fijan en una lámina o portaobjetos y luego se adiciona el suero del paciente. Si el paciente estuvo expuesto al parásito, presentará anticuerpos contra el parásito y estos se unirán a los anticuerpos fijados, y para evitar cualquier unión inespecífica, es necesaria la aplicación de una serie de lavados a los portaobjetos para asegurar que solamente queden los anticuerpos que se unieron al antígeno del parásito. El IFI requiere de un segundo anticuerpo que sea fluorescente, y que a la vez se una al anticuerpo que se unió al antígeno, en este caso se utilizan anticuerpos fluorescentes diseñados para que se unan a anticuerpos humanos; luego de añadido el anticuerpo fluorescente es necesario lavar para retirar cualquier unión inespecífica. Finalmente se observa al microscopio, si en caso el paciente haya estado o esté infectado por *T. gondii*, se observará la respectiva fluorescencia, en caso el paciente nunca haya tenido contacto con el parásito, no se observará ninguna fluorescencia (Goldman 1957).

Debido a la técnica usada y al método para observar los resultados, la IFI como herramienta de diagnóstico para toxoplasmosis es muy valiosa, ya que permite visualizar rápida y directamente los anticuerpos mediante la fluorescencia; es altamente específica ya que se evalúa la interacción entre antígeno-anticuerpo y puede ser cualitativa porque permite determinar la concentración de anticuerpos del suero usado. Una de las principales limitaciones es que no es posible diferenciar una infección activa (fase aguda) de una infección en fase crónica, por lo cual es necesario aplicar otros métodos de diagnóstico. Otras desventajas son diagnósticos que pueden dar resultados falsos positivos y falsos negativos. La subjetividad al leer un resultado también puede variar entre los especialistas y los costos se elevan, debido a que se requieren equipos especializados, el fluorocromo usado puede degradarse con el tiempo y aún más cuando se expone a la luz. A pesar de todas estas desventajas la técnica sigue siendo una herramienta valiosa para el diagnóstico de diferentes infecciones (Cortés & Mancera 2009).

### **2.7.3 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)**

La técnica de ELISA es bastante utilizada para el diagnóstico de muchas infecciones, esto gracias a su gran sensibilidad y especificidad, el procedimiento básicamente consiste en detectar anticuerpos específicos en el suero de los pacientes contra antígenos de *T. gondii*; primero se inicia con la sensibilización de las placas, se recubren con antígenos purificados del parásito, luego se añade la muestra (suero del paciente) en cada pocillo. ELISA requiere

de un tiempo de incubación para que se dé la unión de antígeno-anticuerpo, tiempo que puede variar según cada protocolo. Posteriormente se evitan las uniones inespecíficas lavando cada pocillo. Cuando ya se dio la unión, se agrega un anticuerpo secundario que está marcado con una enzima que pueda cambiar de color con el sustrato específico. El resultado es positivo cuando es visible el cambio de color por el sustrato, lo que indica que el anticuerpo secundario reconoció a los anticuerpos primarios que estaban en el suero del paciente, los cuales se unieron a los antígenos de la placa (Waltman et al., 1984; Contreras et al., 2000).

Una de las ventajas de la ELISA es que es una técnica que tiene más del 90 % de sensibilidad y especificidad para detectar anticuerpos contra cualquier patógeno, incluyendo *Toxoplasma gondii*. Otra de las ventajas sería la capacidad de cuantificar la concentración de anticuerpos, y también la automatización, esto se refiere a la posibilidad de procesar grandes números de muestras simultáneamente. Como toda prueba diagnóstica, la prueba de ELISA tiene limitaciones o desventajas, pueden encontrarse falsos positivos a causa de la reacción cruzada con anticuerpos similares o al mal lavado, no es posible distinguir entre una fase aguda y una fase crónica, el costo puede llegar a ser muy alto e inaccesible para las poblaciones de escasos recursos debido al uso de equipos automatizados costosos, pequeñas variaciones en el protocolo pueden influenciar en el proceso y dar un mal resultado. A pesar de esto la técnica de ELISA es fundamental para el diagnóstico de la toxoplasmosis, en medicina y en investigación (Cortés & Mancera 2009; Baldovino et al., 2011).

#### **2.7.4 Técnica de Western blot (WB)**

La técnica de Western blot es la prueba confirmatoria para muchas infecciones, ya que es capaz de detectar anticuerpos específicos que se hayan unido a determinadas proteínas del parásito; para algunos diagnósticos no solo se toma en cuenta una banda, sino patrones de bandas para la detección. El fundamento de la técnica consiste en la detección de anticuerpos presentes en el suero del paciente que puedan reconocer antígenos de *T. gondii* separados por su peso molecular mediante electroforesis. El primer paso es la obtención del antígeno del parásito; este suele ser el antígeno total lisado (TLA). Luego el antígeno es separado por su peso molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. Las proteínas del parásito que fueron separadas en el gel son transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se bloquean generalmente con leche para evitar uniones inespecíficas. Las membranas son incubadas con el suero del paciente y luego se lavan para retirar anticuerpos inespecíficos. A los anticuerpos que quedaron se les unirá un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa; de esta manera la detección se realizará agregando el sustrato específico para la enzima, cambiando el color en donde se encuentre la unión, el cual será visible (Patel et al., 2017).

Las ventajas del WB son la alta especificidad, debido a que se busca la unión entre anticuerpos específicos contra determinados antígenos del parásito. Justamente gracias a su gran especificidad, es tomada como una prueba confirmatoria cuando otras pruebas serológicas presentan resultados ambiguos, también resulta ventajoso el poder observar el

peso molecular de cada banda marcada ya que permite visualizar diferentes anticuerpos. Algunas de las desventajas son la complejidad de la técnica ya que debido a los procesos es más laboriosa y toma bastante tiempo en completarse, algunos resultados pueden ser subjetivos y dependen mucho de la interpretación del analista, el costo también llega a ser un factor importante debido a lo alto que puede llegar a ser, lo que hace que sea inaccesible en algunas ocasiones, no es cualitativo, la reproducibilidad de la técnica puede verse afectada debido a que algunas pasos varían mucho además de que es una técnica bastante rigurosa (Marcolino et al., 2000).

En esencia, el Western blot es un método crucial para confirmar el diagnóstico de toxoplasmosis, en particular cuando otros análisis serológicos no son claros. No obstante, es fundamental tener en cuenta sus restricciones al analizar los hallazgos (Gonzales et al., 2018).

### 2.7.5 PCR

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica que permite amplificar secuencias específicas de ADN. En el contexto de la detección de toxoplasmosis, la PCR se usa para identificar el ADN del parásito *Toxoplasma gondii* en muestras clínicas como sangre, líquido amniótico, tejido, líquido cefalorraquídeo (LCR), humor acuoso y vítreo, etc (Dubey 2016).

La técnica de PCR para la detección de toxoplasmosis básicamente sigue el mismo procedimiento que otras PCR, extracción de ADN, preparación de la mezcla para la reacción, en donde se añaden los primers específicos, nucleótidos y la enzima Taq polimerasa, luego sigue la amplificación, dependiendo de los primers se amplificará la zona elegida, esta puede variar según la sensibilidad que se requiera, puede amplificarse el B1, las repeticiones de 529 pb (RE), SAG1 (*Surface antigen 1*) o el RNA 18S, siendo el RE el más sensible de todos debido a la gran cantidad de copias que tiene *T. gondii* en su genoma. Para la detección se realiza técnicas como electroforesis en gel si es una PCR convencional, si se trata de una PCR en tiempo real se utiliza colorantes intercalantes o sondas específicas que evalúan la amplificación al momento (Kim & Weiss 2004).

La PCR tiene muchas ventajas, primero, su sensibilidad es única, puede detectar pequeña cantidad del material genético del parásito, lo que resulta importante, ya que casi siempre los pacientes no tienen carga alta de parásitos en sangre, también es altamente específica pues depende del diseño de los *primers*, los cuales se dirigen a secuencias de ADN específicas reduciendo los posibles falsos negativos. La rapidez con la que se obtienen los resultados también es un punto a favor, ya que en unas pocas horas se obtiene el diagnóstico usando una PCR en tiempo real. Una de las principales ventajas de la PCR para diagnosticar toxoplasmosis que limita las demás pruebas diagnósticas, es que es capaz de detectar la fase aguda en un paciente, esto porque permite detectar si el ADN del parásito está en sangre, lo que se entiende como una infección activa (fase aguda). Las principales desventajas son: la contaminación, podría ocurrir debido a que es bastante sensible; el costo, que es bastante elevado debido a los materiales y reactivos necesarios, sin perjuicio

de los equipos requeridos para el procedimiento que a su vez son costosos (Switaj et al., 2005).

En conclusión, la técnica de PCR para detectar la toxoplasmosis es una herramienta poderosa, pero es necesaria aplicarla en casos especiales debido a los costos inaccesibles para la población.

### III. HIPÓTESIS

H0 Los antígenos excretorios/secretorios y antígenos de membrana de *T. gondii* son útiles para diagnosticar la fase aguda en pacientes con toxoplasmosis mediante la técnica de Western blot.

H1 Los antígenos excretorios/secretorios y antígenos de membrana de *T. gondii* no son útiles para diagnosticar la fase aguda en pacientes con toxoplasmosis mediante la técnica de Western blot.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

- Evaluar el uso de los antígenos E/S y antígenos de membrana de *T. gondii* para la detección de la infección en pacientes en fase aguda mediante la prueba de Western blot.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener los antígenos total lisado (TLA), excretorios/secretorios (E/S) y antígenos de membrana (AM) de la cepa *T. gondii* RH a partir del cultivo celular LLC-MK2 infectado con taquizoitos.
- Estandarizar el procedimiento para la obtención de un patrón de bandas mediante la prueba de Western blot en un modelo animal de rata en fase aguda y crónica de la infección por *T. gondii*.
- Obtener un patrón de bandas inmunoreactivas mediante la prueba de Western blot de la fase aguda en sueros de pacientes con toxoplasmosis y VIH positivos.
- Obtener un patrón de bandas inmunoreactivas mediante la prueba de Western blot de la fase crónica en sueros de pacientes con toxoplasmosis y VIH positivos.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas, área Inmunología, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el código o número de aprobación correspondiente es 210803 (ver anexo, página 92). Las muestras de suero de pacientes VIH positivos cuentan con la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) – Humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para su uso en investigaciones realizadas en el laboratorio de enfermedades infecciosas.

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Material biológico

El laboratorio en donde se realizó el trabajo cuenta con un nivel de bioseguridad de tipo II y con los equipos y ambientes recomendados para el adecuado procesamiento del siguiente material biológico:

- Cepa RH (taquizoito) de *Toxoplasma gondii*
- Células LLC-MK2 (Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cell)
- 35 ratas macho cepa Holtzman
- 31 muestras de suero de pacientes VIH positivo
- 16 muestras de suero de personas inmunocompetentes

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Mantenimiento del cultivo celular

El procedimiento empleado se basó en el protocolo descrito por Romero et al. (2016) con algunas modificaciones. Se utilizó la línea celular LLC-MK2 (*Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cell*), procedente de fibroblasto de riñón de mono, y se sembró en medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich), suplementada al 10 % de suero fetal bovino (Gibco) y penicilina (10,000 U/ml) / estreptomycin (10 mg/ml) (Sigma Aldrich) en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con 13 ml del medio de cultivo; el crecimiento de las células se mantuvo a temperatura de 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire atmosférico hasta formar una monocapa celular. Cuando la monocapa alcanzó una confluencia del 100 %, las células se tripsinizaron con Tripsina-EDTA 1X (Sigma Aldrich) para separarlas del sustrato y trasladarlas a nuevas botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Para darle seguimiento al crecimiento de las células se observaron mediante un microscopio invertido a 10X y 40X.

### **5.2.2 Infección del cultivo celular**

El método empleado para infectar el cultivo celular se basó en el protocolo descrito por Chatterton et al. (2002) con algunas modificaciones. Cuando el cultivo de la línea celular LLC-MK2 llegó a una confluencia de células del 80 % al 90 %, se infectaron con aproximadamente  $10^6$  taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii* que fueron obtenidas de criopreservación. El mantenimiento y la producción del cultivo de parásitos fue adaptado de Subauste & Remington (2001) con algunas modificaciones. La infección se realizó en medio RPMI 1640 suplementado con SFB 2 %, aminoácidos no esenciales 10 mM, piruvato de sodio 1 mM y glutamina 2 mM incubados a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 95 %, en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup>. También se utilizaron frascos de cultivo celular de 225 cm<sup>2</sup> con la finalidad de obtener mayores concentraciones del parásito para mejorar la recolección de antígenos de membrana. La propagación de parásitos será monitoreada cada 3 días mediante un microscopio invertido, observada a 40X.

### **5.2.3 Obtención de antígeno total lisado (TLA)**

Para la obtención de antígenos totales se siguió el procedimiento realizado por Cardona et al. (2005), con algunas modificaciones. Se recolectó todo el medio del cultivo en donde estaba creciendo *Toxoplasma gondii*, se lavó el frasco de cultivo celular hasta 3 veces con el mismo medio de cultivo para recolectar la máxima cantidad de parásitos y se centrifugó a 1500 RPM por 5 minutos para eliminar los restos celulares de la línea celular LLC-MK2, se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos, el precipitado obtenido se resuspendió en 10 ml de solución tampón fosfato salina (PBS 1X), previamente filtrada en membrana de 0.22 µm de poro, el resuspendido se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos, se descartó el sobrenadante, el precipitado en donde estaban los taquizoitos se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X para ser transferidos a un tubo de 2 ml siliconado. Se lisó el resuspendido por sonicación a 4 Mhz (3 W) con 3 pulsos de 30 segundos, en todo el procedimiento de sonicado el tubo se mantuvo en hielo, luego se añadieron inhibidores de proteasas (Leupeptin 1/1000; Pepstatin 1/1000 y Pefabloc 1/100) al producto final, la cuantificación de proteínas se hizo mediante el método de Bradford y finalmente se almacenó el antígeno lisado total a -70 °C hasta su uso. Para comprobar el éxito de la obtención del antígeno TLA, se enfrentó el antígeno a un suero de rata infectada y a una no infectada en una prueba de Western blot (Wb) y se compararon ambos patrones.

### **5.2.4 Obtención de antígeno excretos/secretos (E/S)**

El protocolo que se utilizó para obtener antígenos excretos/secretos fue el descrito por Cazabonne et al. (1994) con algunas modificaciones. Los antígenos excretos secretos (E/S) se obtuvieron de cultivos celulares de células LLC-MK2 infectadas con *T. gondii*, cepa RH; a los 4 o 5 días post infección se colectó el sobrenadante del medio que contenía los taquizoitos de *T. gondii* en un tubo de 15 ml o de 50 ml, dependiendo del tamaño del frasco de cultivo celular de donde provenía, y se centrifugó a 1500 RPM por 5 minutos para

descartar restos celulares, se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos, el sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µm de poro, con ayuda de una aguja con volumen de 5 ml y de 10 ml. El antígeno recolectado se almacenó a -70°C hasta su respectivo uso. Para comprobar el éxito de la obtención del antígeno E/S, se enfrentó el antígeno a un suero de rata infectada y a una no infectada en una prueba de Wb y se compararon ambos patrones.

### **5.2.5 Obtención del antígeno de membrana (AM)**

Para la obtención de antígenos de membrana se siguió el protocolo usado por Baghirova et al. (2015). Se recolectó todo el medio en donde estaba creciendo *Toxoplasma gondii*, se lavó el frasco de cultivo celular hasta 3 veces con el mismo medio de cultivo con el fin de recolectar la máxima cantidad de parásitos, el medio se centrifugó a 1500 RPM por 5 minutos para eliminar los restos celulares, se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos, el precipitado obtenido se resuspendió en 10 ml de solución tampón fosfato salina (PBS 1X), previamente filtrada en membrana de 0.22 µm de poro, el resuspendido se centrifugó a 3500 RPM por 15 minutos, se descartó el sobrenadante; el precipitado, ya lavado en PBS 1X en donde estaban los taquizoitos, se resuspendió en el Buffer 1 (HEPES (pH 7.4) 50 mM; NaCl 150 mM; Saponin 0.05 %; PMSF 1 mM; Leupeptin 5 µg/ml; Aprotinin 2 µg/ml; Pepstatin A 1 µg/ml) con cuidado, evitando la formación de espuma, el tubo se colocó en hielo durante 10 minutos, luego de este tiempo se centrifugó a 2000 xg durante 5 minutos a 4 °C, se transfirió el sobrenadante (Fracción citosólica) a otro tubo y se almacenó a -70 °C para posteriormente compararlo con la fracción de membrana. Confirmado que se haya retirado toda la fracción citosólica del tubo, se resuspendió suavemente el precipitado en el Buffer 2 (HEPES (pH 7.4) 50 mM; NaCl 150 mM; IGEPAL CA -630 solution 1 %; PMSF 1 mM; Leupeptin 5 µg/ml; Aprotinin 2 µg/ml; Pepstatin A 1 µg/ml), se colocó el tubo en hielo durante 30 minutos, pasado el tiempo se centrifugó a 7000 xg durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante que es la fracción de membrana se almacenó a -70 °C hasta su uso. Para comprobar si se logró obtener el antígeno de membrana, se compararon los patrones de bandas con la fracción citoplasmática y con el antígeno total cuando se enfrentaron al suero de ratas infectadas en un Wb.

### **5.2.6. Obtención de suero en fase aguda y crónica en modelo de ratas**

Con la finalidad de obtener suero en fase aguda y crónica de la infección por *T. gondii* se utilizaron 35 ratas *Rattus norvegicus* cepa Holtzman de 30 días de nacidas, todas machos. Se infectaron 25 ratas para obtener su suero y enfrentarlo con antígenos obtenidos (antígeno lisado total, excretor/secretor y antígenos de membrana) del parásito. También se tuvieron 10 ratas como control negativo a las que se inyectaron con 50 µl de solución salina vía intraperitoneal. La infección se realizó mediante una tuberculina de 1ml vía intraperitoneal con 50 µl con una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^5$  taquizoitos, contados y recolectados a partir del cultivo celular. La forma en que se infectaron fue sujetándolas por detrás de las orejas, sin que se muevan y se colocó el bisel arriba inoculando suavemente.



Las ratas fueron sacrificadas los días 3, 7, 15, 30 y 60 post infección (Flujograma en anexo, figura N° 42), cada día se sacrificaron 7 ratas, 5 infectadas y 2 controles. Para la eutanasia los animales fueron anestesiados con una sobredosis de anestésicos 150 mg/kg y Xilacina 20 mg/kg administrada con aguja tuberculina por vía intramuscular. Se comprobó la ausencia de reflejo nociceptivo por punción de la zona interdigital. Para la colecta de la sangre se hizo punción cardíaca, con una aguja 22 G x 1" que tiene un sistema para extraer sangre al vacío (Vacutainer™), se esperó a que se llenara el tubo con la sangre y se retiró la aguja con cuidado. La sangre colectada se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos para separar el suero del coágulo y se hicieron alícuotas de ambas muestras para almacenar a -20 °C hasta su uso. Durante la eutanasia también se les extrajeron los órganos como: cerebro, corazón, hígado, riñones, pulmones, bazo, líquido cefalorraquídeo y orina para ser almacenadas hasta por aproximadamente diez años con la finalidad de futuras investigaciones. Durante el manejo de los animales, toma de muestra y manejo de la muestra, el personal usó un mandil de laboratorio, guantes de laboratorio, gafas de seguridad y recipiente para desecho de material punzo cortante.

Las muestras biológicas para usar o manipular no fueron tóxicas y no hubo riesgo de infección del personal al manipular las muestras o desechos. Todos los desechos biológicos y los restos de los animales después de la necropsia fueron autoclavados y descartados por la empresa encargada de tratar los desechos biológicos del laboratorio en coordinación con la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### **5.2.7 Obtención de suero humano para el procedimiento de Western blot**

Se evaluaron 16 sueros de pacientes inmunocompetentes donados por la seroteca del laboratorio de Parasitología Humana y Animal perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y 31 sueros de pacientes inmunocomprometidos diagnosticados con VIH, los cuales forman parte de la seroteca del laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) obtenidos en otros proyectos de investigación que cuentan con la aprobación de ética para su uso.

De los 31 sueros de pacientes inmunocomprometidos, 16 se designaron como fase aguda (Grupo 1 o G1), ya que fueron positivos para PCR en tiempo real para detectar la presencia de material genético de *Toxoplasma gondii*, los 15 sueros restantes fueron tomados como en fase crónica (Grupo 2 o G2), por ser PCR en tiempo real negativo y también por haberse realizado una tomografía axial computarizada (TAC) en donde se observaron presuntos quistes tisulares compatibles a *T. gondii* correspondientes a una fase crónica. Los 16 sueros donados por la UNMSM fueron designados como población inmunocompetente (Grupo 3 o G3). Se les asignó códigos a los 47 sueros en total de los pacientes que fueron separados en los tres grupos ya mencionados. El orden y códigos correspondientes se observan en anexos, tabla N° 15.

## 5.2.8 Prueba de Western blot

La electroforesis, electrotransferencia, y el *blot* se realizó siguiendo el procedimiento estandarizado en el laboratorio de Inmunología de enfermedades infecciosas, adaptado de Towbin et al. (1979). Los antígenos se trataron con buffer de la muestra (20 µl por cada 1 ml de antígeno), este tampón de muestra contenía Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 %, Ditiotreitól (DTT) (2.5 M, 0.0358g diluido en 100 µl de agua Mili-Q), tinte de rastreo o seguimiento (azul de bromofenol, glicerol, tris ph 8 y agua Mili-Q) y 6% glicerol, posteriormente se incubó durante 5 min a 100°C. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida de 5 % el gel de apilamiento y de 12 % el gel de resolución, con un volumen de antígeno que dependió de la concentración del mismo antígeno (previamente tratado) para cada gel. Se añadió buffer de la parte inferior a la cámara electroforética y buffer de la parte superior a los geles, se colocó la tapa de la cámara y se conectó a la fuente de poder Power de BIORAD, y se transportó a la refrigeradora con cuidado, las condiciones de la corrida electroforética fueron de 5 mA por cada gel durante 45 minutos, luego de ese tiempo a 25 mA por gel por 30 minutos, los tiempos de corrida se modificaron dependiendo de la altura en que se colocaron los antígenos y del tamaño del gel apilamiento y de resolución.

Para el proceso de transferencia, las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron en membranas de nitrocelulosa (BioRad), se agregó *buffer* de transferencia (buffer de compartimiento inferior, metanol, agua mili Q) a la cámara de transferencia, las condiciones de la transferencia serán de 2 Amp por cada gel durante 1 hora y 30 minutos a -20°C. Terminando la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante 30 minutos con PBS Tween 20 al 0.3 % (Buffer Fosfato Salino) que contenía leche al 5 %. Las membranas de nitrocelulosa ya bloqueadas serán guardadas a 20 °C, hasta ser enfrentadas con los sueros de humano y de ratas.

### 5.2.8.1 Determinación del Western blot de suero de ratas infectadas contra los antígenos: Antígeno total lisado (TLA), Excretores/Secretores (E/S) y antígenos de membrana (AM) de *Toxoplasma gondii*

Siguiendo con lo establecido por Towbin et al. (1979) con algunas modificaciones, las membranas de nitrocelulosa obtenidas en la transferencia fueron incubadas con sueros de las ratas diluidos en 1:50 para IgM y 1:100 para IgG en PBS-Tween 20 al 0.3 % con leche al 1 %, durante 12 horas y con agitación mecánica. Luego se realizaron tres lavados con PBS Tween 20 al 0.3 % y dos lavados con PBS 1X (Se dejó 5 minutos con cada lavada). Para detectar los anticuerpos unidos a los antígenos se incubaron durante 2 horas con anticuerpo secundario anti-IgM y anti-IgG de rata, marcados con peroxidasa, diluidos en 1:500 para anti-IgM y 1:1000 para anti-IgG en PBS-Tween 20 al 0.3 % con leche al 1 %. Terminando las 2 horas se procedió al lavado del anticuerpo secundario, se lavó tres veces con PBS Tween 20 al 0.3 % y 3 veces con PBS 1X, los complejos inmunes fueron reveladas mediante la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenceno (DAB) y finalmente la reacción se detuvo con agua Mili-Q.

### **5.2.8.2 Determinación del Western blot de sueros humanos contra los antígenos: Antígeno total lisado (TLA), Excretores/Secretores (E/S) y antígenos de membrana (AM) de *Toxoplasma gondii***

Todos los sueros humanos, sanos y enfermos, fueron incubados con las membranas de nitrocelulosa con el respectivo antígeno (TLA, E/S y AM), los sueros fueron diluidos en 1:50 para IgM y 1:100 para IgG en PBS-Tween 20 al 0.3 % con leche al 1 %, durante 12 horas y con agitación mecánica. Luego se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.3 % y dos lavados con PBS 1X ( Se dejó 5 minutos con cada lavada). Para detectar los anticuerpos unidos a los antígenos se incubaron durante 2 horas con anticuerpo secundario anti-humano IgM e IgG, marcado con peroxidasa, diluidos en 1:100 para anti-IgM y 1:4000 para anti-IgG en PBS-Tween 20 al 0.3 % con leche al 1 %. Terminando las 2 horas se procedió al lavado del anticuerpo secundario, se lavó tres veces con PBS Tween 20 al 0.3 % y 3 veces con PBS 1X, los complejos inmunes fueron reveladas mediante la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenceno (DAB) y finalmente la reacción se detuvo con agua Mili-Q.

### **5.2.9 Análisis de las bandas antigénicas**

Para determinar los pesos moleculares de las bandas antigénicas tanto para IgM e IgG, se realizó la comparación con los marcadores moleculares normalizados (Estándares de Proteína *Precision Plus All Blue* - BioRad). La obtención de los pesos moleculares de los antígenos reconocidos, antígenos total lisado (TLA), antígenos excretores secretores (E/S) y antígenos de membrana (AM) se realizó midiendo la distancia recorrida de las bandas de bajo peso molecular y relacionándolo con el marcador de bajo peso molecular descrito anteriormente, de igual manera para las bandas de mediano y alto peso molecular, para lo cual fue necesario encontrar la movilidad relativa (RF) del marcador y de los antígenos en estudio.

Para elegir las bandas inmunoreactivas que conformarán los patrones de bandas agudo y crónico, se colocaron en término de frecuencia para calcular la sensibilidad y especificidad de cada banda mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdadero positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

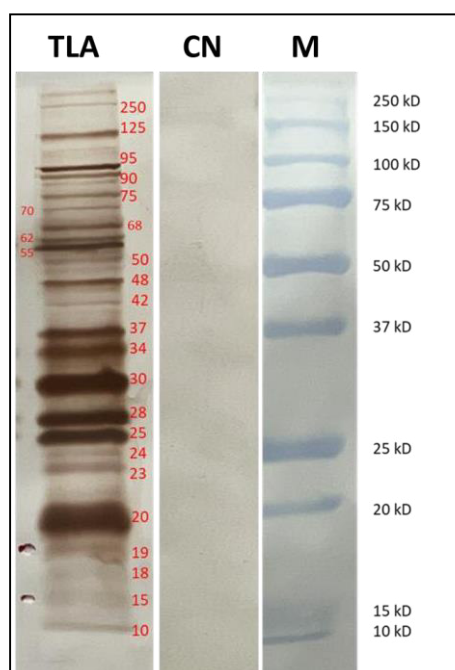
$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Obtención del antígeno total lisado (TLA)

La obtención del antígeno total de *Toxoplasma gondii* estuvo relacionada directamente con la concentración de parásitos obtenidas en cultivo celular. A los cuatro días, cuando el crecimiento es exponencial, la concentración aproximada de parásitos en los frascos de cultivo celular fue de  $10^6$  taquizoitos por mililitro, contadas con la cámara de Neubauer. La concentración del antígeno total recolectado fue de 240  $\mu\text{g/ml}$ , aproximadamente, cuantificado mediante el método de Bradford.

Se observó en el resultado de la prueba de Western Blot del antígeno TLA, bandas con sus respectivos pesos moleculares en kDa que se enfrentaron al suero de la rata TOR 502 diluido en 1:80, y el anticuerpo conjugado anti-IgG 1:1000. Las bandas tienen pesos moleculares de 250 kDa, 125 kDa, 95 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 75 kDa, 70 kDa, 68 kDa, 62 kDa, 55 kDa, 50 kDa, 48 kDa, 42 kDa, 37 kDa, 34 kDa, 30 kDa, 28 kDa, 25 kDa, 24 kDa, 23 kDa, 20 kDa, 19 kDa, 18 kDa, 15 kDa y 10 kDa. El control negativo (CN) TOR 206 se incubó con las mismas condiciones y no se observó ninguna banda (figura N° 7)

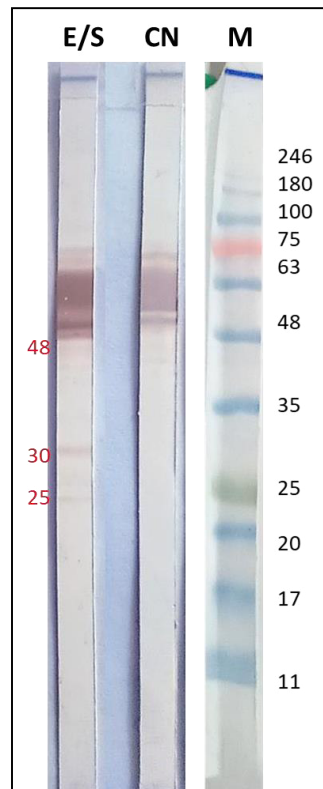


**Figura N° 7. Western blot (SDS-PAGE 12 %) Antígeno TLA para IgG.** Se observan todas las bandas reveladas con sus pesos moleculares en kD de color rojo. CN: Control negativo, TLA: Antígeno total lisado, M: Marcador de peso molecular.

### 6.2 Obtención de antígenos excretos secretores (E/S)

Se obtuvo antígenos excretos secretores (E/S) de los cultivos celulares, el resultado de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford fue de 205  $\mu\text{g/ml}$  aproximadamente.

Se observó en la prueba de Western blot del antígeno E/S y sus bandas con sus respectivos pesos moleculares en kDa de color rojo, se enfrentaron al suero de la rata TOR 502 diluido en 1:100, y el anticuerpo conjugado anti-IgG 1:1000. Las bandas de interés tuvieron pesos moleculares de 48 kDa, 30 kDa y 25 kDa. El control negativo TOR 26 no evidenció ninguna de estas bandas (figura N° 8).

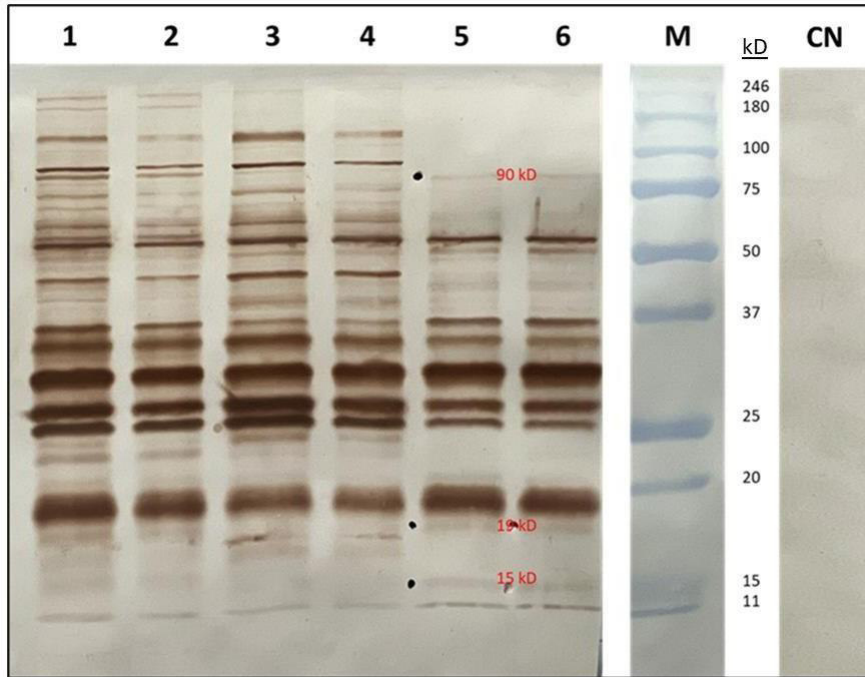


**Figura N° 8. Western blot (SDS-PAGE 12 %) Antígeno E/S para IgG.** Se observan todas las bandas reveladas con sus pesos moleculares en kDa de color rojo. E/S: Antígenos excretorios secretorios, CN: control negativo y M: marcador de peso molecular.

### 6.3 Obtención de antígenos de membrana (AM)

Se logró obtener los antígenos de membrana desde la fracción de membrana, y la cuantificación de proteínas por el método de Bradford demostró aproximadamente una concentración de 200 µg/ml aproximadamente.

Se realizó la prueba de Western blot para comparar de diferentes concentraciones de antígeno de membrana, fracción citoplasmática y antígeno total (figura N° 9). Se reconocieron las proteínas de peso molecular de 80 kDa, 19 kDa y 15 kDa en el carril de antígenos de membrana, pero no se observan en el carril de las fracciones citoplasmáticas. Las proteínas del TLA se muestran con intensidad, en total 25 bandas. El control negativo (CN) TOR 206 se incubó con las mismas condiciones y no se observó ninguna banda (tabla N° 1).



**Figura N° 9.** Western blot (SDS-PAGE 12 %) de antígeno lisado total de *T. gondii*, fracción citoplasmática y de membrana enfrentados a suero de rata. Para el anticuerpo primario se usó suero de TOR 502 (1:80) y anticuerpos conjugados anti-IgG (1:1000). (M) Marcador de peso molecular. (1) Antígeno total lisado 10 µl. (2) Antígeno total lisado 5 µl. (3) Fracción citoplasmática 10 µl. (4) Fracción citoplasmática 5 µl. (5) Antígenos de membrana 10 µl. (6) Antígenos de membrana 5 µl. (CN) control negativo. En la tabla N° 1 se muestra la comparación de los tres antígenos y el peso de las bandas en donde se observó inmunoreactividad.

**Tabla N° 1.** Comparación de las bandas observadas entre el antígeno TLA, fracción de citoplasmática (FC) y antígeno de membrana (AM).

Peso molecular	TLA (1 y 2)	FC (3 y 4)	AM (5 y 6)
10 kDa	✓	✓	✓
15 kDa	✓	-	✓
18 kDa	✓	✓	-
19 kDa	✓	-	✓
20 kDa	✓	✓	✓
23 kDa	✓	✓	-
24 kDa	✓	✓	-
25 kDa	✓	✓	✓
28 kDa	✓	✓	✓
30 kDa	✓	✓	✓
34 kDa	✓	✓	✓
37 kDa	✓	✓	✓
42 kDa	✓	✓	-

48 kDa	✓	✓	-
50 kDa	✓	✓	✓
55 kDa	✓	✓	✓
62 kDa	✓	✓	-
68 kDa	✓	✓	-
70 kDa	✓	✓	-
75 kDa	✓	✓	-
80 kDa	✓	✓	✓
90 kDa	✓	-	✓
95 kDa	✓	✓	-
125 kDa	✓	✓	-
250 kDa	✓	✓	-

✓ : Se detectó

- : No se detectó

#### 6.4 Obtención de suero en fase aguda y crónica en modelo de ratas

Las ratas no mostraron ningún signo los primeros días luego de haber sido infectadas ni tampoco a lo largo de toda la infección, ni en fase aguda ni en fase crónica, hasta ser sacrificadas. Todas las ratas fueron sacrificadas en las fechas correspondientes a los grupos de días post infección (dpi) incluyendo los controles negativos.

Se organizaron en cinco grupos dependiendo de la fecha de sacrificio de las ratas y se les asignó los códigos respectivos a cada una de ellas (Tabla N° 2).

**Tabla N°2.** Códigos asignados para las ratas infectadas y controles.

Sacrificio	3 dpi	7 dpi	15 dpi	30 dpi	60 dpi
	TOR 101	TOR 201	TOR 301	TOR 401	TOR 501
	TOR 102	TOR 202	TOR 302	TOR 402	TOR 502
	TOR 103	TOR 203	TOR 303	TOR 403	TOR 503
<b>Códigos</b>	TOR 104	TOR 204	TOR 304	TOR 404	TOR 504
	TOR 105	TOR 205	TOR 305	TOR 405	TOR 505
	TOR 106	TOR 206	TOR 306	TOR 406	TOR 506
	C.N.	C.N.	C.N.	C.N.	C.N.
	TOR 107	TOR 207	TOR 307	TOR 407	TOR 507
	C.N.	C.N.	C.N.	C.N.	C.N.

\*dpi = días post infección

\* Los códigos que terminan en 6 y en 7 son controles negativos (C.N.)

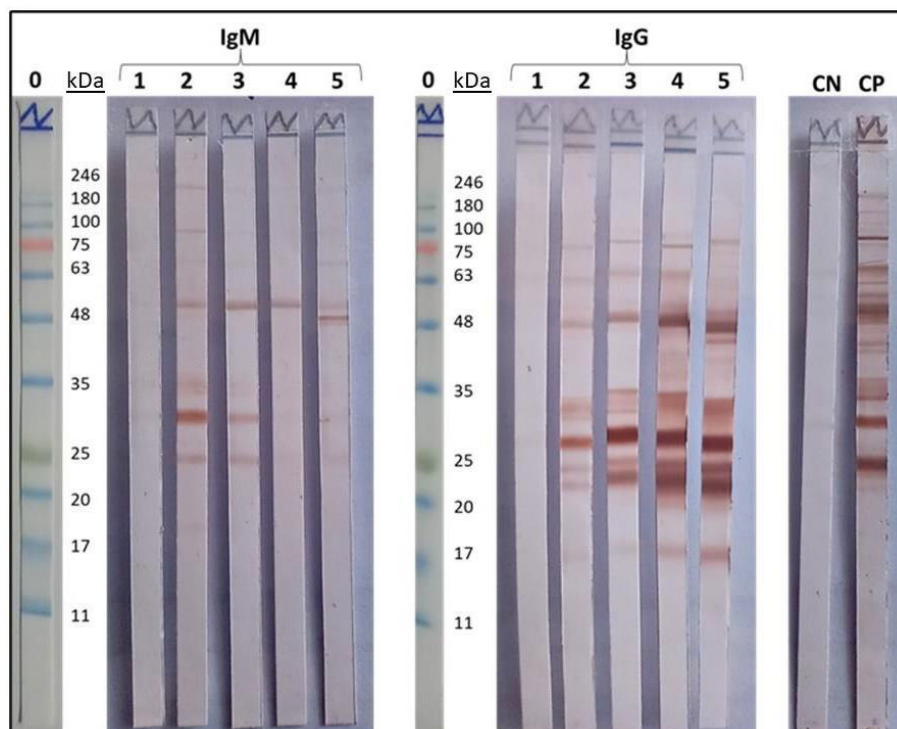
## 6.5 Resultados de la prueba de Western blot de suero de ratas y humanos

### 6.5.1 Determinación del Western blot de suero de ratas infectadas contra los antígenos: Antígeno total lisado (TLA), Excretores/Secretores (E/S) y antígenos de membrana (AM)

#### 6.5.1.1 Sueros de ratas enfrentados al antígeno total lisado (TLA)

Se observó el resultado de la prueba de Western blot al enfrentar los sueros de las ratas a los 3, 7, 15, 30 y 60 días post infección contra el antígeno TLA, las intensidad de bandas aumenta en los 60 días post infección (60 dpi) y en los 3 días post infección (3 dpi) no se muestra ninguna banda.

En fase aguda que corresponde a las ratas sacrificadas los días 3 y 7 dpi, las bandas que se observaron para IgM fueron 18, 25, 30, 35, 48, 50, 70, 95 y 250 kDa, mientras que para IgG fueron 18, 25, 28, 30, 37, 50, 70, 75 y 95 kDa. En fase crónica (15, 30 y 60 dpi) las bandas que se observaron para IgM fueron 25, 30, 35, 50 kDa para las ratas de 15 dpi, 50 kDa para las ratas 30 dpi y 48 y 50 kDa las ratas de 60 dpi, para IgG se encontraron las bandas de 18, 23, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 62, 75 kDa (figura N° 10)



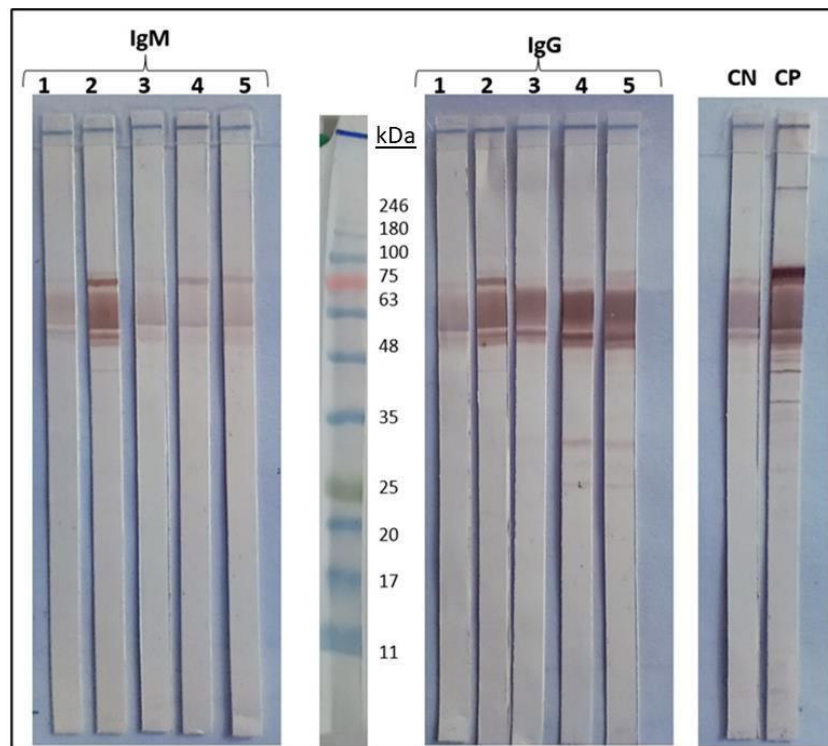
**Figura N° 10. Western blot (SDS-PAGE 12 %) de antígeno lisado total de *T. gondii* enfrentado a suero de rata.** Sueros incubados en diluciones de 1:50 para IgM conjugado y 1:80 para IgG conjugado. Los anticuerpos conjugados anti-IgM fueron diluidos 1:500 y anti-IgG 1:1000. 0: Marcador de peso molecular. 1: Suero de rata 3 días post infección. 2: Suero de rata 7 días post infección. 3: Suero de rata 15 días post infección. 4: Suero de rata 30 días post infección. 5: Suero de rata 60 días post infección. CN: Control negativo. CP: Control positivo



### 6.5.1.2 Sueros de ratas enfrentados a antígenos Excretorios secretores (E/S)

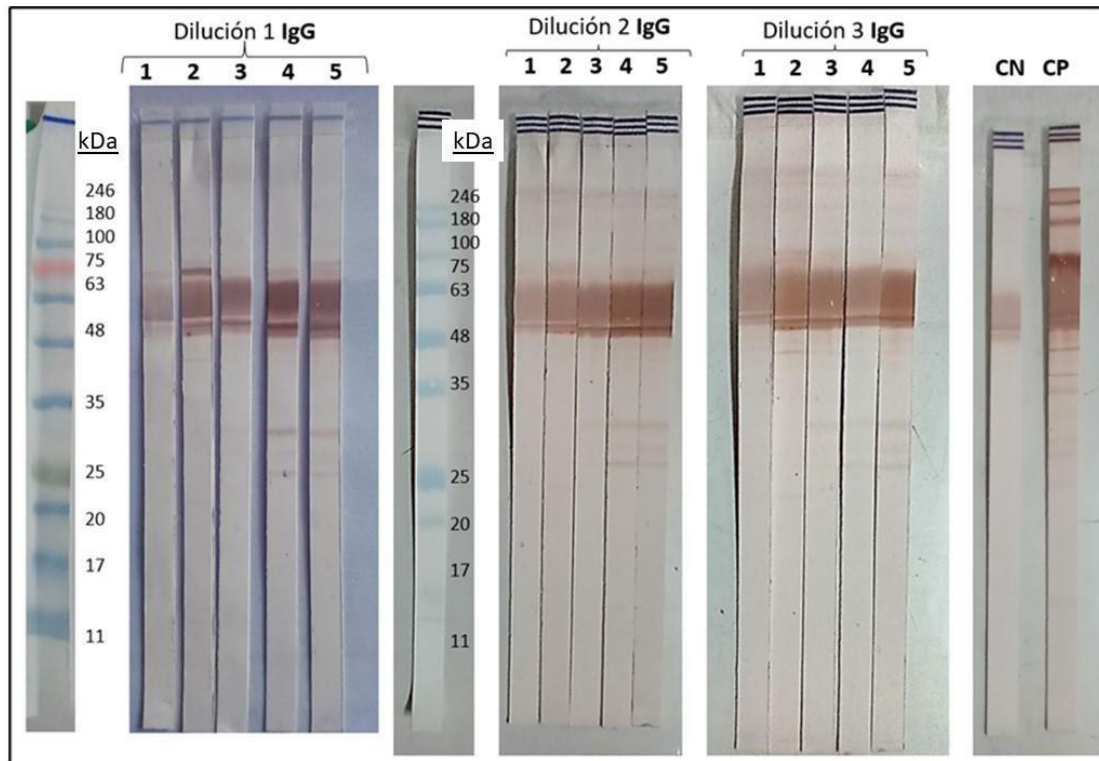
Se observó en el resultado de la prueba de Western Blot al enfrentar los sueros de las ratas a los 3, 7, 15, 30 y 60 días post infección contra los antígenos E/S, las intensidad de bandas aumenta en el día 60 post infección (5) y en el día 3 post infección (1) no se muestra ninguna banda.

En fase aguda (3 y 7 dpi) sólo se observaron dos bandas, 42 kDa bastante tenue y 75 kDa en las ratas de 7 dpi tanto para IgM e IgG. Para fase crónica (15, 30 y 60 dpi) las ratas de 15 dpi no mostraron ninguna banda para IgM e IgG; las ratas de 30 y 60 dpi revelaron bandas de 25 y 30 kDa para IgG, mientras que para IgM solamente una banda de 75 kDa (figura N° 11).



**Figura N° 11. Western blot (SDS-PAGE 12 %) de antígeno E/S de *T. gondii* enfrentado a suero de rata.** Sueros incubados en diluciones de 1:50 para IgM y 1:80 para IgG. Los anticuerpos conjugados anti-IgM diluidos en 1:500 y anti-IgG 1:1000. 0: Marcador de peso molecular. 1: Suero de rata 3 días post infección. 2: Suero de rata 7 días post infección. 3: Suero de rata 15 días post infección. 4: Suero de rata 30 días post infección. 5: Suero de rata 60 días post infección. CN: Control negativo. CP: Control positivo.

Se repitió el Western blot para E/S para probar 2 diferentes diluciones para la detección de IgG, la dilución 2 consistió en el suero de rata diluido en 1:100 del suero de rata y 1:500 del anticuerpo conjugado. En la dilución 3 se empleó el suero de rata diluido en 1:50 y el anticuerpo conjugado 1:1000. Se observó el resultado en donde no se mostraron bandas adicionales observadas en la dilución 1, correspondiente a la dilución original (figura N° 11), tampoco hubo un aumento significativo en la intensidad de las bandas con pesos 25 kDa, 30 kDa para las ratas en fase crónica (figura N° 12).

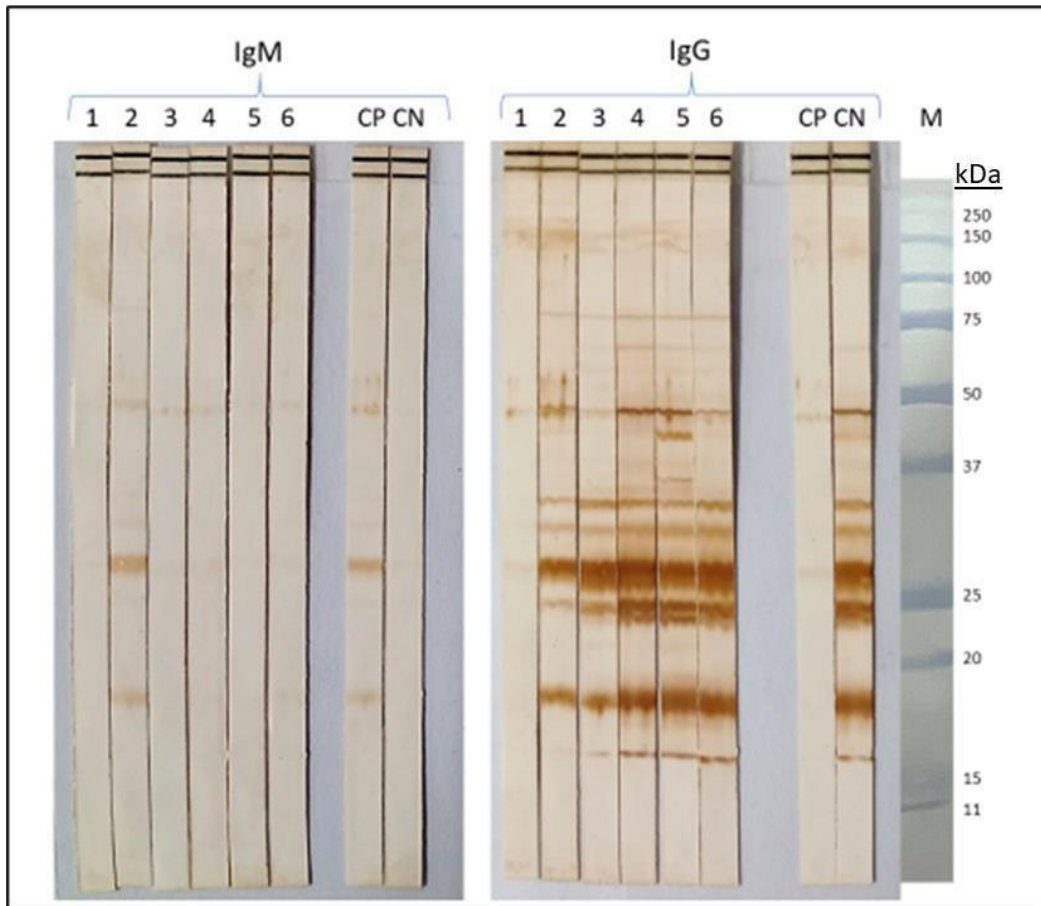


**Figura N° 12. Western blot (SDS-PAGE 12 %) de antígeno E/S de *T. gondii* enfrentado a suero de rata. Diferentes diluciones del suero de rata y del anticuerpo conjugado para la estandarización.** Dilución 1: suero de rata 1/80 y anticuerpo conjugado 1/1000. Dilución 2: suero de rata 1/100 y anticuerpo conjugado 1/500. Dilución 3: suero de rata 1/50 y anticuerpo conjugado 1/1000. 1: Suero de rata 3 días post infección. 2: Suero de rata 7 días post infección. 3: Suero de rata 15 días post infección. 4: Suero de rata 30 días post infección. 5: Suero de rata 60 días post infección. CN: Control negativo. CP: Control positivo.

### 6.5.1.3 Sueros de ratas enfrentados a antígenos de membrana (AM)

Se observó el resultado de la prueba de Western blot al enfrentar los sueros de las ratas a los 3, 7, 15, 30 y 60 días post infección contra los antígenos de membrana; las bandas se mostraron con mayor intensidad para IgG, mientras que para la detección de IgM la intensidad de las bandas bajó y se marcaron solamente en fase aguda en el suero de rata 7 dpi, las 3 bandas que se observaron son de pesos moleculares de 20, 30 y 70 kDa y coincidieron con el control positivo.

Para la detección de anticuerpos IgG, se observaron bandas que se repiten desde el día 7 dpi (2) hasta el día 60 dpi (5), los pesos moleculares que se detectaron son 18, 20, 28, 30, 34, 37, 50, 62, 68, 125 kDa. En la rata sacrificada a los 3 dpi (1) se observaron sólo 3 bandas de 30, 55, 68 kDa de peso molecular. En la fase crónica, es decir las ratas 15, 30 y 60 dpi (3, 4 y 5) se observaron 2 bandas que no se repitieron en la fase aguda (1 y 2), las cuales tienen pesos moleculares de 75 y 80 kDa (figura N° 13).



**Figura N° 13. Western blot (SDS-PAGE 12 %) de antígeno de membrana de *T. gondii* enfrentado a suero de rata.** Sueros incubados en diluciones de 1:50 para IgM y 1:80 para IgG. Los anticuerpos conjugados anti-IgM diluidos 1:500 y anti-IgG 1:1000. M: Marcador de peso molecular. 1: Suero de rata 3 días post infección. 2: Suero de rata 7 días post infección. 3: Suero de rata 15 días post infección. 4: Suero de rata 30 días post infección. 5: Suero de rata 60 días post infección. CN: Suero de rata control. CP: Suero de rata inmunizada.

### **6.5.2 Determinación del Western blot de sueros humanos contra los antígenos: Antígeno total lisado (TLA), Excretos/Secretores (E/S) y antígenos de membrana (AM) de *Toxoplasma gondii***

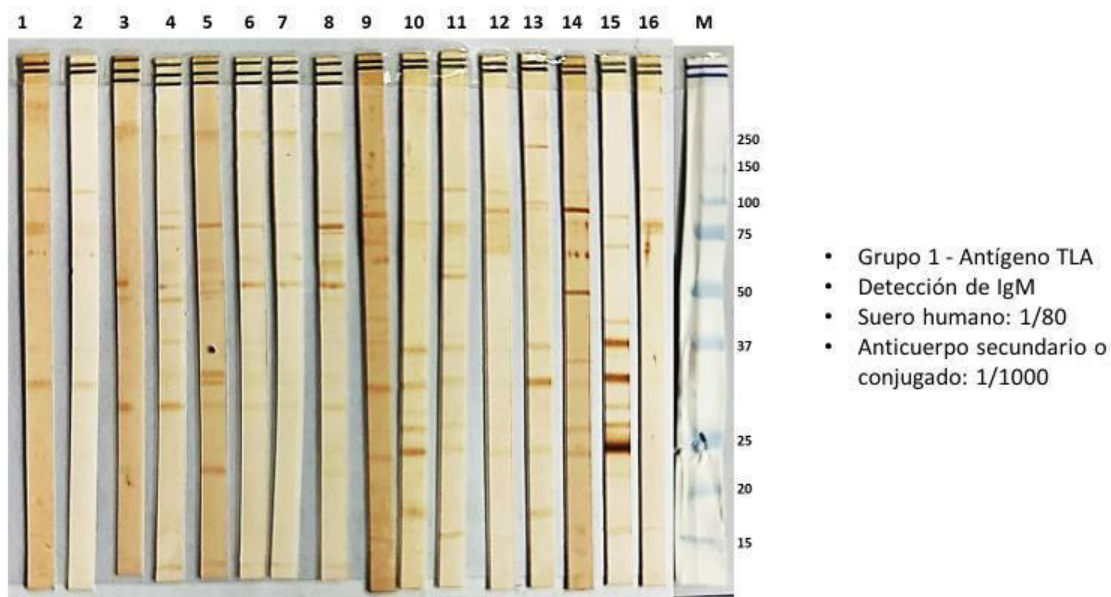
Se enfrentaron los grupos G1 (fase aguda), grupo G2 (fase crónica) y grupo G3 (pacientes inmunocompetentes) contra los 3 antígenos obtenidos. Los pesos moleculares colocados para cada banda (25 en total) se tomaron como referencia de las bandas reconocidas al enfrentarse sueros de ratas con TLA, y se adicionaron otras bandas conocidas mediante la literatura científica (Marcolino et al., 2000; Mohammadpour et al., 2016; Patel et al., 2017; González et al., 2018).

### 6.5.2.1 Determinación del Western blot Grupo 1 - Población VIH fase aguda

#### 6.5.2.1.1 Determinación del Western blot del Grupo 1 - Detección de IgM

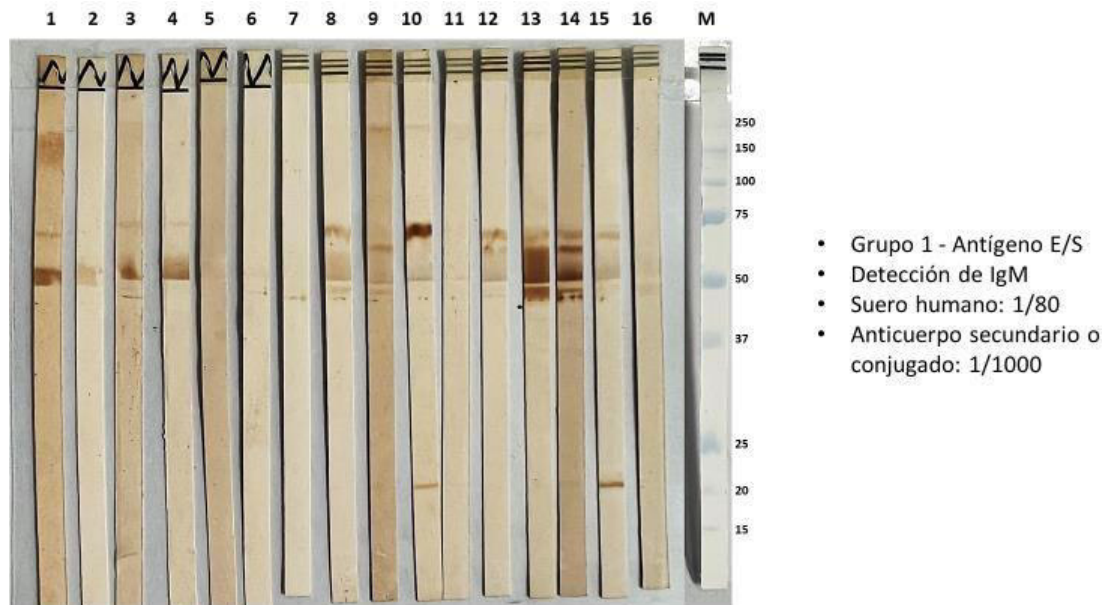
Se enfrentaron los antígenos TLA, E/S y AM con los sueros humanos del grupo 1 (Población VIH fase aguda) y se realizó la detección de IgM.

Para el antígeno TLA la bandas que se observaron fueron 20, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 70, 75 y 80 kDa (Figura N° 14) todas las bandas tuvieron diferentes frecuencias, es decir, no se observaron en todos los Western blot (Tabla N° 3)



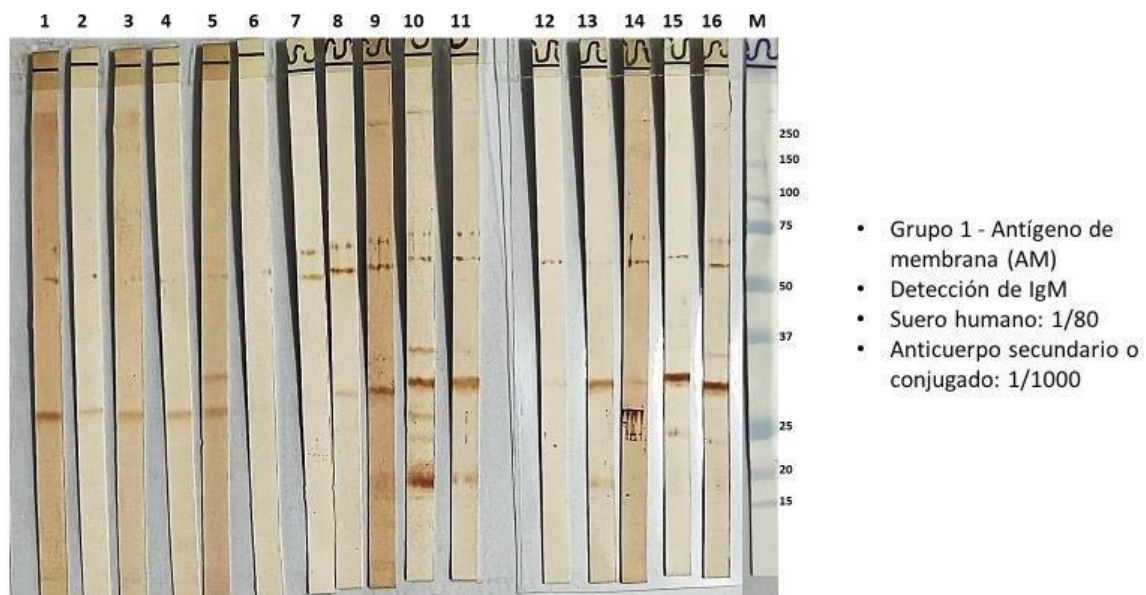
**Figura N° 14. Western blot (SDS-page 12 %) TLA enfrentado a sueros del grupo 1 (G1). Detección de IgM, suero humano diluído 1:80 y anticuerpo conjugado diluído 1:1000.**

Para el antígeno E/S la bandas que se observaron fueron 20, 42, 70, 80 y 90 kDa (Figura N° 15) todas las bandas tuvieron diferentes frecuencias, es decir, no se observaron en todos los Western blot (Tabla N° 3)



**Figura N° 15. Western blot (SDS-page 12 %) antígeno E/S enfrentado a sueros del grupo 1 (G1).** Detección de IgM, suero humano diluido 1:80 y anticuerpo conjugado diluido 1:1000.

Para el antígeno AM la bandas que se observaron fueron 18, 20, 25, 28, 30, 34, 55 y 70 kDa (Figura N° 16) todas las bandas tuvieron diferentes frecuencias, es decir, no se observaron en todos los Western blot (Tabla N° 3)



**Figura N° 16. Western blot (SDS-page 12 %) antígeno de membrana (AM) enfrentado a sueros del grupo 1 (G1).** Detección de IgM, suero humano diluido 1:80 y anticuerpo conjugado diluido 1:1000.

Se calcularon y observaron las frecuencias de bandas, para el antígeno TLA las bandas 20, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 70, 75 y 80 kDa, obtuvieron frecuencias absolutas de 1, 6, 3, 3, 15, 4, 3, 2, 2, 2, 5, 5, 1, 1, 2 y 1, respectivamente. Para el antígeno E/S las bandas 20, 42, 70, 80 y 90 kDa, tuvieron frecuencias de 2, 12, 7, 1 y 2, respectivamente. En el antígeno AM,

las bandas 18, 20, 25, 28, 30, 34, 55 y 70 kDa, tuvieron frecuencias de 1, 3, 3, 1, 13, 3, 15 y 8, respectivamente (Tabla N° 3).

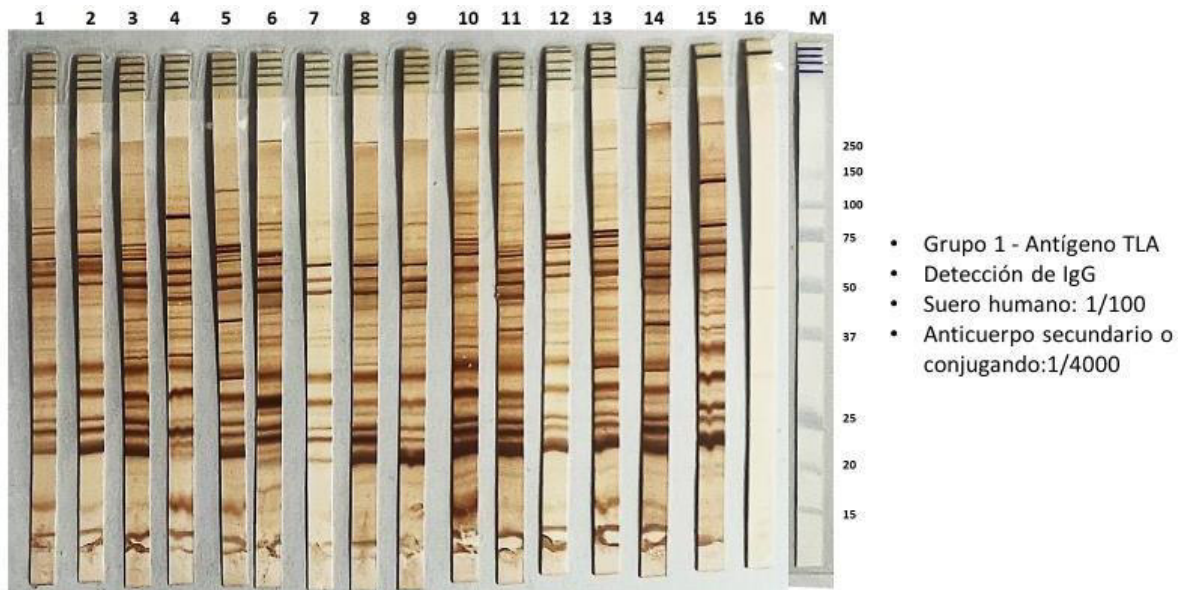
**Tabla N° 3.** Frecuencia absoluta y relativa de las bandas inmunoreactivas observadas para los antígenos TLA, E/S y AM enfrentados con los sueros del grupo 1 para la detección de IgM.

<b>Grupo 1 (G1) - IgM</b>						
<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>TLA</b>	<b>n = 16 (f)</b>	<b>E/S</b>	<b>n = 16 (f)</b>	<b>AM</b>	<b>n = 16 (f)</b>
10	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	0.06
19	0	0	0	0	0	0
20	1	0.06	2	0.125	3	0.18
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	6	0.37	0	0	3	0.18
28	3	0.18	0	0	1	0.06
30	3	0.18	0	0	13	0.81
34	15	0.93	0	0	3	0.18
37	4	0.25	0	0	0	0
42	3	0.18	12	0.75	0	0
48	2	0.12	0	0	0	0
50	2	0.12	0	0	0	0
55	2	0.12	0	0	15	0.93
62	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0
70	5	0.31	7	0.43	8	0.5
75	5	0.31	0	0	0	0
80	1	0.06	1	0.06	0	0
90	0	0	2	0.125	0	0
95	0	0	0	0	0	0
125	12	0.75	0	0	0	0
250	1	0.06	0	0	0	0

### 6.5.2.1.2 Determinación del Western blot del Grupo 1 - Detección de IgG

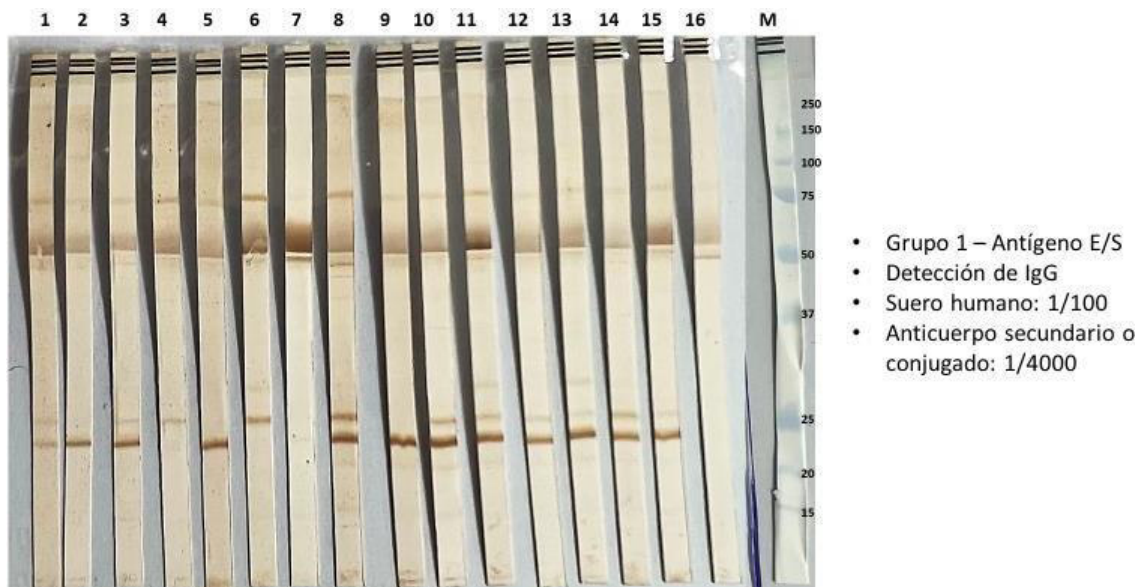
Se enfrentaron los antígenos TLA, E/S y AM con los sueros humanos del grupo 1 (Población VIH fase aguda) y se realizó la detección de IgG.

Para el antígeno TLA las bandas que se observaron fueron 10, 15, 18, 19, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 62, 68, 70, 75, 80 y 90 kDa (Figura N° 17).



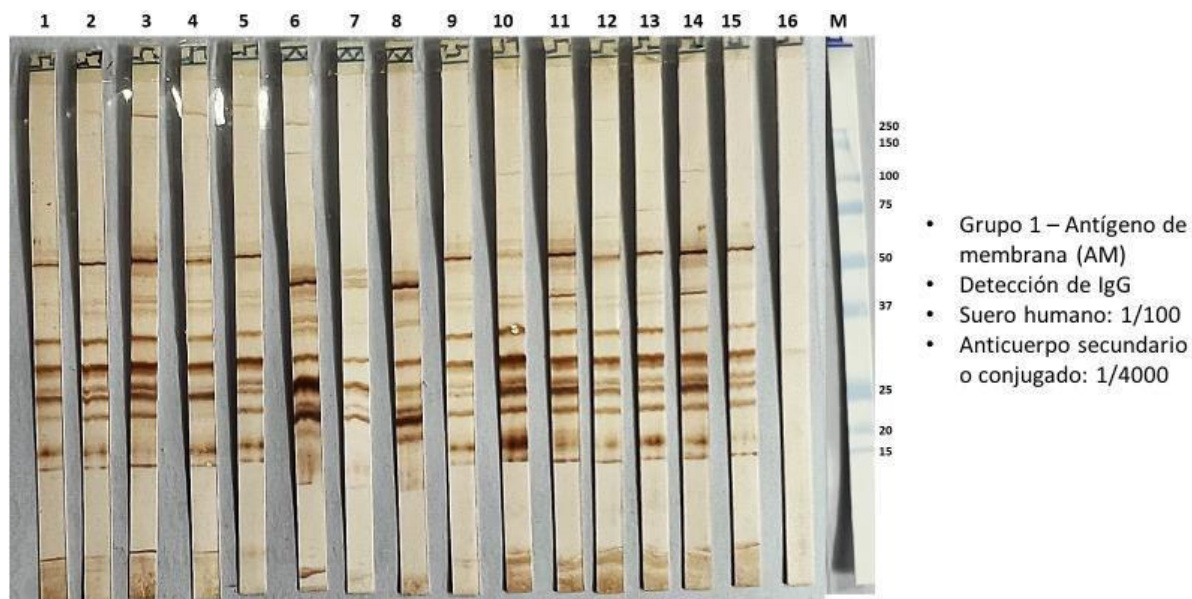
**Figura N° 17. Western blot (SDS-page 12 %) TLA enfrentado a sueros del grupo 1 (G1).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Para el antígeno E/S las bandas que se observaron fueron 25, 28, 50 y 80 kDa, todos los Western blot presentaron al menos una banda (Figura N° 18).



**Figura N° 18. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno E/S enfrentado a sueros del grupo 1 (G1).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Para el antígeno AM las bandas que se observaron fueron 18, 20, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 55 y 62 kDa; se observó que las bandas se marcaron con bastante intensidad (Figura N° 19).



**Figura N° 19. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno de membrana (AM) enfrentado a sueros del grupo 1 (G1).** Detección de IgG, suero humano diluido 1:100 y anticuerpo conjugado diluido 1:4000.

Se calcularon y observaron las frecuencias de bandas, para el antígeno TLA las bandas 10, 15 y 55 kDa se observaron todas los Western blot, las bandas 20 y 23 kDa no se observaron en ninguna. Los resultados del antígeno E/S mostraron las bandas, 25, 28, 50 y 80 kDa, con frecuencias de 12, 11 y 16, respectivamente, de un total de 16 sueros. En el antígeno AM, las bandas 18, 20, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 55 y 62 kDa, obtuvieron las frecuencias 15, 15, 15, 15, 14, 15, 15, 14, 14, 3, 15, respectivamente (Tabla N° 4).

**Tabla N° 4.** Frecuencia absoluta y relativa de las bandas inmunoreactivas observadas para los antígenos TLA, E/S y AM enfrentados con los sueros del grupo 1 para la detección de IgG.

Grupo 1 (G1) - IgG						
Peso molecular (kDa)	TLA	n = 16 (f)	E/S	n = 16 (f)	AM	n = 16 (f)
10	16	1	0	0	0	0
15	16	1	0	0	0	0
18	2	0.125	0	0	15	0.93
19	14	0.875	0	0	0	0
20	0	0	0	0	15	0.93
23	0	0	0	0	0	0
24	15	0.93	0	0	0	0
25	15	0.93	12	0.75	15	0.93
28	15	0.93	11	0.68	15	0.93
30	15	0.93	0	0	14	0.87
34	13	0.81	0	0	15	0.93
37	15	0.93	0	0	15	0.93
42	15	0.93	0	0	14	0.87
48	11	0.68	0	0	14	0.87
50	13	0.81	16	1	0	0
55	16	1	0	0	3	0.18



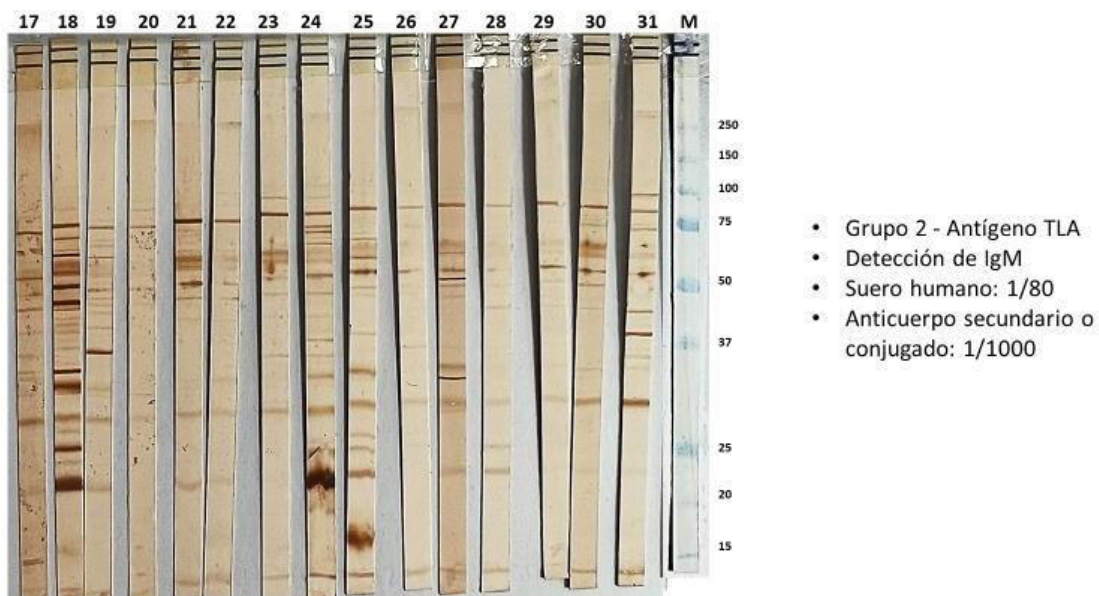
62	15	0.93	0	0	15	0.93
68	7	0.43	0	0	0	0
70	14	0.87	0	0	0	0
75	13	0.81	0	0	0	0
80	15	0.93	16	1	0	0
90	5	0.31	0	0	0	0
95	14	0.87	0	0	0	0
125	12	0.75	0	0	0	0
250	5	0.31	0	0	0	0

## 6.5.2.2 Determinación del Western blot del Grupo 2 - Población VIH fase crónica

### 6.5.2.2.1 Determinación del Western blot del Grupo 2 - Detección de IgM

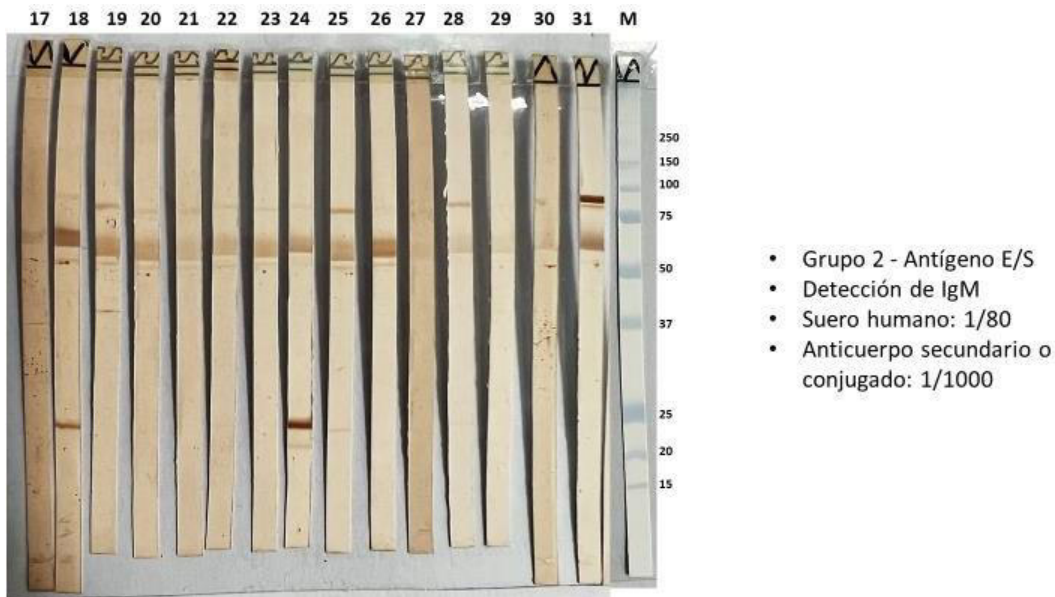
Se enfrentaron los antígenos TLA, E/S y AM con los sueros humanos del grupo 2 (Población VIH fase crónica) y se realizó la detección de IgM.

Para el antígeno TLA las bandas que se observaron fueron 18, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 50, 55, 62, 68, 70, 75 y 90 kDa (Figura N° 20).



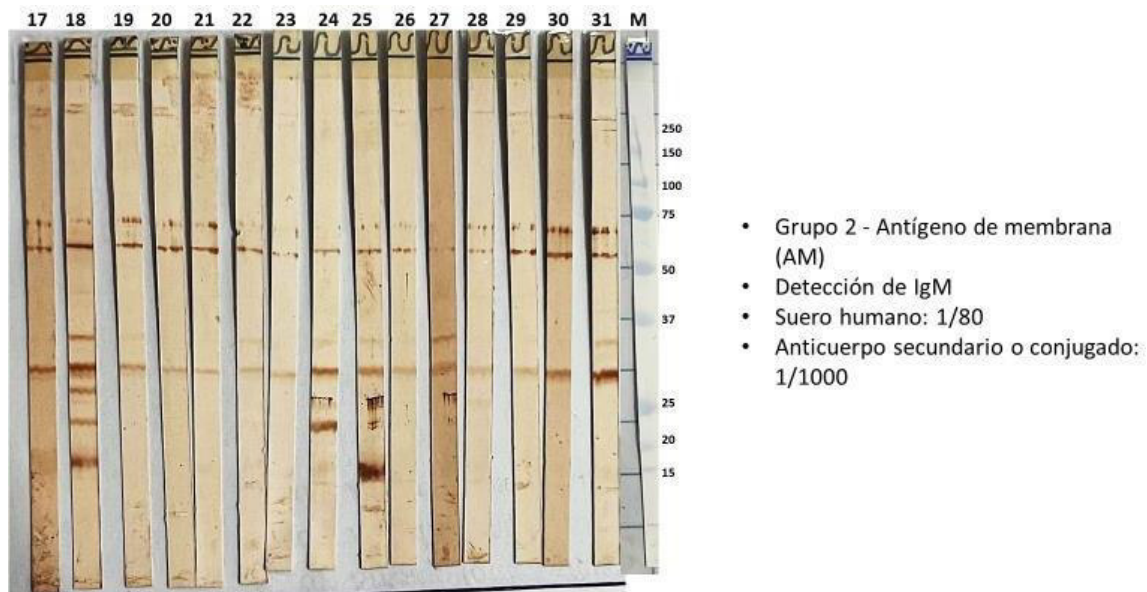
**Figura N° 20. Western blot (SDS-page 12 %) TLA enfrentado a sueros del grupo 2 (G2). Detección de IgM, suero humano diluido 1:80 y anticuerpo conjugado diluido 1:1000.**

Para el antígeno E/S las bandas que se observaron fueron tres bandas con baja intensidad 25, 42 y 90 kDa (Figura N° 21).



**Figura N° 21. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno E/S enfrentado a sueros del grupo 2 (G2).** Detección de IgM, suero humano diluído 1:80 y anticuerpo conjugado diluído 1:1000.

Para el antígeno AM las bandas que se observaron 20, 25, 30, 34, 55 y 70 kDa (Figura N° 22).



**Figura N° 22. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno de membrana (AM) enfrentado a sueros del grupo 2 (G2).** Detección de IgM, suero humano diluído 1:80 y anticuerpo conjugado diluído 1:1000.

Las bandas del antígeno TLA 18, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 50, 55, 62, 68, 70, 75 y 90 kDa, tuvieron frecuencias de 2, 3, 1, 1, 13, 4, 2, 1, 3, 2, 10, 10, 3, 3 y 12, respectivamente. Las bandas del antígeno E/S, 25, 42 y 90 kDa, tuvieron frecuencias de 2, 10 y 11, respectivamente. Las bandas del antígeno AM, 20, 25, 30, 34, 55 y 70 kDa tuvieron frecuencias de 1, 2, 15, 3, 15 y 10, respectivamente (Tabla N° 5).

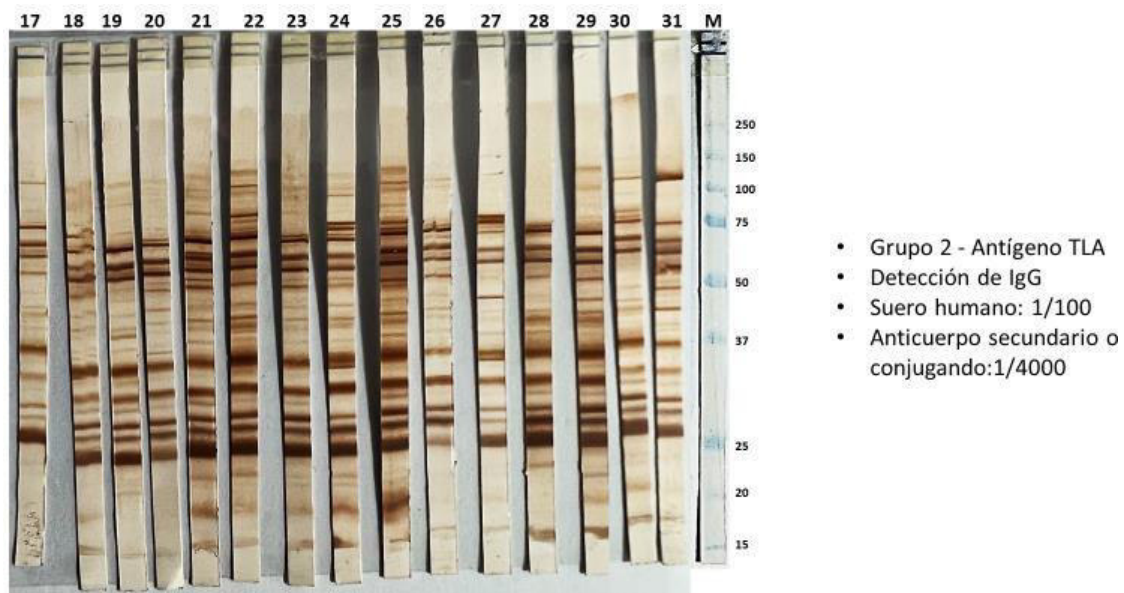
**Tabla N° 5.** Frecuencia absoluta y relativa de las bandas inmunoreactivas observadas para los antígenos TLA, E/S y AM enfrentados con los sueros del grupo 2 para la detección de IgM.

<b>Grupo 2 (G2) - IgM</b>						
<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>TLA</b>	<b>n = 15 (f)</b>	<b>E/S</b>	<b>n = 15 (f)</b>	<b>AM</b>	<b>n = 15 (f)</b>
10	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
18	2	0.133	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1	0.06
23	0	0	0	0	0	0
24	3	0.2	0	0	0	0
25	1	0.06	2	0.133	2	0.133
28	1	0.06	0	0	0	0
30	13	0.86	0	0	15	1
34	4	2.66	0	0	3	0.2
37	2	0.133	0	0	0	0
42	1	0.06	10	0.66	0	0
48	0	0	0	0	0	0
50	3	0.2	0	0	0	0
55	2	0.133	0	0	15	1
62	10	0.66	0	0	0	0
68	10	0.66	0	0	0	0
70	3	0.2	0	0	10	0.66
75	3	0.2	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0
90	12	0.8	11	0.73	0	0
95	0	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0

#### 6.5.2.2.2 Determinación del Western blot del Grupo 2 - Detección de IgG

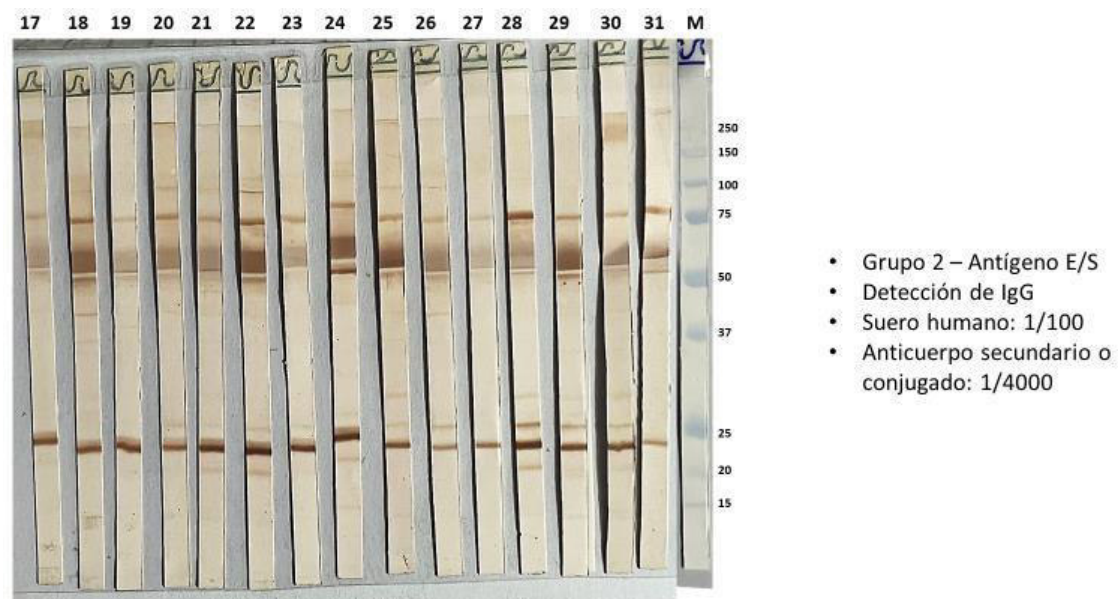
Se enfrentaron los antígenos TLA, E/S y AM con los sueros humanos del grupo 2 (Población VIH fase crónica) y se realizó la detección de IgG.

Para el antígeno TLA las bandas que se observaron fueron 10, 15, 19, 23, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 62, 68, 70, 75, 90, 95, 125 y 250 kDa (Figura N° 23).



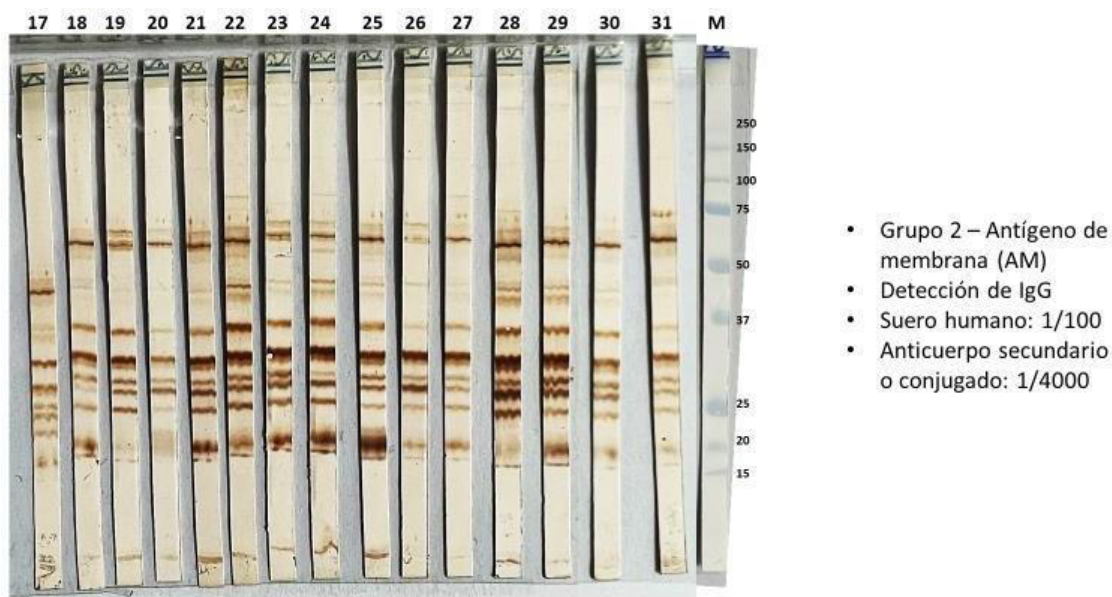
**Figura N° 23. Western blot (SDS-page 12 %) TLA enfrentado a sueros del grupo 2 (G2).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Para el antígeno E/S las bandas que se observaron fueron 25, 28, 50 y 80 kDa (Figura N° 24).



**Figura N° 24. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno E/S enfrentado a sueros del grupo 2 (G2).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Para el antígeno AM las bandas que se observaron fueron 23, 24, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 75 y 80 kDa (Figura N° 25).



**Figura N° 25. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno de membrana (AM) enfrentado a sueros del grupo 2 (G2).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Las bandas del antígeno TLA 10, 15, 19, 23, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 62, 68, 70, 75, 90, 95, 125 y 250 kDa, tuvieron frecuencias de 15, 14, 8, 8, 3, 15, 15, 15, 15, 15, 8, 12, 6, 11, 15, 15, 15, 15, 2, 6, 5 y 2, respectivamente. Las bandas del antígeno E/S, 25, 28, 50 y 80 kDa, tuvieron frecuencias de 15, 10, 15 y 15, respectivamente. Las bandas del antígeno AM, 23, 24, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 75 y 80 kDa tuvieron frecuencias de 13, 14, 15, 15, 15, 15, 15, 7, 9, 14, 11, respectivamente (Tabla N° 6).

**Tabla N° 6.** Frecuencia absoluta y relativa de las bandas inmunoreactivas observadas para los antígenos TLA, E/S y AM enfrentados con los sueros del grupo 2 para la detección de IgG.

Grupo 2 (G2) - IgG						
Peso molecular (kDa)	TLA	n = 15 (f)	E/S	n = 15 (f)	AM	n = 15 (f)
10	15	1	0	0	0	0
15	14	0.93	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	8	0.53	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
23	8	0.53	0	0	13	0.86
24	3	0.2	0	0	14	0.93
25	15	1	15	1	0	0
28	15	1	10	0.66	15	1
30	15	1	0	0	15	1
34	15	1	0	0	15	1
37	15	1	0	0	15	1
42	8	0.53	0	0	15	1
48	12	0.8	0	0	7	0.46
50	6	0.4	15	1	9	0.6
55	11	0.73	0	0	0	0

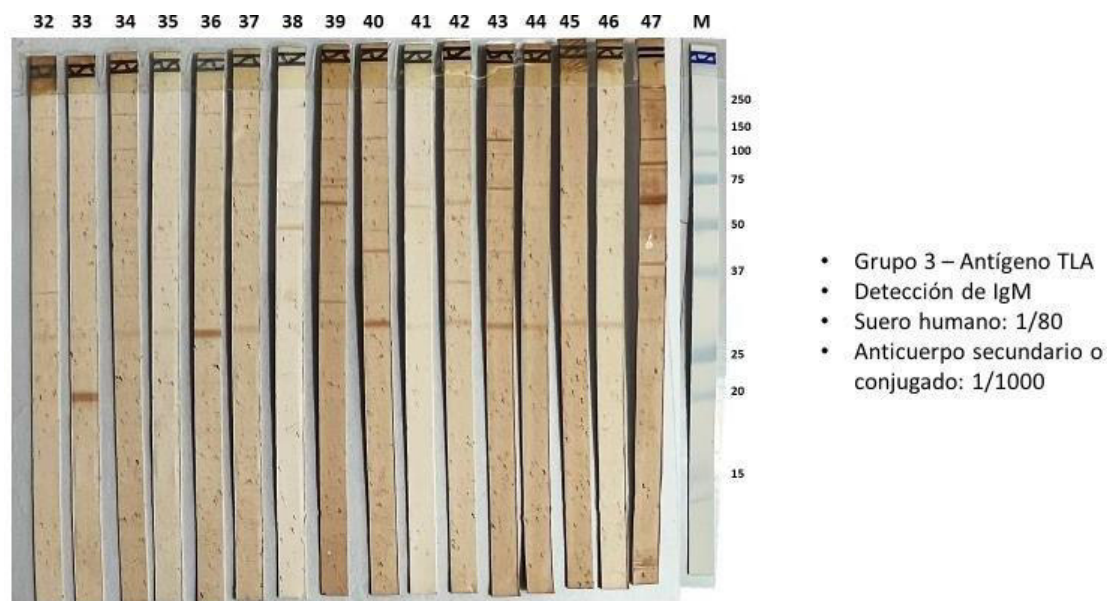
62	15	1	0	0	0	0
68	15	1	0	0	0	0
70	15	1	0	0	0	0
75	15	1	0	0	14	0.93
80	0	0	15	1	11	0.73
90	2	0.133	0	0	0	0
95	6	0.4	0	0	0	0
125	5	0.33	0	0	0	0
250	2	0.133	0	0	0	0

### 6.5.2.3 Determinación del Western blot del Grupo 3 - Población Inmunocompetente

#### 6.5.2.3.1 Determinación del Western blot del Grupo 3 - IgM

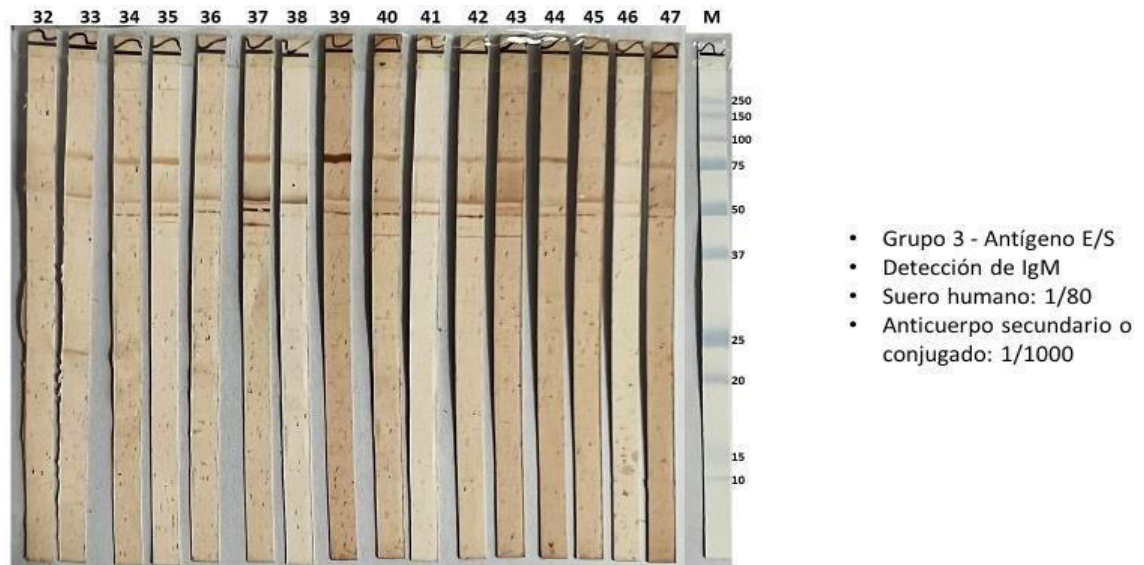
Se enfrentaron los antígenos TLA, E/S y AM con los sueros humanos del grupo 3 (Población inmunocompetente) y se realizó la detección de IgM.

Para el antígeno TLA las bandas que se observaron fueron 24, 30, 70, 75, 95 y 125 kDa (Figura N° 26).



**Figura N° 26. Western blot (SDS-page 12 %) TLA enfrentado a sueros del grupo 3 (G3). Detección de IgM, suero humano diluido 1:80 y anticuerpo conjugado diluido 1:1000.**

Para el antígeno E/S la única banda que se observó fue 80 kDa (Figura N° 27).



**Figura N° 27. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno E/S enfrentado a sueros del grupo 3 (G3).** Detección de IgM, suero humano diluído 1:80 y anticuerpo conjugado diluído 1:1000.

Para el antígeno AM las bandas que se observaron fueron 20 y 34 kDa (Figura N° 28).



**Figura N° 28. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno de membrana (AM) enfrentado a sueros del grupo 3 (G3).** Detección de IgM, suero humano diluído 1:80 y anticuerpo conjugado diluído 1:1000.

Las bandas del antígeno TLA 24, 30, 70, 75, 95 y 125 kDa, tuvieron frecuencias de 7, 1, 2, 1, 1 y 4, respectivamente. La banda del antígeno E/S, 80 kDa, tuvo una frecuencia de 14. Las bandas del antígeno AM, 20 y 34 kDa, tuvieron frecuencias de 1 y 13, respectivamente (Tabla N° 7).

**Tabla N° 7.** Frecuencia absoluta y relativa de las bandas inmunoreactivas observadas para los antígenos TLA, E/S y AM enfrentados con los sueros del grupo 3 para la detección de IgM.

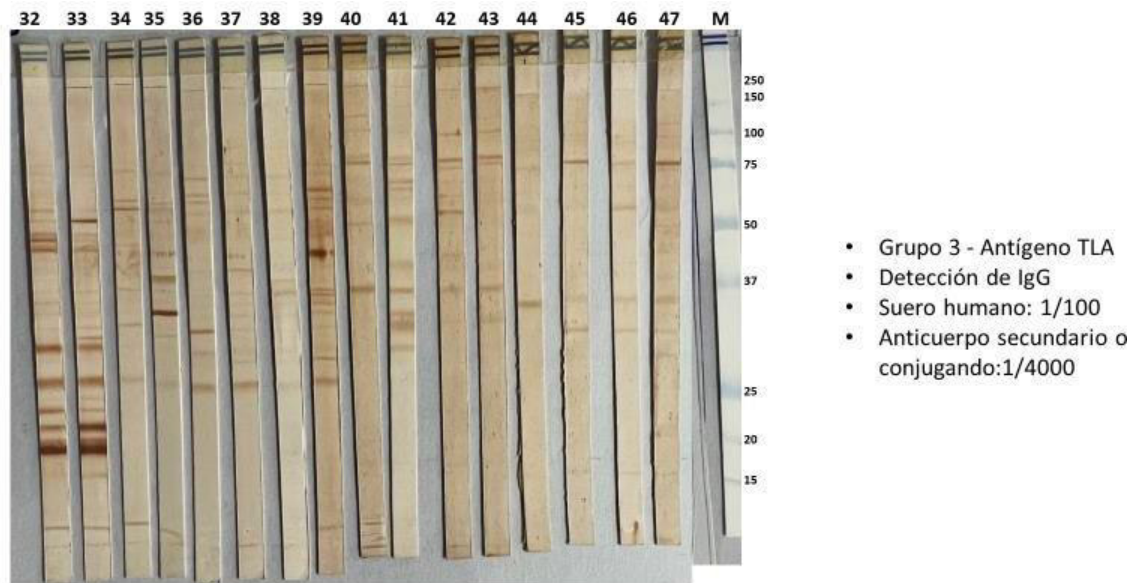
<b>Grupo 3 (G3) - IgM</b>						
Peso molecular (kDa)	TLA	n = 16 (f)	E/S	n = 16 (f)	AM	n = 16 (f)
10	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1	0.625
23	0	0	0	0	0	0
24	7	0.43	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
30	1	0.06	0	0	0	0
34	0	0	0	0	13	0.81
37	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0
70	2	0.125	0	0	0	0
75	1	0.06	0	0	0	0
80	0	0	14	0.875	0	0
90	0	0	0	0	0	0
95	1	0.06	0	0	0	0
125	4	0.25	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0

### 6.5.2.3.1 Determinación del Western blot del Grupo 3 - IgG

Se enfrentaron los antígenos TLA, E/S y AM con los sueros humanos del grupo 3 (Población inmunocompetente) y se realizó la detección de IgG.

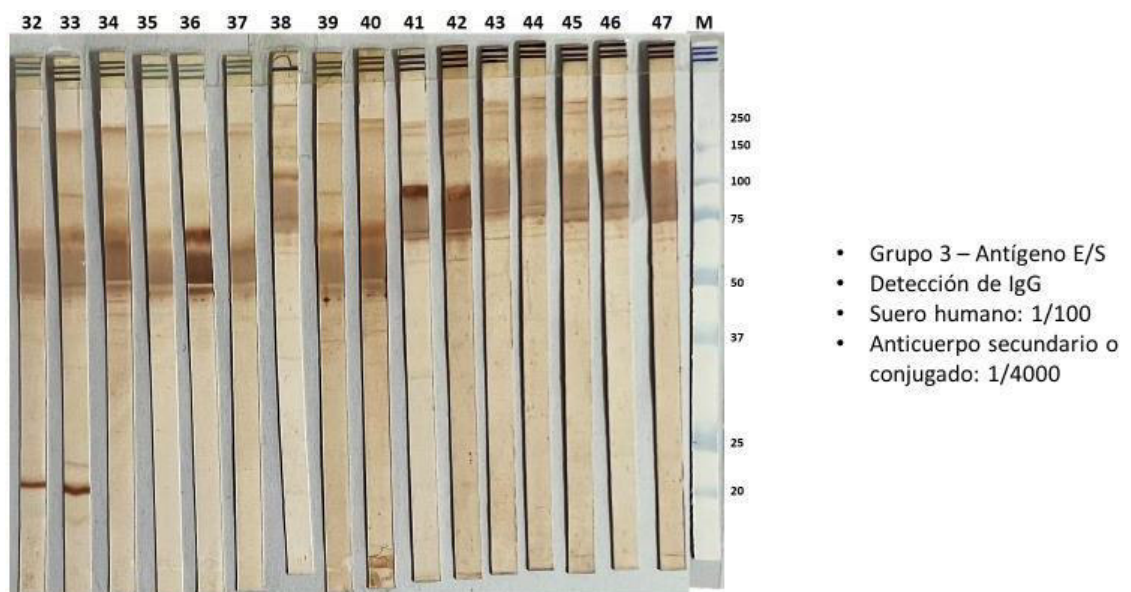
Para el antígeno TLA las bandas que se observaron fueron 10, 15, 20, 23, 24, 25, 28, 30, 34, 50, 55, 62, 68, 75 y 95 kDa (Figura N° 29).





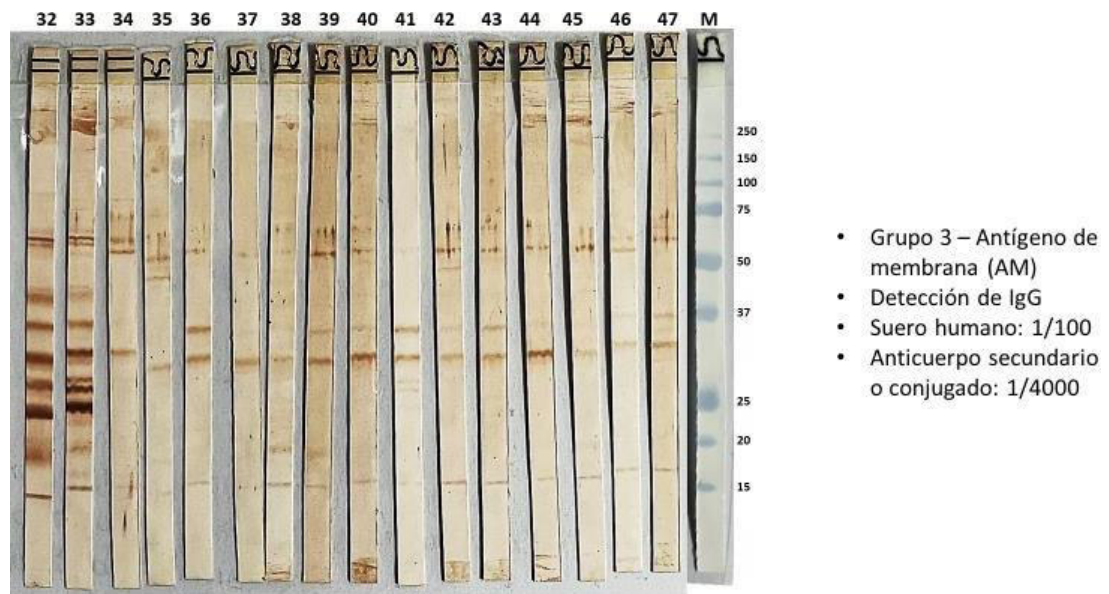
**Figura N° 29. Western blot (SDS-page 12 %) TLA enfrentado a sueros del grupo 3 (G3).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Para el antígeno E/S las bandas que se observaron fueron 25 y 50 kDa (Figura N° 30).



**Figura N° 30. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno E/S enfrentado a sueros del grupo 3 (G3).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Para el antígeno AM las bandas que se observaron fueron 34, 37, 50, 55 y 68 kDa (Figura N° 31).



**Figura N° 31. Western blot (SDS-page 12 %) Antígeno de membrana (AM) enfrentado a sueros del grupo 3 (G3).** Detección de IgG, suero humano diluído 1:100 y anticuerpo conjugado diluído 1:4000.

Las bandas del antígeno TLA 10, 15, 20, 23, 24, 25, 28, 30, 34, 50, 55, 62, 68, 75 y 95 kDa, tuvieron frecuencias de 8, 5, 5, 2, 2, 2, 2, 7, 7, 3, 3, 5, 3, 4 y 5, respectivamente. Las bandas del antígeno E/S, 25 y 50 kDa, tuvieron frecuencias de 2 y 15, respectivamente. Las bandas del antígeno AM, 34, 37, 50, 55 y 68 kDa, tuvieron frecuencias de 16, 11, 4, 15 y 12, respectivamente (Tabla N° 8).

**Tabla N° 8.** Frecuencia absoluta y relativa de las bandas inmunoreactivas observadas para los antígenos TLA, E/S y AM enfrentados con los sueros del grupo 3 para la detección de IgG.

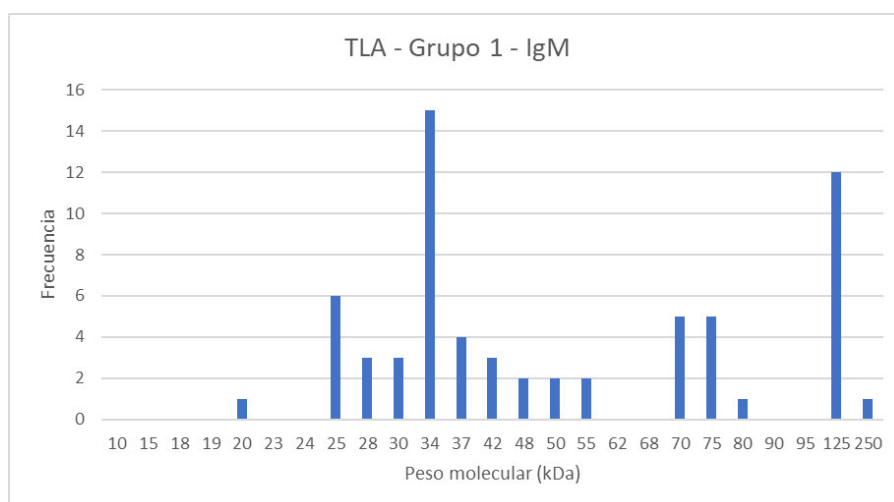
Grupo 3 (G3) - IgG						
Peso molecular (kDa)	TLA	n = 16 (f)	E/S	n = 16 (f)	AM	n = 16 (f)
10	8	0.5	0	0	0	0
15	5	0.31	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	5	0.31	0	0	0	0
23	2	0.125	0	0	0	0
24	2	0.125	0	0	0	0
25	2	0.125	2	0.125	0	0
28	2	0.125	0	0	0	0
30	7	0.43	0	0	0	0
34	7	0.43	0	0	16	1
37	0	0	0	0	11	0.68
42	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0
50	3	0.18	15	0.93	4	0.25

55	3	0.18	0	0	15	0.93
62	5	0.31	0	0	0	0
68	3	0.18	0	0	12	0.75
70	0	0	0	0	0	0
75	4	0.25	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0
95	5	0.31	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0

### 6.5.3 Frecuencias de bandas inmunoreactivas

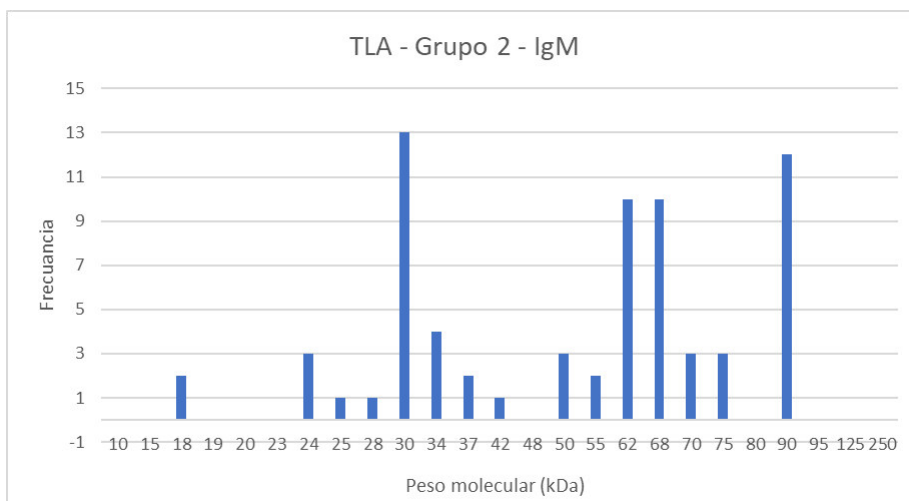
#### 6.5.3.1 Frecuencia de bandas antígeno TLA - Anti IgM

Usando el antígeno TLA y detección IgM para el grupo 1, las frecuencias de las bandas observadas, 20, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 70, 75 y 80 kDa, fueron 1, 6, 3, 3, 15, 4, 3, 2, 2, 2, 5, 5, 1, 1, 2 y 1, respectivamente (Gráfico 1).



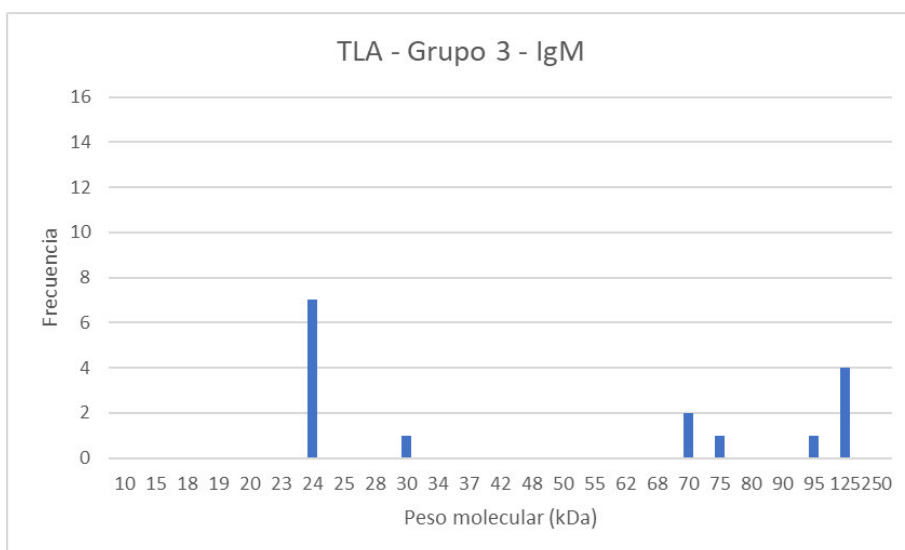
**Gráfico 1.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 1 (fase aguda) utilizando TLA.

Usando el antígeno TLA y detección IgM para el grupo 2, las frecuencias de las bandas observadas, 18, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 50, 55, 62, 68, 70, 75 y 90 kDa, fueron 2, 3, 1, 1, 13, 4, 2, 1, 3, 2, 10, 10, 3, 3 y 12, respectivamente (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 2 (fase crónica) utilizando TLA.

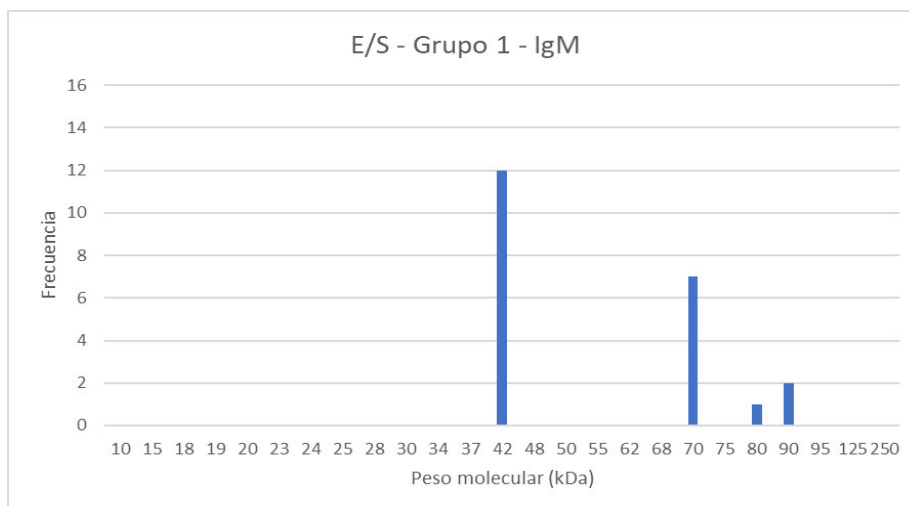
Usando el antígeno TLA y detección IgM para el grupo 3, las frecuencias de las bandas observadas, 24, 30, 70, 75, 95 y 125 kDa, fueron 7, 1, 2, 1, 1 y 4, respectivamente (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 3 (Grupo inmunocompetente) utilizando TLA.

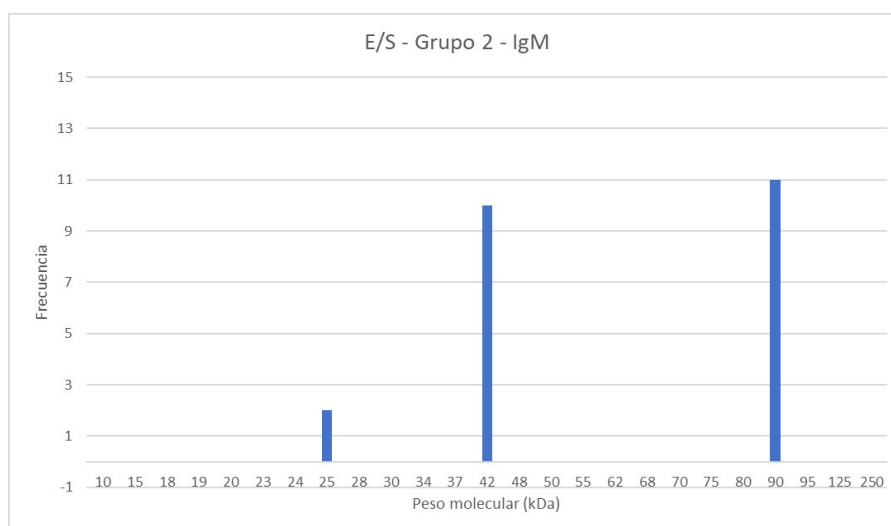
### 6.5.3.2 Frecuencia de bandas antígeno E/S - Anti IgM

Usando el antígeno E/S y detección IgM para el grupo 1, las frecuencias de las bandas observadas, 20, 42, 70, 80 y 90 kDa, fueron 2, 12, 7, 1 y 2, respectivamente (Gráfico 4).



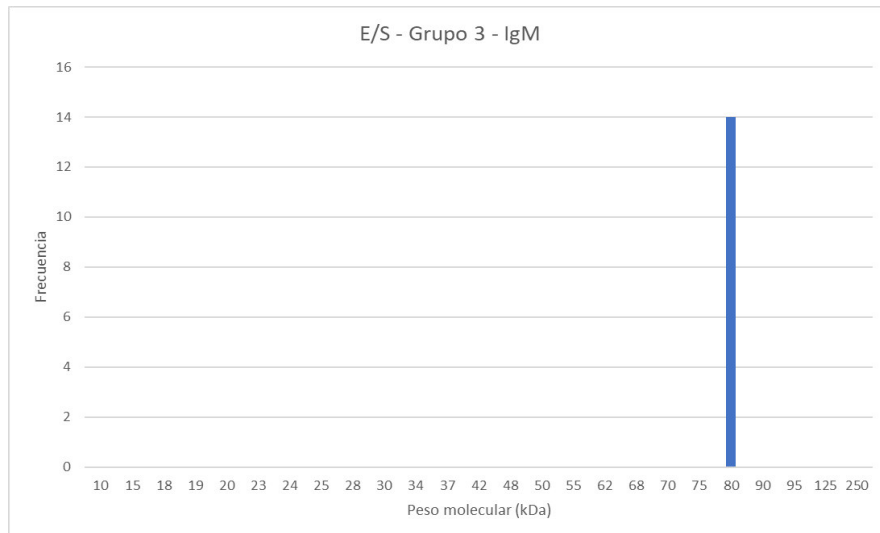
**Gráfico 4.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 1 (fase aguda) utilizando antígeno E/S.

Usando el antígeno E/S y detección IgM para el grupo 2, las frecuencias de las bandas observadas, 25, 42 y 90 kDa, fueron 2, 10 y 11, respectivamente (Gráfico 5).



**Gráfico 5.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 2 (fase crónica) utilizando antígeno E/S.

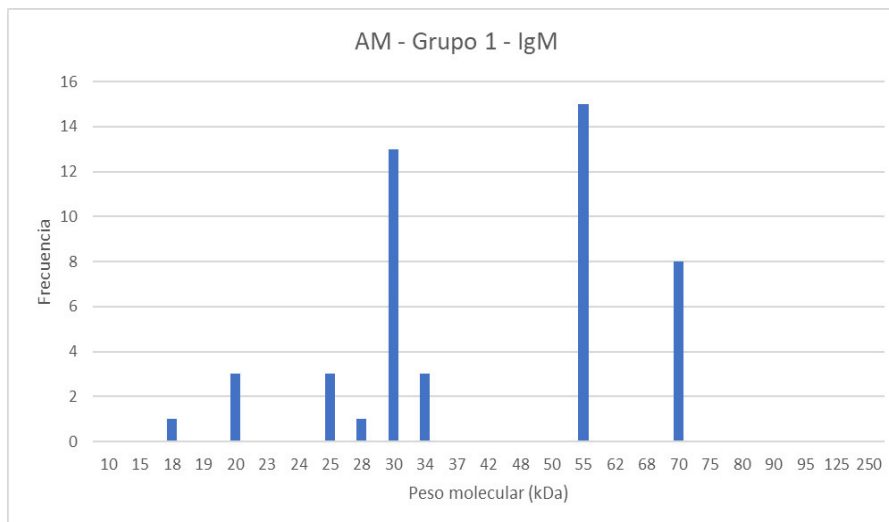
Usando el antígeno E/S y detección IgM para el grupo 3, la frecuencia de la única banda observada, 80 kDa, fue de 14 (Gráfico 6).



**Gráfico 6.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 3 (Grupo inmunocompetente) utilizando antígeno E/S.

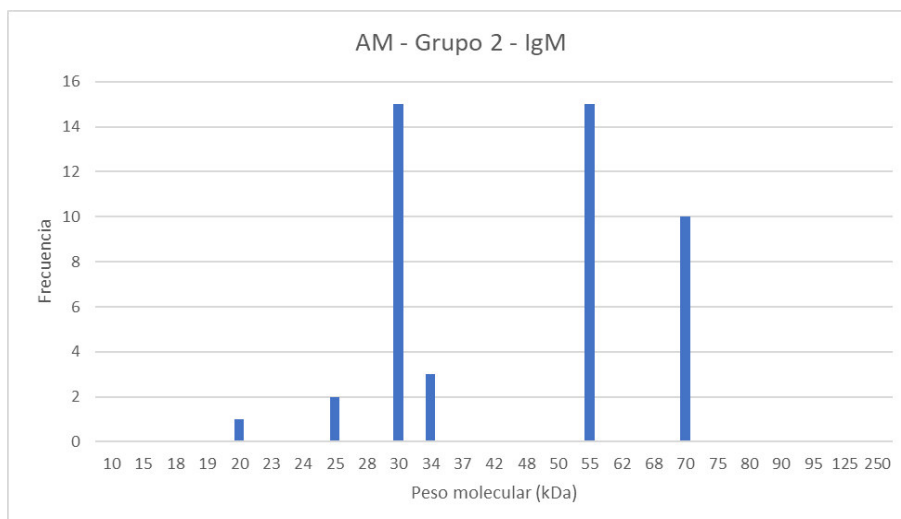
### 6.5.3.3 Frecuencia de bandas antígeno AM – Anti IgM

Usando el antígeno AM y detección IgM para el grupo 1, las frecuencias de las bandas observadas, 18, 20, 25, 28, 30, 34, 55 y 70 kDa, fueron 1, 3, 3, 1, 13, 3, 15 y 8, respectivamente (Gráfico 7).



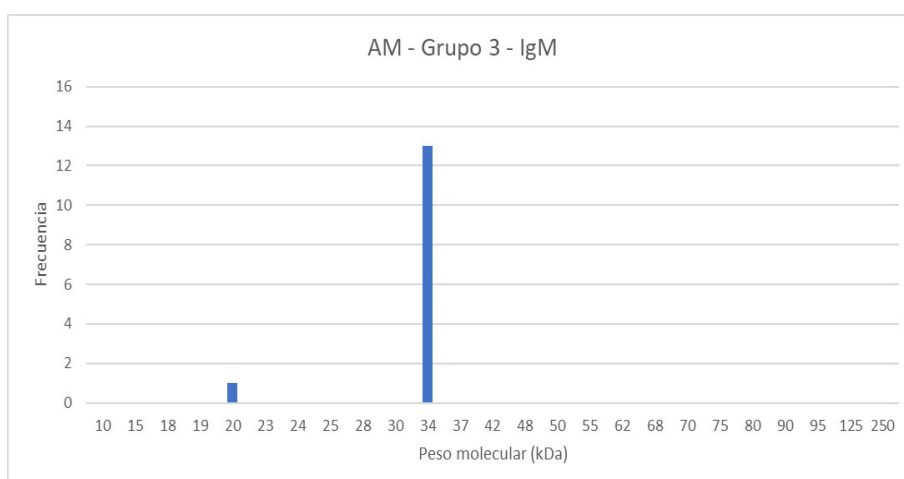
**Gráfico 7.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 1 (Fase aguda) utilizando antígeno de membrana (AM).

Usando el antígeno AM y detección IgM para el grupo 2, las frecuencias de las bandas observadas, 20, 25, 30, 34, 55 y 70 kDa, fueron 1, 2, 15, 3, 15 y 10, respectivamente (Gráfico 8).



**Gráfico 8.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 2 (Fase crónica) utilizando antígeno de membrana (AM).

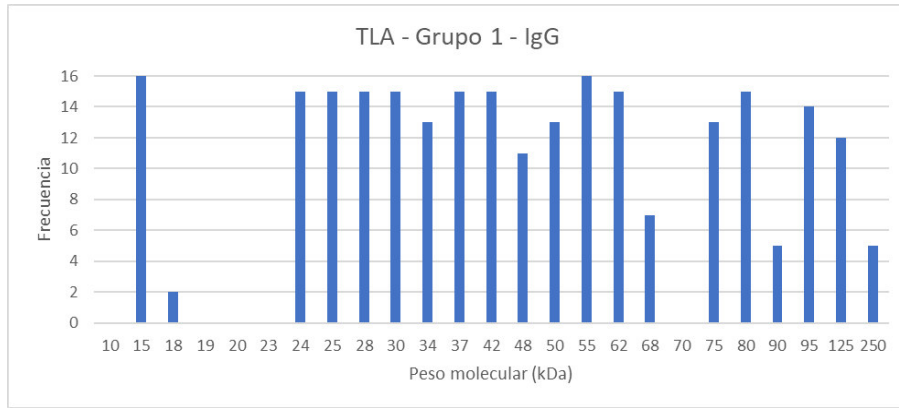
Usando el antígeno AM y detección IgM para el grupo 2, las frecuencias de las bandas observadas, 20 y 34 kDa, fueron 1 y 13, respectivamente (Gráfico 9).



**Gráfico 9.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgM del grupo 2 (Grupo inmunocompetente) utilizando antígeno de membrana (AM).

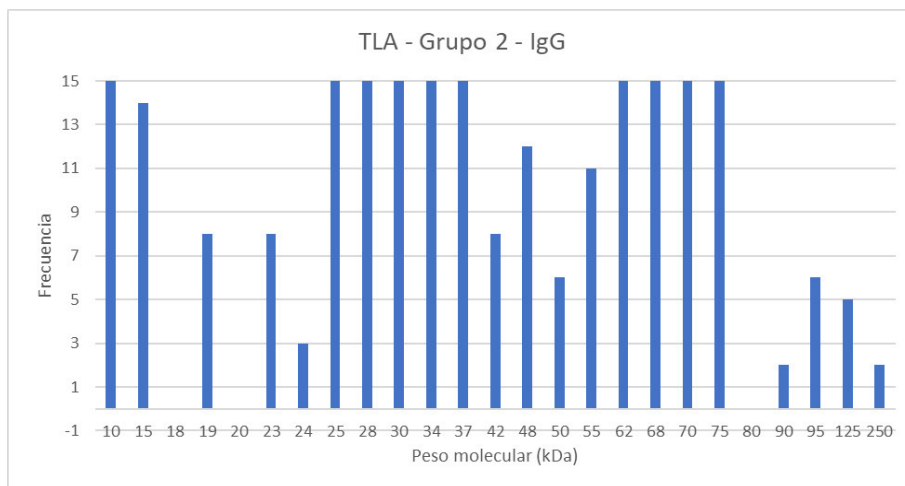
#### 6.5.3.4 Frecuencia de bandas antígeno TLA - Anti IgG

Usando el antígeno TLA y detección IgG para el grupo 1, las frecuencias de las bandas observadas, 15, 18, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 62, 68, 75, 80, 90, 95, 125 y 250 kDa, fueron 16, 2, 15, 15, 15, 15, 13, 15, 15, 11, 13, 16, 15, 7, 13, 15, 5, 14, 12 y 5, respectivamente (Gráfico 10).



**Gráfico 10.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 1 (fase aguda) utilizando TLA.

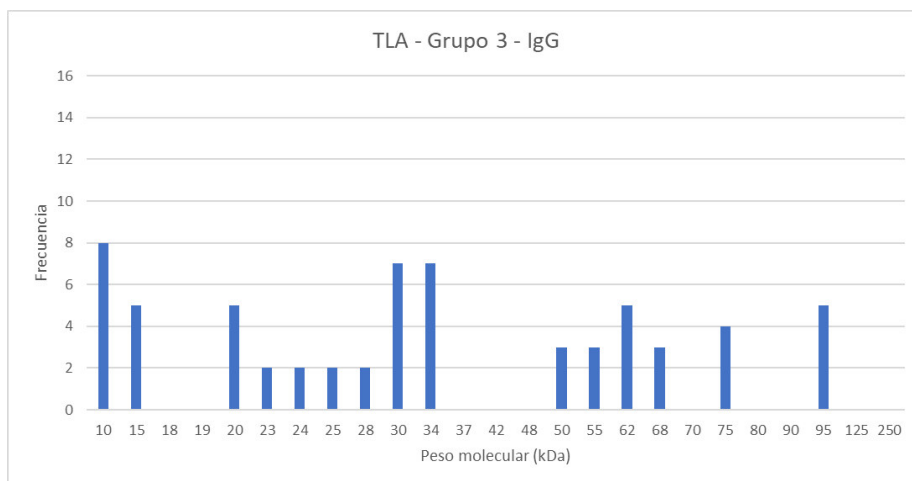
Usando el antígeno TLA y detección IgG para el grupo 2, las frecuencias de las bandas observadas, 10, 15, 19, 23, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 62, 68, 70, 75, 90, 95, 125 y 250 kDa, fueron 15, 14, 8, 8, 3, 15, 15, 15, 15, 15, 15, 8, 12, 6, 11, 15, 15, 15, 15, 2, 6, 5 y 2, respectivamente (Gráfico 11).



**Gráfico 11.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 2 (fase crónica) utilizando TLA.

Usando el antígeno TLA y detección IgG para el grupo 3, las frecuencias de las bandas observadas, 10, 15, 20, 23, 24, 25, 28, 30, 34, 50, 55, 62, 68, 75 y 95 kDa, fueron 8, 5, 5, 2, 2, 2, 2, 7, 7, 3, 3, 5, 3, 4 y 5, respectivamente (Gráfico 12).

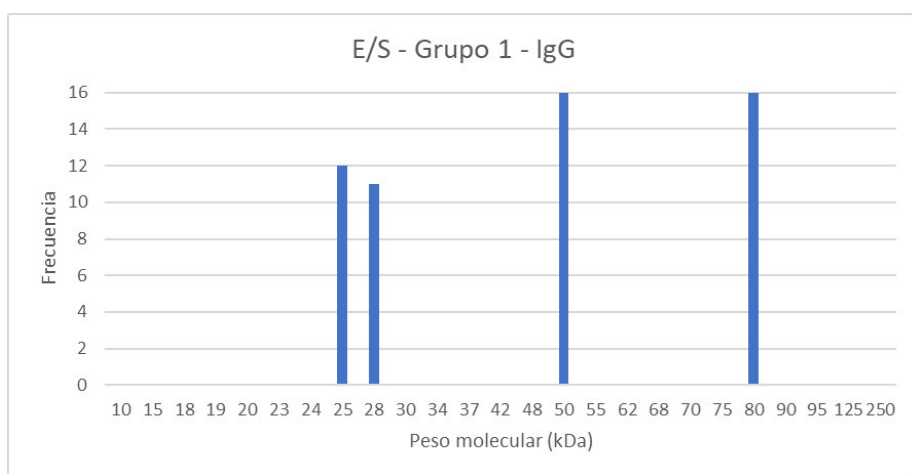




**Gráfico 12.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 3 (Grupo inmunocompetente) utilizando TLA.

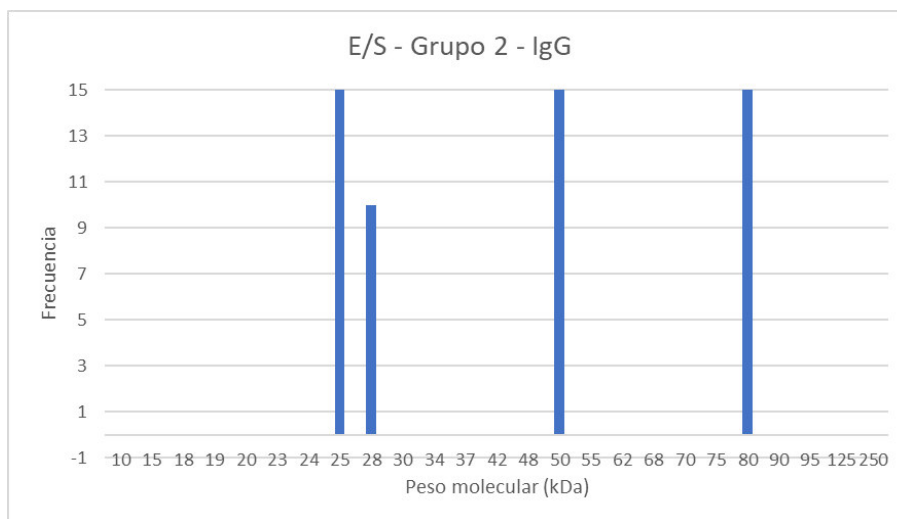
### 6.5.3.5 Frecuencia de bandas antígeno E/S - Anti IgG

Usando el antígeno E/S y detección IgG para el grupo 1, las frecuencias de las bandas observadas, 25, 28, 50 y 80 kDa, fueron 12, 11, 16 y 16, respectivamente (Gráfico 13).



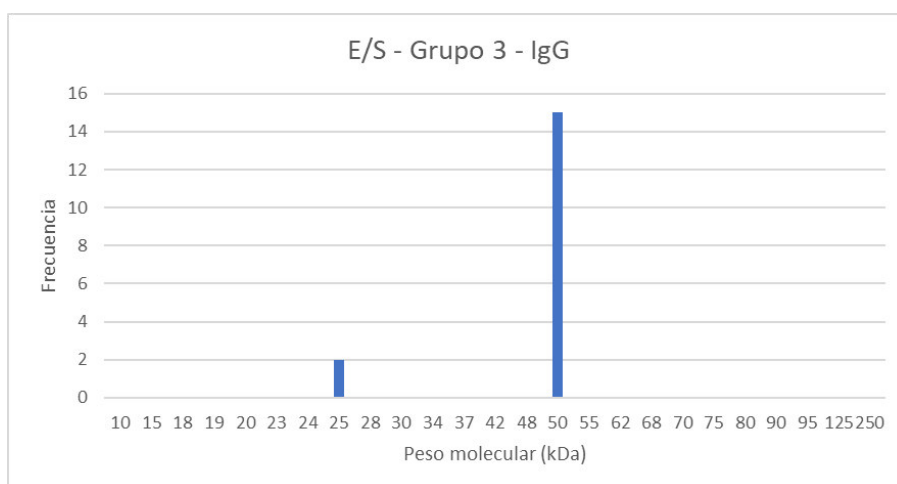
**Gráfico 13.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 1 (Fase aguda) utilizando E/S.

Usando el antígeno E/S y detección IgG para el grupo 2, las frecuencias de las bandas observadas, 25, 28, 50 y 80 kDa, fueron 15, 10, 15 y 15, respectivamente (Gráfico 14).



**Gráfico 14.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 2 (Fase crónica) utilizando E/S.

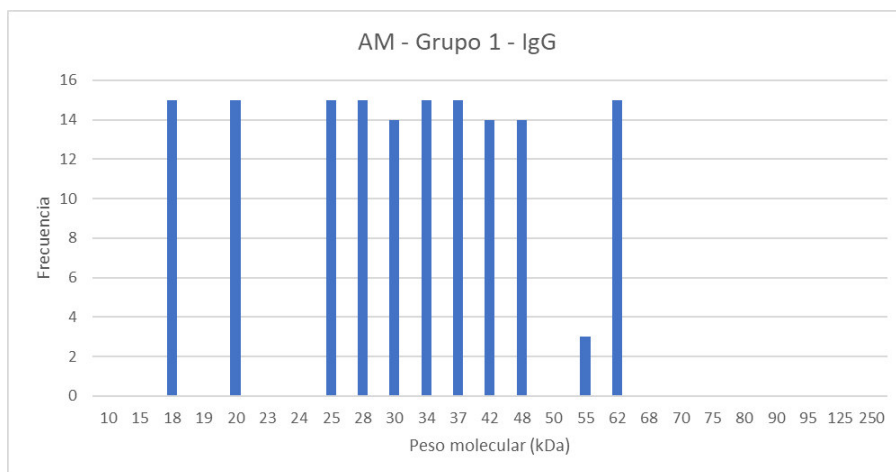
Usando el antígeno E/S y detección IgG para el grupo 3, las frecuencias de las bandas observadas, 25 y 50 kDa, fueron 2 y 15, respectivamente (Gráfico 15).



**Gráfico 15.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 3 (Grupo inmunocompetente) utilizando E/S.

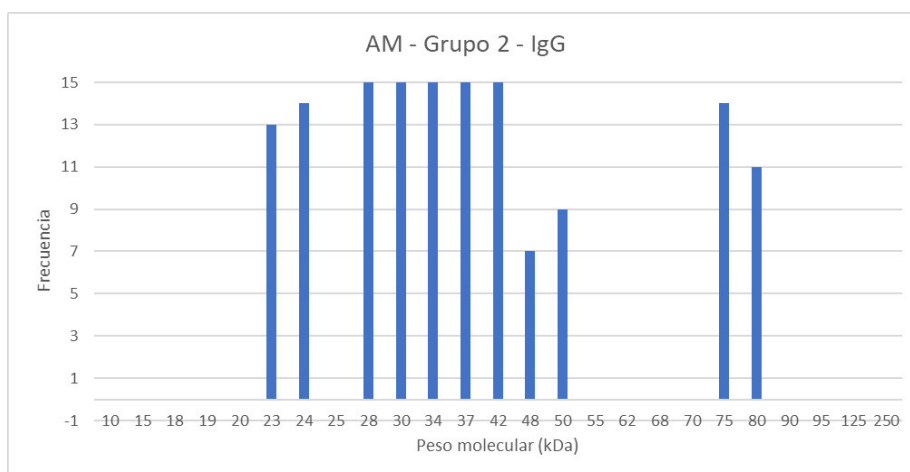
### 6.5.3.6 Frecuencia de bandas antígeno AM – Anti IgG

Usando el antígeno AM y detección IgG para el grupo 1, las frecuencias de las bandas observadas, 18, 20, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 55 y 62 kDa, fueron 15, 15, 15, 15, 14, 15, 15, 14, 14, 3 y 15, respectivamente (Gráfico 16).



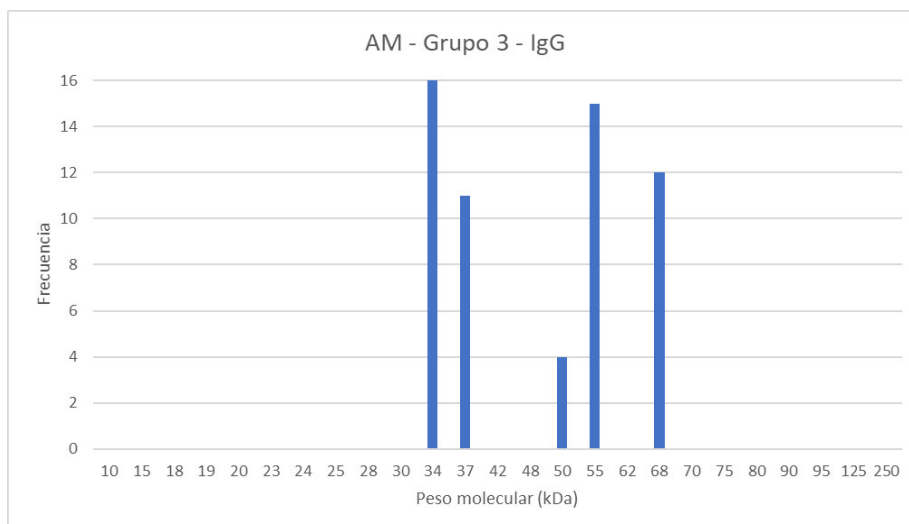
**Gráfico 16.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 1 (Fase aguda) utilizando antígeno de membrana (AM)

Usando el antígeno AM y detección IgG para el grupo 2, las frecuencias de las bandas observadas, 23, 24, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 75 y 80 kDa, fueron 13, 14, 15, 15, 15, 15, 7, 9, 14 y 11, respectivamente (Gráfico 17).



**Gráfico 17.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 2 (Fase crónica) utilizando antígeno de membrana (AM)

Usando el antígeno AM y detección IgG para el grupo 3, las frecuencias de las bandas observadas, 34, 37, 50, 55 y 68 kDa, fueron 16, 11, 4, 15 y 12, respectivamente (Gráfico 18).



**Gráfico 18.** Frecuencia de las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos IgG del grupo 3 (Grupo inmunocompetente) utilizando antígeno de membrana (AM).

## 6.6 Análisis de las bandas antigénicas

### 6.6.1 Sensibilidad y Especificidad

Las medidas de sensibilidad y especificidad se colocaron con relación a las frecuencias de cada banda inmunoreactiva, para el grupo 1 y grupo 2.

Para el grupo 1 (fase aguda) detección de IgM, se escogieron las bandas de 34 y 125 kDa del antígeno TLA, 42 kDa del antígeno E/S y las bandas 30 y 55 kDa del antígeno AM, debido a que presentaron una alta sensibilidad y especificidad como sugiere la literatura científica (Tabla N° 9).

**Tabla N° 9.** Sensibilidad y especificidad aceptables de las bandas inmunoreactivas para la detección de IgM en fase aguda.

Grupo 1 (Fase aguda) IgM			
Antígeno	Peso molecular (kDa)	Sensibilidad	Especificidad
TLA	34 kDa	93.75 %	100 %
	125 kDa	75 %	75 %
E/S	42 kDa	75 %	100 %
AM	30 kDa	81.25 %	100 %
	55 kDa	93.75 %	100%

Para el grupo 2 (fase crónica) detección de IgM, se escogieron las bandas de 30, 62, 68 y 90 kDa del antígeno TLA, 42 y 90 kDa del antígeno E/S y las bandas 30, 55 y 70 kDa del antígeno AM, por su alta sensibilidad y especificidad (Tabla N° 10).

**Tabla N° 10.** Sensibilidad y especificidad aceptables de las bandas inmunoreactivas para la detección de IgM en fase crónica.

Grupo 2 (Fase crónica) IgM			
Antígeno	Peso molecular (kDa)	Sensibilidad	Especificidad
TLA	30 kDa	86.6 %	93.75 %
	62 kDa	66.6 %	100 %
	68 kDa	66.6 %	100 %
	90 kDa	80 %	100 %
E/S	42 kDa	66.6 %	100 %
	90 kDa	73.3 %	100 %
AM	30 kDa	93.75 %	100 %
	55 kDa	93.75 %	100 %
	70 kDa	62.5 %	100 %

Para el grupo 1 (fase aguda) detección de IgG, se escogieron las bandas de 15, 24, 25, 28, 30, 34, 37, 42, 48, 50, 55, 62, 75, 80, 95 y 125 kDa del antígeno TLA, 25, 28 y 80 kDa del antígeno E/S y las bandas 18, 20, 25, 28, 30, 42, 48 y 62 kDa del antígeno AM, por su alta sensibilidad y especificidad (Tabla N° 11).

**Tabla N° 11.** Sensibilidad y especificidad aceptables de las bandas inmunoreactivas para la detección de IgG en fase aguda.

Grupo 1 (Fase aguda) IgG			
Antígeno	Peso molecular (kDa)	Sensibilidad	Especificidad
TLA	15 kDa	100 %	68.75 %
	24 kDa	93.75 %	87.5 %
	25 kDa	93.75 %	87.5 %
	28 kDa	93.75 %	87.5 %
	30 kDa	93.75 %	56.25 %
	34 kDa	81.25 %	56.25 %
	37 kDa	93.75 %	100 %
	42 kDa	93.75 %	100 %
	48 kDa	68.75 %	100 %
	50 kDa	81.25 %	81.25 %
	55 kDa	100 %	81.25 %
	62 kDa	93.75 %	68.75 %
	75 kDa	81.25 %	75 %
	80 kDa	93.75 %	100 %
	95 kDa	97.5 %	68.7 %
125 kDa	75 %	100 %	
E/S	25 kDa	75 %	87.5 %
	28 kDa	68.75 %	100 %

	80 kDa	100 %	100 %
	18 kDa	93.75 %	100 %
	20 kDa	93.75 %	100 %
	25 kDa	93.75 %	100 %
AM	28 kDa	93.75 %	100 %
	30 kDa	87.5 %	100 %
	42 kDa	87.5 %	100 %
	48 kDa	87.5 %	100 %
	62 kDa	93.75 %	100 %

Para el grupo 2 (fase crónica) detección de IgG, se escogieron las bandas de 10, 15, 25, 28, 30, 34, 37, 48, 55, 62, 68, 70 y 75 kDa del antígeno TLA, 25, 28 y 80 kDa del antígeno E/S y las bandas 23, 24, 28, 30, 42, 50, 75 y 80 kDa del antígeno AM, por su alta sensibilidad y especificidad (Tabla N° 12).

**Tabla N° 12.** Sensibilidad y especificidad aceptables de las bandas inmunoreactivas para la detección de IgG en fase crónica.

Grupo 2 (Fase crónica) IgG			
Antígeno	Peso molecular (kDa)	Sensibilidad	Especificidad
TLA	10 kDa	100 %	50 %
	15 kDa	93.3 %	68.75 %
	25 kDa	100 %	87.5 %
	28 kDa	100 %	87.5 %
	30 kDa	100 %	56.25 %
	34 kDa	100 %	56.25 %
	37 kDa	100 %	100 %
	48 kDa	80 %	100 %
	55 kDa	73 %	81.25 %
	62 kDa	100 %	68.75 %
	68 kDa	100 %	81.25 %
	70 kDa	100 %	100 %
E/S	25 kDa	100 %	87.5 %
	28 kDa	66.6 %	100 %
	80 kDa	100 %	100 %
AM	23 kDa	86.6 %	100 %
	24 kDa	93.3 %	100 %
	28 kDa	100 %	100 %
	30 kDa	100 %	100 %
	42 kDa	100 %	100 %
	50 kDa	60 %	75 %
	75 kDa	93.3 %	100 %
80 kDa	73 %	100 %	

### 6.6.2 Patrones de bandas inmunoreactivas

Se determinaron los patrones de bandas inmunoreactivas en kDa que tienen una sensibilidad, especificidad deseable y que deberían mostrarse en cada fase de la infección indicada, cuando se detectan anticuerpos IgM e IgG respectivamente. Los patrones de bandas de los antígenos E/S, para la detección de IgM e IgG, coinciden en la fase aguda y crónica, las mismas proteínas se repiten en ambos casos, es decir, no es posible discriminar ambas fases con estos antígenos, sin embargo la banda de 90 kDa empleando la detección de IgM, se observa sólo en la fase crónica. Empleando el antígeno AM se detectaron las mismas bandas, 30 y 55 kDa, en fase aguda y crónica para la detección de IgM, mientras que para la detección de IgG se observaron bandas presentes sólo en fase aguda, 8, 20, 25, 48, 62 kDa, y bandas presentes solamente en fase crónica, 23, 24, 50, 75, 80 kDa (Tabla N° 13 y 14)

**Tabla N° 13.** Patrón de bandas de la fase aguda y crónica para la detección de IgM.

Patrón de bandas - IgM		
Antígeno	Fase aguda (G1)	Fase crónica (G2)
TLA		30 kDa
	34 kDa	62 kDa
	125 kDa	68 kDa
		90 kDa
E/S	42 kDa	42 kDa
		90 kDa
AM	30 kDa	30 kDa
	55 kDa	55 kDa

**Tabla N° 14.** Patrón de bandas de la fase aguda y crónica para la detección de IgG.

Patrón de bandas - IgG		
Antígeno	Fase aguda (G1)	Fase crónica (G2)
TLA	15 kDa	
	24 kDa	10 kDa
	25 kDa	15 kDa
	28 kDa	25 kDa
	30 kDa	28 kDa
	34 kDa	30 kDa
	37 kDa	34 kDa
	42 kDa	37 kDa
	48 kDa	48 kDa
	50 kDa	55 kDa
	55 kDa	62 kDa
	62 kDa	68 kDa
	75 kDa	70 kDa
	80 kDa	75 kDa
	95 kDa	
125 kDa		
E/S	25 kDa	25 kDa
	28 kDa	28 kDa

	80 kDa	80 kDa
	18 kDa	23 kDa
	20 kDa	24 kDa
	25 kDa	28 kDa
AM	28 kDa	30 kDa
	30 kDa	42 kDa
	42 kDa	50 kDa
	48 kDa	75 kDa
	62 kDa	80 kDa



## VII. DISCUSIÓN

La infección por *T. gondii* está distribuida globalmente con prevalencia variable según la geografía, se estima que un tercio de la población mundial ya ha sido infectada por este parásito (Dambrun et al., 2022); sin embargo, no representa un riesgo mayor para las personas inmunocompetentes, el problema surge cuando las poblaciones de riesgo son afectadas por esta zoonosis, mujeres en gestación o personas con VIH; el parásito puede llegar a ser mortal en estos casos cuando la infección está en fase aguda, para lo cual es imperativo un diagnóstico rápido y eficaz antes que el parásito cause estragos y para que el paciente pueda ser correctamente medicado, no obstante, otro dilema surge debido a que, como se dijo en un inicio, gran parte de la población ha sido infectada por el parásito, lo que resulta en que muchas personas probablemente aún conserven anticuerpos IgG y algunos IgM contra proteínas específicas del parásito (Marcolino et al., 2000), entonces métodos de diagnóstico serológicos que son fundamentales comienzan a fallar debido a la incapacidad de diferenciar una infección actual o en fase aguda versus una infección pasada quizá de muchos años o crónica y que no pondría en riesgo la vida del paciente, resultando en un mal diagnóstico y medicación innecesaria. Por este motivo, el presente estudio tuvo como objetivo estandarizar una prueba diagnóstica confirmatoria mediante la técnica de Western blot y usando antígenos excretos secretores y antígenos de membrana con la finalidad de lograr un diagnóstico correcto de la fase aguda de la toxoplasmosis y lograr diferenciarla de un diagnóstico en fase crónica.

La infección de una línea celular, el mantenimiento y el cultivo de los taquizoitos de *T. gondii* son técnicas que permiten la obtención de los antígenos como antígenos totales, de membrana, citoplasmáticos, nucleares, o excretos secretores, los cuales son usados en investigación, diagnóstico y otros ensayos (Waltman et al., 1984; Contreras et al., 2000). La obtención de los antígenos total lisado (TLA) se pudo comprobar utilizando un método indirecto para cuantificar la concentración de proteínas, mediante el método de Bradford, al comprobarse la concentración de 240 µl/ml esto nos indicó con mayor seguridad una buena concentración de proteínas, sin embargo fue necesario también utilizar un Western blot, al enfrentar el antígeno al suero de una rata infectada (TOR 502), como se observa el resultado en la figura N° 7, nos permitió observar las bandas inmunorreactivas que coinciden con las bandas encontradas por otros autores cuando se utilizó el mismo antígeno (Patel et al., 2017; González et al., 2018; Galván et al., 2022). En total fueron 25 bandas encontradas y en comparación con la ausencia de bandas para la rata del grupo control, confirmamos que la obtención del antígeno TLA se realizó con éxito.

La obtención del antígeno excretor secretor (E/S) también fue realizada con éxito, se determinó mediante una prueba de Western blot enfrentándolo al suero de una rata infectada (Fig. 8) las bandas inmunoreactivas fueron de 25, 30 y 48 kDa mientras que la banda control en donde se usó suero de una rata no infectada no mostró ninguna de estas bandas, los resultados se asemejan a los descritos por Cazabonne et al.

(1994), en su estudio encontraron que para la detección de IgG se observaron las bandas de pesos moleculares de 30, 45, 63 y 77 kDa, cuando se enfrentaron a los sueros de ratones que habían sido infectados con tres distintas cepas de *T. gondii*; sin embargo, para la detección de IgM las bandas no fueron del todo determinantes ya que variaron demasiado en intensidad y frecuencia, posiblemente porque la fase aguda de la toxoplasmosis ocurre rápidamente en ratones y la inmunoglobulina IgM aparece solo por un breve periodo de tiempo.

Se logró obtener antígenos de membrana (AM) de *T. gondii* siguiendo lo establecido por Baghirova et al. (2015), esto se corroboró comparando los resultados del Western blot (wb) del antígeno TLA y de la fracción citoplasmática al enfrentarse los tres con un suero de rata infectada, ya que los tres deberían exponer algunas bandas diferentes. Fue importante la comparación entre la fracción citoplasmática y la fracción de membrana (antígenos de membrana) ya que esto permitió observar si ocurrió alguna contaminación o si en caso no se logró separar ambas fases con éxito. La comparación con el antígeno total (TLA) fue necesaria ya que permitió comparar el total de bandas inmunoreactivas con las bandas del antígeno de membrana (AM), se esperaba encontrar una cantidad menor de bandas en el antígeno de membrana, en la tabla N° 1 se indican la ausencia de las bandas 18, 23, 24, 42, 48, 62, 68, 70, 75, 95, 125 y 250 kDa en el antígeno de membrana pero todas presentes en el antígeno TLA, también se observan algunas proteínas ausentes en la fracción citoplasmática (FC) que sí están presentes en la fracción de membrana las cuales son 15, 19 y 90 kDa (Figura N° 9), al igual que Cruz et al. (2021) explican que esta comparación resulta importante ya que la separación de la fracción citoplasmática y la fracción de membrana puede llegar a ser complicada y tediosa, llegando a contaminarse y no separándose correctamente. El resultado que se obtuvo en el presente trabajo, en cuanto ausencia y presencia de algunas bandas, indica que se logró obtener antígenos de membrana.

Las ratas de cepa Holtzman fueron infectadas con taquizoitos intraperitonealmente siguiendo lo establecido por Liam et al. (2013), para evaluar y poder obtener una aproximación a la fase aguda y de la toxoplasmosis fue necesario sacrificar a los animales a los 3, 7, 15, 30 y 60 días post infección. La infección se confirmó cuando el suero de las ratas se enfrentó en un Western blot a los antígenos TLA, AM y E/S y fueron positivas, como control negativo se usó el suero de una rata no infectada del grupo control y como control positivo se usó suero de un conejo inmunizado con antígeno total. Se tomó como referencia De Champs et al. (1997) y Asgari et al. (2013), para designar a las ratas de 3 y 7 dpi como fase aguda y a las ratas de 15, 30 y 60 dpi como fase crónica, ya que como se explican, algunas cepas de ratas pueden resultar bastante resistentes a la infección y en algunos casos nunca llegar a la fase crónica. Además señalan que la fase aguda ocurre rápidamente y en ocasiones solo tarda un par de días. Se observan los resultados para los antígenos TLA, E/S y AM en las figuras N° 10, 11 y 13, respectivamente. En el TLA las ratas en fase aguda, para la detección de IgM, obtuvieron las bandas 18, 48 y 70 kDa, para IgG las bandas presentes en fase aguda fueron 18, 37, 70 y 95 kDa. En el caso del antígeno E/S en

fase crónica, para la detección de IgG, se observaron las bandas de 25 y 30 kDa mientras que en fase aguda se observó solamente la banda de 75 kDa. Para AM, en la detección de IgM para fase aguda se consideraron las bandas 20, 30 y 70 kDa, mientras que para IgG dos bandas resultaron relevantes ya que fueron encontradas en fase crónica y no en fase aguda, 75 y 80 kDa. Estos patrones de bandas obtenidas de las ratas infectadas, tanto en fase aguda y fase crónica, sirvieron para obtener un modelo y saber qué bandas se debieron tomar en cuenta cuando se realizó el mismo procedimiento usando los mismos antígenos pero con sueros humanos.

Los sueros humanos agrupados en fase aguda y fase crónica se designaron de esta manera debido a que fueron PCR positivos y negativos, respectivamente para toxoplasmosis, como se señala en Robert et al. (2015), un PCR positivo de una muestra de suero puede indicar que el paciente se encuentra en fase aguda con una sensibilidad mayor a 90 %; de acuerdo con la información de la seroteca de UPCH, algunos pacientes del grupo de fase crónica tuvieron tomografías computarizadas en donde se observan posibles quistes de *T. gondii* que corresponden a esta fase, entonces, estos pacientes con VIH que fueron diagnosticados como positivos para toxoplasmosis mediante otros métodos serológicos, y además con quistes observables, pero negativos para PCR, se designaron como en fase crónica por las razones ya mencionadas.

Los resultados de los Western blot de los 47 sueros humanos (Figuras del N° 14 al 31) mostraron bandas inmunorreactivas bien marcadas y con la intensidad necesaria para observarlas y analizarlas por lo cual se decidió mantener las diluciones de suero y anticuerpo conjugado descrito por González et al. (2018) con algunas modificaciones. Los 25 pesos moleculares colocados en las tablas N° 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se tomaron como referencia de los pesos de las bandas reconocidas al enfrentarse los sueros de ratas infectadas con el antígeno TLA, y se adicionaron otras bandas ya conocidas obtenidas de la literatura científica (Marcolino et al., 2000; Mohammadpour et al., 2016; Patel et al., 2017; Gonzales et al., 2018). Las frecuencias de las bandas obtenidas se observan en las tablas N° 3 al 8, las cuales fueron necesarias para calcular la sensibilidad y especificidad, sólo se tomaron en cuenta aquellas bandas que tuvieron una sensibilidad y especificidad mayor a 70 % como sugieren Tissot et al. (2003), Remington et al. (2004) y Capobiango et al. (2016), además no se consideraron a las bandas que se observaron en ambos grupos G1 y G2 (Fase aguda y crónica, respectivamente). De acuerdo con esto, el resultado de los patrones que se muestran en cada fase se observa en las tablas N° 13 y 14, para IgM e IgG, respectivamente, en donde se comparan ambas fases.

El patrón de bandas para la fase aguda, detección de IgM, antígeno TLA fueron las bandas 34 y 125 kDa; para el antígeno E/S se observó una única banda de 42 kDa, sin embargo, se descartó debido a que la misma banda se observó en fase crónica con sensibilidad y especificidad similar; para el antígeno AM se observaron las bandas de 30 y 55 kDa, pero fueron descartadas en vista de que en fase crónica ambas también fueron detectadas con especificidad y sensibilidad semejantes. El

patrón de bandas para la fase aguda, detección de IgG, al utilizar el antígeno TLA las bandas inmunoreactivas obtenidas para formar el patrón de bandas fueron 24, 42, 50, 80, 95, 125 kDa, empleando el antígeno E/S, detección de IgG, solo se observaron las bandas 25, 28 y 80 kDa, pero no fue posible considerarlas dado que las mismas también tuvieron sensibilidad y especificidad mayor a 70 % para fase crónica; al enfrentar el antígeno AM, detección de IgG, el patrón para fase aguda fue de 18, 20, 25, 48, 62 kDa, las demás bandas fueron descartadas por estar presentes también en fase crónica. Para obtener el patrón de fase crónica de los pacientes se consideró las mismas condiciones, sensibilidad y especificidad mayor al 70 % y el descarte de las bandas que aparecen en fase aguda en este caso. El patrón de bandas para fase crónica, detección de IgM, antígeno TLA, fueron las bandas 30, 62, 68 y 90 kDa, para el antígeno E/S, detección de IgM, el patrón fue sólo la banda de 90 kDa, para el antígeno AM, detección de IgM, las dos únicas bandas que se observaron fueron descartadas, ya que también estuvieron presentes en fase aguda y crónica, en ambas con sensibilidad de 93.75 % y 100 % de especificidad. Para el patrón de bandas para la fase crónica, detección de IgG, antígeno TLA se consideraron las bandas 10, 68, 70 kDa, de las 13 obtenidas, ya que las demás se repiten en fase aguda, para el antígeno E/S, detección IgG, no se consideró ninguna banda que pueda diferenciar ambas fases, ya que las 3 bandas obtenidas se observaron en aguda y crónica, finalmente, para el antígeno AM, detección IgG, las bandas elegidas para el patrón de fase crónica fueron 23, 24, 50, 75, 80 kDa de las 8 obtenidas. Se observó mayor dificultad al intentar encontrar un patrón de bandas al detectar inmunoglobulinas IgM, en comparación cuando se buscaron IgG, esto se debe a que probablemente muchos pacientes, en fase crónica, aún conserven anticuerpos IgM de la primera infección que tuvieron. También puede ocurrir una reactivación del parásito en pacientes inmunodeprimidos, lo que ocasionaría la producción de anticuerpos IgM (Marcolino et al., 2000).

En este trabajo, se logró obtener los patrones de bandas para fase aguda y crónica de la toxoplasmosis, para la fase aguda y detección de IgG, utilizando el antígeno AM, se logró un patrón con las bandas 8, 20, 25, 48, 62 kDa. Para la fase crónica, empleando el antígeno E/S se observó una banda útil para el diagnóstico, la cual fue 90 kDa, para la detección de IgG, el patrón de bandas para el antígeno AM fue 23, 24, 50, 75, 80 kDa. Estas bandas pueden ser usadas como diagnóstico ya que cada una posee sensibilidad y especificidad mayor al 70 %, además fueron propias de cada grupo, es decir, las bandas que se observaron en aguda y en crónica fueron descartadas.

No fue un objetivo de este trabajo evaluar el antígeno TLA para su uso en el diagnóstico de la fase aguda de la toxoplasmosis, su uso se limitó a servir como un modelo para evitar errores en el reconocimiento de las bandas cuando se usara el antígeno de membrana y así tener claro cuáles bandas considerar y cuáles no durante todas las corridas de Western blot, también fue útil al momento de la obtención del antígeno AM con el fin de comparar ambos antígenos en un Western blot y verificar si el antígeno de membrana fue correctamente extraído debido a que su obtención es tediosa y en algunos pasos se corre el riesgo de ser contaminado con

el antígeno total, sin embargo, resulta importante reportar que se observaron diferencias significativas entre bandas inmunoreactivas de la fase aguda y la fase crónica que podrían servir justamente para el diagnóstico, para la fase aguda, detección de IgM, usando el patrón fue 34 y 125 kDa, para la detección de IgG el patrón fue 24, 42, 50, 80, 95, 125 kDa, mientras que para la fase crónica, detección de IgM, el patrón de bandas fue 30, 62, 68 y 90 kDa y para la detección de IgG el patrón de bandas fue 10, 68, 70 kDa.

Conforme a los resultados logrados, resulta importante considerarlos y continuar las investigaciones sobre lo obtenido en este trabajo, esto permitirá a los pacientes recibir un diagnóstico rápido, efectivo, y la posterior medicación de ser necesario para evitar poner en peligro a los grupos de riesgo como son los pacientes inmunocomprometidos y a las madres gestantes.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se evaluaron con éxito los antígenos E/S y AM para la detección de la fase aguda y se determinó un patrón de bandas del antígeno AM, para la detección de IgG, útil para el diagnóstico de la fase aguda. El antígeno E/S no fue útil para el diagnóstico de la fase aguda.
- Se obtuvo con éxito los antígenos antígeno total lisado (TLA), excretos secretos (E/S) y antígenos de membrana (AM) de *T. gondii* a partir del cultivo celular en células LLC-MK2
- Se logró estandarizar un patrón de bandas mediante la técnica de Western blot en el modelo animal de ratas para la fase aguda y crónica de la toxoplasmosis, utilizando los antígenos E/S y AM
- Se logró obtener un patrón de bandas para la fase aguda mediante la técnica de Western blot empleando sueros de pacientes VIH positivos con toxoplasmosis mediante el uso de los antígenos E/S y AM y la detección de anticuerpos IgM e IgG.
- Se logró obtener un patrón de bandas para la fase crónica mediante la técnica de Western blot empleando suero de pacientes VIH positivos con toxoplasmosis empleando los antígenos E/S y AM.

## **IX. RECOMENDACIONES**

Se recomienda analizar el uso de otros métodos de extracción de antígenos de membrana, y también investigar sobre otros métodos de purificación para este tipo de proteínas, que puedan incluir cromatografía de afinidad por ejemplo, ya que esto mejoraría el análisis de las bandas y se obtendrían mejores resultados. También resulta relevante continuar las investigaciones sobre las proteínas que conforman el antígeno de membrana, aislar, identificar y cuantificar los componentes proteicos mediante un análisis por espectrometría de masas por ejemplo, y el posterior análisis proteómico, nos ayudarían a dilucidar frente a qué proteínas estamos, qué función cumplen, y ,si quizá pudieran ser candidatos a vacunas.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aliberti J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature reviews. Immunology*, 5(2), 162–170. <https://doi.org/10.1038/nri1547>
2. Anderson-White, B. R., Ivey, F. D., Cheng, K., Szatanek, T., Lorestani, A., Beckers, C. J., Ferguson, D. J., Sahoo, N., & Gubbels, M. J. (2011). A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology*, 13(1), 18–31. <https://doi.org/10.1111/j.14625822.2010.01514.x>
3. Asgari, Q., Keshavarz, H., Shojaee, S., Motazedian, M. H., Mohebbali, M., Miri, R., Mehrabani, D., & Rezaeian, M. (2013). In Vitro and In Vivo Potential of RH Strain of *Toxoplasma gondii* (Type I) in Tissue Cyst Forming. *Iranian journal of parasitology*, 8(3), 367–375.
4. Baghirova, S., Hughes, B. G., Hendzel, M. J., & Schulz, R. (2015). Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX*, 2, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.11.001>
5. Baldovino, H., Martínez, A., Torbello, A., Solano, A., Urdaneta, O., Cárdenas, E., Vidal, A., & Sánchez, J. (2011). Anticuerpos séricos IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* en pacientes con abortos espontáneos: Barquisimeto, Estado Lara. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 71(3), 158-163.
6. Béla, S. R., Oliveira Silva, D. A., Cunha-Júnior, J. P., Pirovani, C. P., Chaves-Borges, F. A., Reis de Carvalho, F., Carrijo de Oliveira, T., & Mineo, J. 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. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 62(3), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.017>
7. Berdión Camaño, E. del M., & Berdión Camaño, E. del M. (2015). Un parásito intracelular: *Toxoplasma gondii*.
8. Biswas, A., Bruder, D., Wolf, S. A., Jeron, A., Mack, M., Heimesaat, M. M., & Dunay, I. R. (2015). Ly6C(high) monocytes control cerebral toxoplasmosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(7), 3223–3235. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402037>
9. Blaizot, R., Nabet, C., Laghoe, L., Faivre, B., Escotte-Binet, S., Djossou, F., Mosnier, E., Henaff, F., Blanchet, D., Mercier, A., Dardé, M. L., Villena, I., & Demar, M. (2020). Outbreak of Amazonian Toxoplasmosis: A One Health Investigation in a Remote Amerindian Community. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 401. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00401>
10. Boyer, K., Hill, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., Dubey, J. P., Sautter, M., Noble, A. G., Withers, S., Swisher, C., Heydemann, P., Hosten, T., Babiarz, J., Lee, D., Meier, P., McLeod, R., & Toxoplasmosis Study Group (2011). Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53(11), 1081–1089. <https://doi.org/10.1093/cid/cir667>



11. Boothroyd, J. C., & Dubremetz, J. F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1), 79–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>
12. Bradley, P. J., & Sibley, L. D. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Current opinion in microbiology*, 10(6), 582–587. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.013>
13. Cáceda Sánchez, Ricardo, Seas Ramos, Carlos, Echevarría Zárata, Juan, Samalvides Cuba, Frine, León Rojas, Yolanda, & Gotuzzo Herencia, Eduardo. (2000). Toxoplasmosis cerebral en pacientes con SIDA en el Hospital Nacional Cayetano Heredia entre 1989 y 1999. *Revista Medica Herediana*, 11(1), 15-21. Recuperado en 04 de julio de 2023, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2000000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2000000100004&lng=es&tlng=es).
14. Capobiango, J. D., Monica, T. C., Ferreira, F. P., Mitsuka-Breganó, R., Navarro, I. T., Garcia, J. L., & Reiche, E. M. (2016). Evaluation of the Western blotting method for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Jornal de pediatria*, 92(6), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.02.014>
15. CARDONA, NÉSTOR IVÁN, LORA, FABIANA, & GOMEZ, JORGE ENRIQUE. (2005). Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón. *Parasitología latinoamericana*, 60(1-2), 97-101. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122005000100019>
16. Carruthers, V. B., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cellular microbiology*, 1(3), 225–235. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00023.x>
17. Cazabonne, P., Bessieres, M. H., & Seguela, J. P. (1994). Kinetics study and characterisation of target excreted/secreted antigens of immunoglobulin G, M, A and E antibodies from mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology research*, 80(1), 58-63.
18. Cesbron-Delauw, M. F., Gendrin, C., Travier, L., Ruffiot, P., & Mercier, C. (2008). Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(5), 657–664. <https://doi.org/10.1111/j.16000854.2008.00728.x>
19. Chang, S., Shan, X., Li, X., Fan, W., Zhang, S. Q., Zhang, J., Jiang, N., Ma, D., & Mao, Z. (2015). *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein ROP16 Mediates Partially SH-SY5Y Cells Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Directing Ser15/37 Phosphorylation of p53. *International journal of biological sciences*, 11(10), 1215–1225. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10516>
20. Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P. I., Striepen, B., Roos, D. S., & Joiner, K. A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *The*

*Journal of biological chemistry*, 274(4), 2424–2431.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2424>

21. Chatterton, J. M., Evans, R., Ashburn, D., Joss, A. W., & Ho-Yen, D. O. (2002). *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. *Journal of microbiological methods*, 51(3), 331–335. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00101-x](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00101-x)
22. Contreras, María del C., Sandoval, Lea, Salinas, Patricia, Muñoz, Paula, & Vargas, Susana. (2000). Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y Elisa avidéz de IgG en toxoplasmosis reciente y crónica. *Boletín chileno de parasitología*, 55(1-2), 17-24. <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-94022000000100005>
23. Cortés, L. J., & Mancera, L. (2009). Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. *Infectio*, 13(2), 76-82.
24. Cozon, G. J., Ferrandiz, J., Nebhi, H., Wallon, M., & Peyron, F. (1998). Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 17(1), 32–36. <https://doi.org/10.1007/BF01584360>
25. Cruz-Mirón, R., Ramírez-Flores, C. J., Lagunas-Cortés, N., Mondragón-Castelán, M., Ríos-Castro, E., González-Pozos, S., Aguirre-García, M. M., & Mondragón-Flores, R. (2021). Proteomic characterization of the pellicle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of proteomics*, 237, 104146. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104146>
26. Dambrun, M., Dechavanne, C., Guigue, N., Briand, V., Candau, T., Fievet, N., Lohezic, M., Manoharan, S., Sare, N., Viwami, F., Simon, F., Houzé, S., & Migot-Nabias, F. (2022). Retrospective study of toxoplasmosis prevalence in pregnant women in Benin and its relation with malaria. *PloS one*, 17(1), e0262018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262018>
27. De Champs, C., Imbert-Bernard, C., Belmeguenai, A., Ricard, J., Pelloux, H., Brambilla, E., & Ambroise-Thomas, P. (1997). *Toxoplasma gondii*: in vivo and in vitro cystogenesis of the virulent RH strain. *The Journal of parasitology*, 83(1), 152–155.
28. Djurković-Djaković, O., Dupouy-Camet, J., Van der Giessen, J., & Dubey, J. P. (2019). Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food and waterborne parasitology*, 15, e00054. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00054>
29. Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 267–299. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>
30. Dubey, J. P. (2016). Toxoplasmosis of Animals and Humans. In *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420092370>

31. Dupont, C. D., Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Seminars in immunopathology*, 34(6), 793–813. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>
32. El Bissati, K., Levigne, P., Lykins, J., Adlaoui, E. B., Barkat, A., Berraho, A., Laboudi, M., El Mansouri, B., Ibrahim, A., Rhajaoui, M., Quinn, F., Murugesan, M., Seghrouchni, F., Gómez-Marín, J. E., Peyron, F., & McLeod, R. (2018). Global initiative for congenital toxoplasmosis: an observational and international comparative clinical analysis. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 165. <https://doi.org/10.1038/s41426-0180164-4>
33. El Sharazly, B. M., Aboul Asaad, I. A., Yassen, N. A., El Maghraby, G. M., Carter, W. G., Mohamed, D. A., Amer, B. S., & Ismail, H. I. H. (2023). Mefloquine loaded niosomes as a promising approach for the treatment of acute and chronic toxoplasmosis. *Acta tropica*, 239, 106810. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106810>
34. Esteves V., K., Chávez V, A., Casas A., E., & Lí E, O. (2013). Determinación de anticuerpos contra toxoplasma gondii en búfalos de agua (*bubalus bubalis*) en el distrito de jenaro herrera, Loreto, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 24(3), 390–395. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172013000300017&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000300017&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
35. Ferguson, D. J., Hutchison, W. M., & Siim, J. C. (1975). The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, 83(5), 491–505. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1975.tb00130.x>
36. Ferreira, I. M., Vidal, J. E., Costa-Silva, T. A., Meira, C. S., Hiramoto, R. M., Penalva de Oliveira, A. C., & Pereira-Chiocola, V. L. (2008). *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental parasitology*, 118(2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.08.006>
37. Galván-Ramírez, M. L., Charles-Niño, C., Pedroza-Roldán, C., Salazar-Reveles, C., Ocampo-Figueroa, K. L., Rodríguez-Pérez, L. R., & Paez-Magallán, V. M. (2022). Prevalence of *Toxoplasma gondii* Measured by Western Blot, ELISA and DNA Analysis, by PCR, in Cats of Western Mexico. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(1), 109. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010109>
38. GOLDMAN M. (1957). Staining *toxoplasma gondii* with fluorescein-labelled antibody. II. A new serologic test for antibodies to *Toxoplasma* based upon inhibition of specific staining. *The Journal of experimental medicine*, 105(6), 557–573. <https://doi.org/10.1084/jem.105.6.557>
39. González-Achar, Idelina, González-Vatteone, Cecilia, Arévalo-de Guillén, Ivalena, Carpinelli, María Mercedes, Meza, Teresa, Aria, Laura, Rojas, Alejandra, Infazón, Belén, & Acosta, María Eugenia. (2018). Perfil antigénico en fase aguda y crónica de toxoplasmosis en embarazadas por la técnica de Western Blot. *Memorias del*

- Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 16(3), 35-43.  
[https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2018.016\(03\)35-043](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2018.016(03)35-043)
40. Grace, D., Pfeiffer, D. U., Kock, R., Rushton, J., Mutua, F. K., McDermott, J. J., & Jones, B. (2011). A systematic review of zoonoses transmission and livestock/wildlife interactions: Preliminary findings. <https://hdl.handle.net/10568/7096>
  41. Grace, D., Mutua, F. K., Ochungo, P., Kruska, R. L., Jones, K., Brierley, L., Lapar, M. L., Said, M. Y., Herrero, M. T., Phuc, P. M., Thao, N. B., Akuku, I., & Ogotu, F. (2012). Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/21161>
  42. Grandía G., Raiden, Entrena G., Ángel, & Cruz H., Jeddú. (2013). Toxoplasmosis en *Felis catus*: etiología, epidemiología y Enfermedad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), 131-149. Recuperado en 05 de junio de 2023, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172013000200001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000200001&lng=es&tlng=es)
  43. GALVÁN R., M. L.; MONDRAGÓN F., R (2017). Toxoplasmosis humana. 1era edición. EORFAN-México.
  44. Hunter, C. A., Subauste, C. S., Van Cleave, V. H., & Remington, J. S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infection and immunity*, 62(7), 2818-2824. <https://doi.org/10.1128/iai.62.7.28182824.1994>
  45. Kasper L. H. (1989). Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, 57(3), 668-672. <https://doi.org/10.1128/iai.57.3.668672.1989>
  46. Khan, A., Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International journal for parasitology*, 41(6), 645-655. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.005>
  47. Kim, K., & Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International journal for parasitology*, 34(3), 423-432. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>
  48. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. Macmillan.
  49. Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N., & Sibley, L. D. (2002). *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *The Journal of biological chemistry*, 277(29), 25870-25876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202553200>
  50. LUNDE, M. N., & JACOBS, L. (1963). TOXOPLASMA HEMAGGLUTINATION AND DYE TEST ANTIBODIES IN EXPERIMENTALLY INFECTED RATS. *The Journal of parasitology*, 49, 932-936.

51. Lycke, E., & Norrby, R. (1966). Demonstration of a Factor of *Toxoplasma gondii* Enhancing the Penetration of *Toxoplasma* Parasites into Cultured Host Cells. *British Journal of Experimental Pathology*, 47(3), 248–256.
52. Lycke, E., Carlberg, K., & Norrby, R. (1975). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infection and immunity*, 11(4), 853–861.  
<https://doi.org/10.1128/iai.11.4.853861.1975>
53. Machado, A. S., Andrade, G. M., Januário, J. N., Fernandes, M. D., Carneiro, A. C., Carneiro, M., Carellos, E. V., Romanelli, R. M., Vasconcelos-Santos, D. V., & Vitor, R. W. (2010). IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6), 757–761.  
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000600005>
54. Marcolino, P. T., Silva, D. A., Leser, P. G., Camargo, M. E., & Mineo, J. R. (2000). Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(3), 384–389.  
<https://doi.org/10.1128/CDLI.7.3.384-389.2000>
55. McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., & Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature* 1996 381:6582, 381(6582), 482–482.  
<https://doi.org/10.1038/381482a0>
56. Mendonça, F. C., & Roque-Barreira, M. C. (2014). Interação de proteínas de micronema de *Toxoplasma gondii* com N-glicanas de TLR2.
57. Mercier, C., Adjogble, K. D., Däubener, W., & Delauw, M. F. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. *International journal for parasitology*, 35(8), 829–849.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>
58. Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M. P., de Thoisy, B., Bonnabau, H., Collinet, F., Boukhari, R., Blanchet, D., Simon, S., Carme, B., & Dardé, M. L. (2011). Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(6), 1378–1387. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.003>
59. Minuzzi, C. E., Fernandes, F. D., Portella, L. P., Bräunig, P., Sturza, D. A. F., Giacomini, L., Salvagni, E., Ribeiro, J. D. S., Silva, C. R., Difante, C. M., Farinha, L. B., Menegolla, I.

- A., Gehrke, G., Dilkin, P., Sangioni, L. A., Mallmann, C. A., & Vogel, F. S. F. (2021). Contaminated water confirmed as source of infection by bioassay in an outbreak of toxoplasmosis in South Brazil. *Transboundary and emerging diseases*, 68(2), 767–772. <https://doi.org/10.1111/tbed.13741>
60. Mohammadpour, N., Saki, J., Rafiei, A., Khodadadi, A., & Tavalla, M. (2016). Evaluating the Antigenic Markers of *Toxoplasma gondii* RH strain for Differential Diagnosis of Acute and Chronic Toxoplasmosis. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 5(2).
61. Nascimento, D. C., Melo, P. H., Piñeros, A. R., Ferreira, R. G., Colón, D. F., Donate, P. B., Castanheira, F. V., Gozzi, A., Czaikoski, P. G., Niedbala, W., Borges, M. C., Zamboni, D. S., Liew, F. Y., Cunha, F. Q., & Alves-Filho, J. C. (2017). IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nature communications*, 8, 14919. <https://doi.org/10.1038/ncomms14919>
62. Nicole, C., & Manceaux. (1908). Sur une infection à corpus de Leishman (ou organismes voisins) Du *Gondii*. *C.R. Acad. Dci. (Paris)*, 147, 763-766.
63. Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of protozoology*, 34(2), 217–226. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03162.x>
64. Ordoñez, E. P., & Maza, A. V. (2019). Estudio del *Toxoplasma gondii* en bovinos como hospedero intermedio de la toxoplasmosis en humanos. Revisión bibliográfica. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 226–253. <https://www.revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/146>
65. Patel, K. K., Howe, L., Heuer, C., Asher, G. W., & Wilson, P. R. (2017). Evaluation of Western blot, ELISA and latex agglutination tests to detect *Toxoplasma gondii* serum antibodies in farmed red deer. *Veterinary parasitology*, 244, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.003>
66. Pérez-Lazo, Giancarlo, Castillo-Córdova, Raúl, & Maquera-Afaray, Julio. (2017). Toxoplasmosis intramedular en una paciente con coinfección por VIH y tuberculosis. *Revista chilena de infectología*, 34(1), 77-80. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000100012>
67. Pino, L. E., Salinas, J. E., & López, M. C. (2009). Descripción de un brote epidémico de toxoplasmosis aguda en pacientes inmunocompetentes miembros de las fuerzas militares de Colombia durante operaciones de selva. *Infectio*, 13(2), 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70729-5](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70729-5)
68. Raiden Grandía, G., Ángel Entrena, G., & Jeddú Cruz, H. (2013). Toxoplasmosis in *Felis catus*: Etiology, epidemiology and disease. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 24(2), 131–149.

69. Reátegui, B. C., & Vela, G. L. (2011). Factores socioeconómicos-epidemiológicos y su relación con la seroprevalencia de toxoplasmosis en gestantes atendidas en los hospitales “Felipe Arriola” y “Cesar Garayar”, Iquitos, Perú, 2009. *Neotropical Helminthology*, 5(1), 31-40.
70. Remington, J. S., Thulliez, P., & Montoya, J. G. (2004). Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), 941–945. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.941-945.2004>
71. Rezaei, F., Sharif, M., Sarvi, S., Hejazi, S. H., Aghayan, S., Pagheh, A. S., Dodangeh, S., & Daryani, A. (2019). A systematic review on the role of GRA proteins of *Toxoplasma gondii* in host immunization. *Journal of microbiological methods*, 165, 105696. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105696>
72. Robert-Gangneux, F., Sterkers, Y., Yera, H., Accoceberry, I., Menotti, J., Cassaing, S., Brenier-Pinchart, M. P., Hennequin, C., Delhaes, L., Bonhomme, J., Villena, I., Scherer, E., Dalle, F., Touafek, F., Filisetti, D., Varlet-Marie, E., Pelloux, H., & Bastien, P. (2015). Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. *Journal of clinical microbiology*, 53(5), 1677–1684. <https://doi.org/10.1128/JCM.03282-14>
73. Romero Lázaro, Y. K. (2016). Estandarización y evaluación de la técnica de Western blot para la detección de IgM E IgG ANTI-Toxoplasma gondii utilizando un modelo murino.
74. Roos, D. S., Crawford, M. J., Donald, R. G., Kissinger, J. C., Klimczak, L. J., & Striepen, B. (1999). Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Current opinion in microbiology*, 2(4), 426–432. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80075-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80075-7)
75. Rorman, E., Zamir, C. S., Rilkis, I., & Ben-David, H. (2006). Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 21(4), 458–472. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.10.006>
76. Rugarabamu, G., Marq, J. B., Guérin, A., Lebrun, M., & Soldati-Favre, D. (2015). Distinct contribution of *Toxoplasma gondii* rhomboid proteases 4 and 5 to micronemal protein protease 1 activity during invasion. *Molecular microbiology*, 97(2), 244–262. <https://doi.org/10.1111/mmi.13021>
77. Russell, D. G., & Sinden, R. E. (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *Journal of cell science*, 50, 345–359. <https://doi.org/10.1242/jcs.50.1.345>
78. SALAZAR M., J. N. (2017). Determinación de la presencia de anticuerpos de *Toxoplasma gondii* en suero de bovinos de la provincia de Pichincha.
79. Sasai, M., & Yamamoto, M. (2019). Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Experimental & molecular medicine*, 51(12), 1-10.

80. Silva-Díaz, H., Arriaga-Deza, E. V., Failoc-Rojas, V. E., Alarcón-Flores, Y. R., Rojas-Rojas, S. Y., Becerra-Gutiérrez, L. K., Mera-Villasis, K. M., Aguilar-Gamboa, F. R., & Silva-García, T. (2020). Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women and its associated factors among hospital and community populations in Lambayeque, Peru. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20190164. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0164-2019>
81. Souza, W., Dos, É., Martins-Duarte, S., Lemgruber, L., Attias, M., & Vommaro, R. C. (2010). Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii* Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica (Porto Alegre)*, 20(1), 131–143.
82. Speer, C. A., Clark, S., & Dubey, J. P. (1998). Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology*, 84(3), 505–512.
83. Sullivan, W. J., Jr, Smith, A. T., & Joyce, B. R. (2009). Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii*: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 155–161. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000200005>
84. Switaj, K., Master, A., Skrzypczak, M., & Zaborowski, P. (2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11(3), 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.14690691.2004.01073.x>
85. Tissot Dupont, D., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M. P., Bost-Bru, C., Ambroise-Thomas, P., & Pelloux, H. (2003). Usefulness of Western blot in serological follow-up of newborns suspected of congenital toxoplasmosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 22(2), 122–125. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-0887-5>
86. Tonin, A. A., da Silva, A. S., Thorstenberg, M. L., Castilhos, L. G., França, R. T., Leal, D. B., Duarte, M. M., Vogel, F. S., de La Rue, M. L., & dos Anjos Lopes, S. T. (2013). Influence of *Toxoplasma gondii* acute infection on cholinesterase activities of Wistar rats. *The Korean journal of parasitology*, 51(4), 421–426. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.4.421>
87. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
88. Waltman, W. D., Dreesen, D. W., Prickett, M. D., Blue, J. L., & Oliver, D. G. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of toxoplasmosis in swine: interpreting assay results and comparing with other serologic tests. *American journal of veterinary research*, 45(9), 1719–1725.

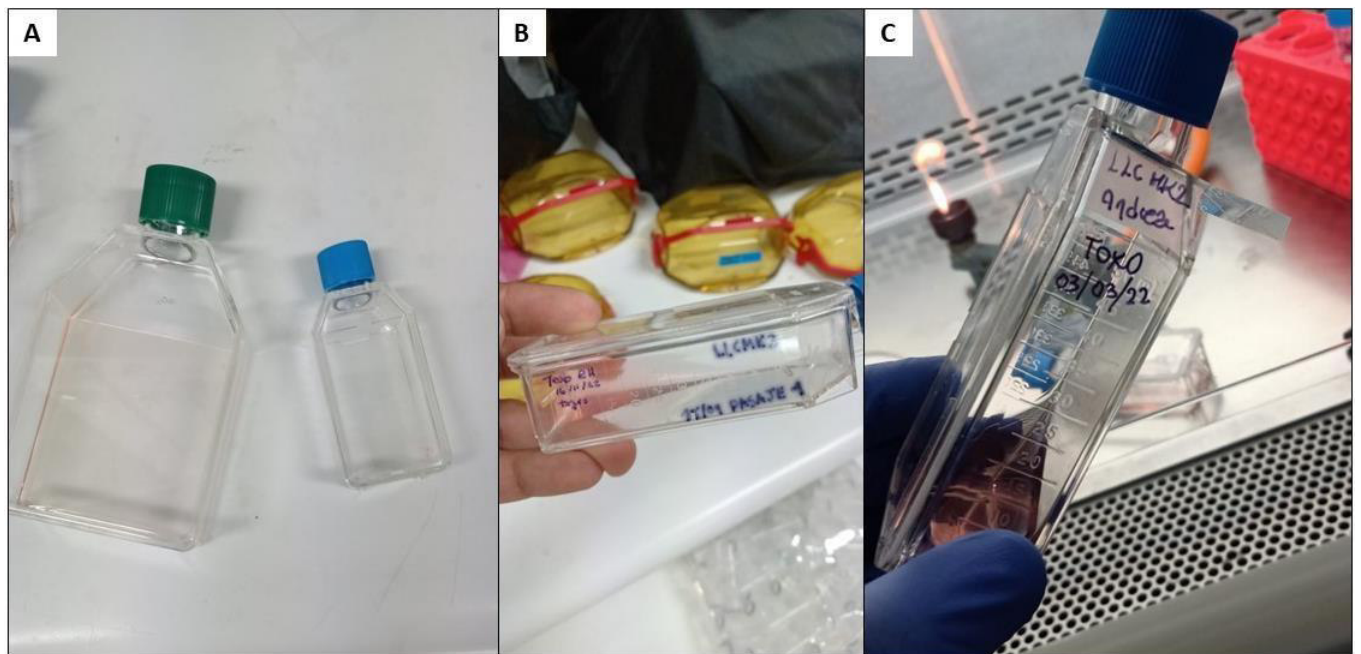


89. Zoghroban, H. S., Elmansory, B. M., Issa, Y. A., Eltokhy, A. K., Abo Safia, H. S., El Maghraby, G. M., & Salama, A. M. (2023). Novel insights on the therapeutic effect of levamisole on the chronic toxoplasmosis in mice model. *Experimental parasitology*, 248, 108515. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108515>

## XI. ANEXO



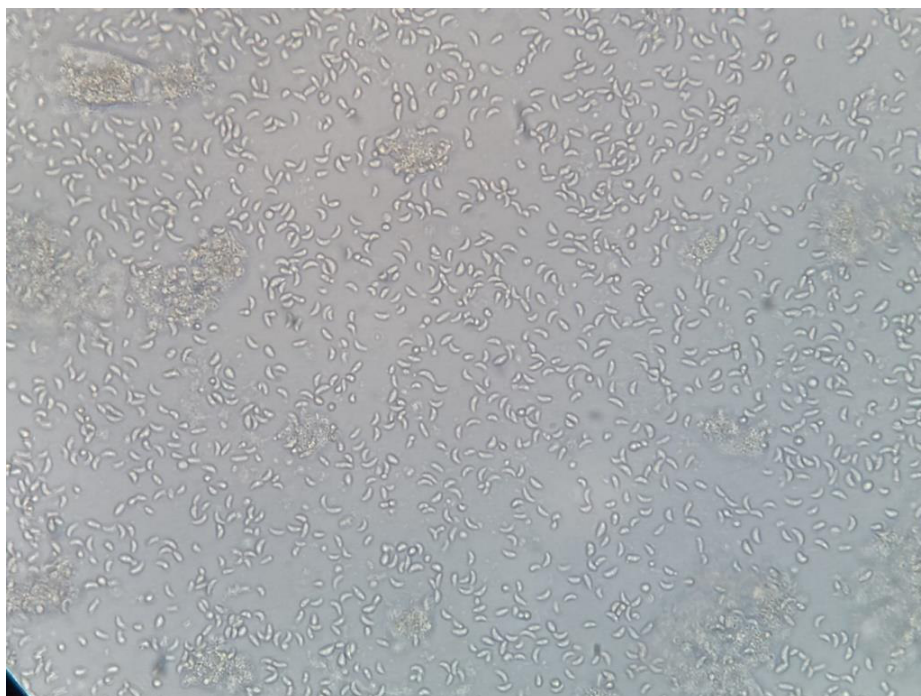
**Figura N° 32.** Cultivo celular LLC-MK2 infectadas con taquizoitos de *Toxoplasma gondii*.



**Figura N° 33.** Mantenimiento de las células LLC-MK2. (A) Recipientes para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> y 25 cm<sup>2</sup>. (B) *Flask* o recipiente de cultivo con células LLC-MK2. (C) *Flask* o recipiente de cultivo con células LLC-MK2 infectadas con *T. gondii*.



**Figura N° 34.** Frascos de cultivo celular con línea celular LLC-MK2 infectadas con *T. gondii* colocadas en la incubadora con CO<sub>2</sub> a 37 °C.



**Figura N° 35.** Vista del frasco de cultivo celular infectado, observado mediante microscopio invertido a 40X. Se aprecian taquizoitos de *T. gondii* en crecimiento exponencial.



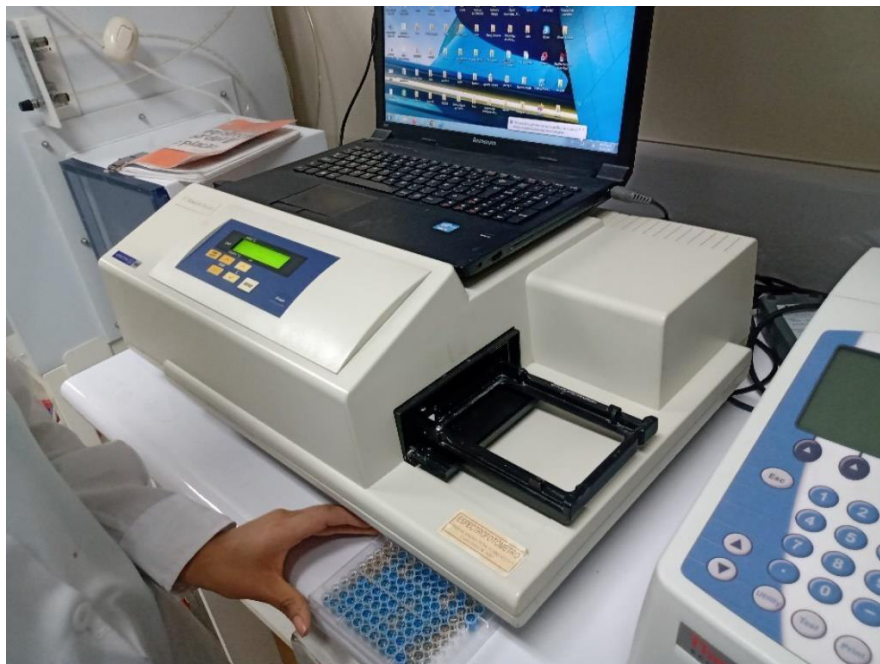
**Figura N° 36.** Sonicator empleado para el fraccionamiento de taquizoitos. (A) Taquizoitos de *T. gondii* en PBS colocados en hielo listos para ser sonicados para la obtención de antígeno total lisado (TLA) y antígenos de membrana (AM). (B) Sonicator Misonix 3000.



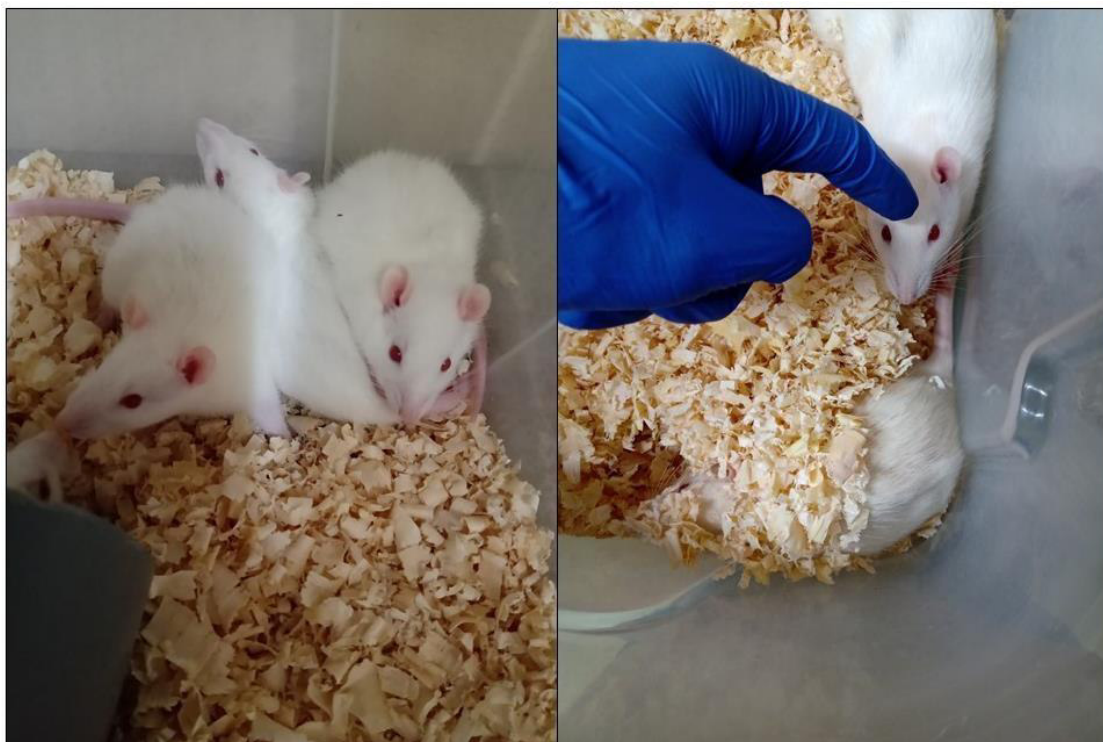
**Figura N° 37.** Microcentrífuga refrigerada Purispin 17R, utilizada para la obtención de la fracción de membrana en el paso final para la obtención de antígenos de membrana.



**Figura N° 38.** Microcentrífuga MicroCL 21 utilizada para la separación de las proteínas de la fracción citoplasmática y la fracción de membrana, para la obtención de antígenos de membrana.



**Figura N° 39.** Espectrofotómetro utilizado para medir la absorbancias y conseguir las concentraciones de los antígenos obtenidos

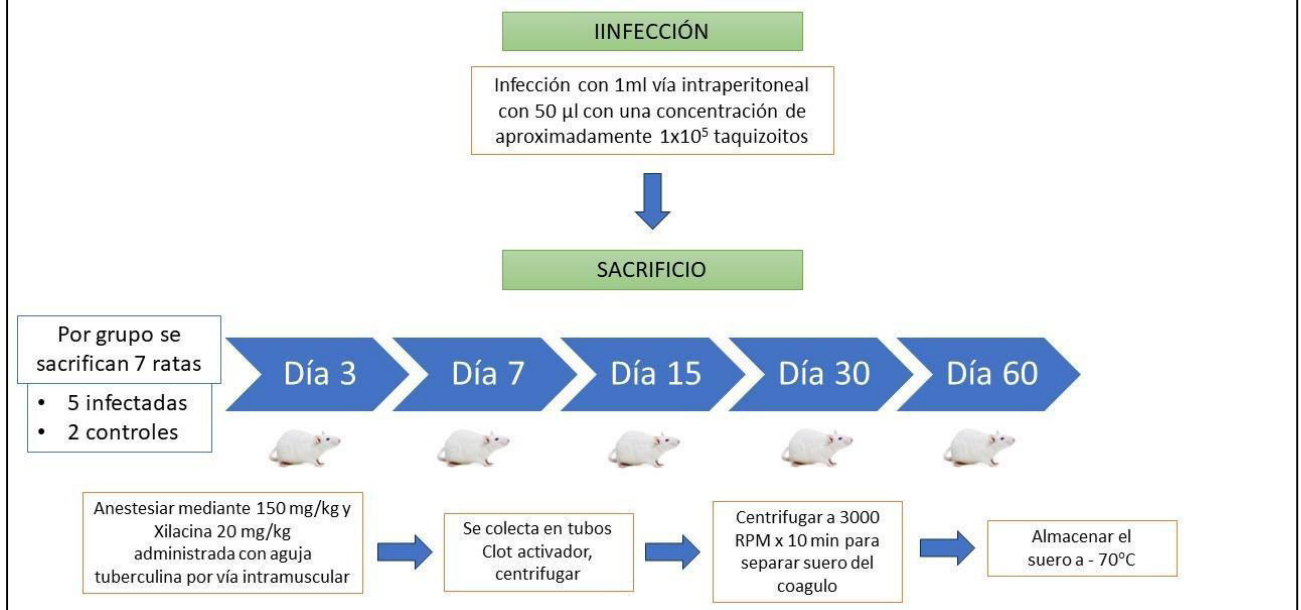


**Figura N° 40.** *Rattus norvegicus* cepa Holtzman, todas machos, infectadas con *T. gondii*



**Figura N° 41.** Sacrificio de ratas para la obtención de sangre mediante punción cardiaca, sangría total.

## Obtención de suero agudo y crónico *Toxoplasma gondii* modelo ratas



**Figura N° 42.** Flujograma de inoculación en ratones

**Tabla N° 15.** Códigos de los sueros usados divididos en los grupos de fase aguda, fase crónica y grupo inmunocompetente.

Grupo 1 (G1)- Fase aguda		Grupo 2 (G2) – Fase crónica		Grupo 3 (G3) - Inmunocompetentes	
Orden	Código	Orden	Código	Orden	Código
1	G1A - 1	17	G2C - 1	32	G3I - 1
2	G1A - 2	18	G2C - 2	33	G3I - 2
3	G1A - 3	19	G2C - 3	34	G3I - 3
4	G1A - 4	20	G2C - 4	35	G3I - 4
5	G1A - 5	21	G2C - 5	36	G3I - 5
6	G1A - 6	22	G2C - 6	37	G3I - 6
7	G1A - 7	23	G2C - 7	38	G3I - 7
8	G1A - 8	24	G2C - 8	39	G3I - 8
9	G1A - 9	25	G2C - 9	40	G3I - 9
10	G1A - 10	26	G2C - 10	41	G3I - 10
11	G1A - 11	27	G2C - 11	42	G3I - 11
12	G1A - 12	28	G2C - 12	43	G3I - 12
13	G1A - 13	29	G2C - 13	44	G3I - 13
14	G1A - 14	30	G2C - 14	45	G3I - 14
15	G1A - 15	31	G2C - 15	46	G3I - 15
16	G2A - 16			47	G3I - 16



# CARTA DE APROBACIÓN DE ÉTICA



VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

## CONSTANCIA 015-04-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Evaluación de antígenos de *Toxoplasma gondii* para la detección de toxoplasmosis usando un modelo animal".

Código de inscripción : 210803

Investigador(s) principal(es) : Verastegui Pimentel, Manuela Renee

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 15 de mayo del 2023.



La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, derivaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el 21 de mayo del 2024. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

*El presente proyecto de investigación sólo podrá iniciarse después de haber obtenido la(s) autorización(es) de la(s) institución(es) donde se ejecutará.*

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 22 de mayo del 2023.

  
  
Dr. Mannel Gasco Tautiebucó  
Presidente  
Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

/ 07

Av. Honorio Delgado 430  
San Martín de Porres  
Apartado postal 4314  
319 0000 Anexo 205302  
vriwe@oficina-upch.pe  
www.cayetano.edu.pe

## XII. APÉNDICE

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **AMORTIGUADOR DEL GEL STAKING**

**1.0 M Tris - HCl (pH = 6.8)**

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Tris (PM = 121.14)</i>	<i>12.114 g</i>
<i>Agua Milli-Q</i>	<i>Aforar a 100 ml</i>

*Ajustar el pH = 6.8 con HCl*

- **AMORTIGUADOR DEL GEL DE RESOLUCIÓN**

**1.5 M Tris - HCl (pH = 8.8)**

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Tris (PM = 121.14)</i>	<i>18.17 g</i>
<i>Agua Milli-Q</i>	<i>Aforar a 100 ml</i>

*Ajustar el pH = 8.8 con HCl*

- **ACRILAMIDA AL 30 %**

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Acrilamida</i>	<i>29 g</i>
<i>Bis-acrilamida</i>	<i>1g</i>

*Aforar con Agua Milli-Q a 100 ml*

- **AMONIO PERSULFATO (APS) 10 %**

Tomar 0.1 g de Amonio Persulfato  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  y disolver en 1 ml de agua Milli-Q. Mezclar bien y almacenar la solución en un tubo de 2.0 ml a una temperatura de 4 °C.

- **SDS 10 %**

Tomar 10 gramos de SDS y disolverlos en 80 ml de agua Milli-Q. Posteriormente, ajusta el volumen hasta los 100 ml. Dicha solución puede conservarse estable por 6 meses a temperatura ambiente.

- **PREPARACIÓN DEL GEL STANKING 5 %**

**Volúmenes de los componentes (ml)**

<b>Componentes</b>	<b>1mL</b>	<b>2mL</b>	<b>3mL</b>	<b>4mL</b>	<b>5mL</b>	<b>6mL</b>	<b>8mL</b>	<b>10mL</b>
<b>Agua Mili-Q</b>	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
<b>Acrilamida30%</b>	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
<b>1.5M Tris-HCl(pH=6.8)</b>	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
<b>10% SDS</b>	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
<b>10% APS</b>	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
<b>TEMED</b>	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

- **PREPARACIÓN DEL GEL DE RESOLUCIÓN 12 %**

**Volúmenes de los componentes (ml)**

<b>Componentes</b>	<b>5ml</b>	<b>10 ml</b>	<b>15 ml</b>	<b>20 ml</b>	<b>25 ml</b>	<b>30 ml</b>	<b>40 ml</b>	<b>50 ml</b>
<b>Agua Mili-Q</b>	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
<b>Acrilamida 30%</b>	2	4	6	8	10	12	16	20
<b>1.5M Tris-HCl (pH = 8.8)</b>	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
<b>10% SDS</b>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<b>10% APS</b>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<b>TEMED</b>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

- **COLORANTE MARCADOR (Tracking dye)**

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Azul de bromofenol</i>	<i>50 mg</i>
<i>Tris pH 8</i>	<i>1 ml</i>
<i>Glicerol</i>	<i>8 ml</i>
<i>Agua Milli-Q</i>	<i>1 ml</i>

*Homogenizar por 3 horas (agitación constante) y almacenar en alícuotas de 0.5 ml a -20°C hasta 6 meses.*

- **SAMPLE BUFFER**

<i>Componentes</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Ditiotreitol (DTT) (PM = 154,253)</i>	<i>0.019 g</i>
<i>Tracking Dye</i>	<i>100 µl</i>
<i>SDS 10%</i>	<i>150 µl</i>
<i>Agua Milli-Q</i>	<i>50 µl</i>

*Disolver 0.019 g de DTT en 50 µl de Agua Milli-Q y añadir el resto de componentes. Almacenar a -20°C.*

- **BUFFER 1 PARA LA OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE MEMBRANA**

<i>Componentes</i>	<i>Concentración</i>
<i>HEPES (pH 7.4)</i>	<i>50 mM</i>
<i>NaCl</i>	<i>150 mM</i>
<i>Saponin</i>	<i>0.05 %</i>
<i>PMSF</i>	<i>1 mM</i>
<i>Leupeptin</i>	<i>5 µg/ml</i>
<i>Aprotinin</i>	<i>2 µg/ml</i>
<i>Pepstatin A</i>	<i>1 µg/ml</i>

*Preparar justo antes de usar y colocar en hielo.*

- **BUFFER 2 PARA LA OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE MEMBRANA**

<i>Componentes</i>	<i>Concentración</i>
<i>HEPES (pH 7.4)</i>	<i>50 mM</i>
<i>NaCl</i>	<i>150 mM</i>
<i>IGEPAL® CA-630 solution</i>	<i>0.05 %</i>
<i>PMSF</i>	<i>1 mM</i>
<i>Leupeptin</i>	<i>5 µg/ml</i>
<i>Aprotinin</i>	<i>2 µg/ml</i>
<i>Pepstatin A</i>	<i>1 µg/ml</i>

*Preparar justo antes de usar y colocar en hielo.*