



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

Serotipificación de infección por *Toxoplasma gondii* en humanos, animales
domésticos y silvestres

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIZBETH XICOTÉNCATL GARCÍA

Tutora:

Dra. María Dolores Correa Beltrán
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Comité tutorial:

Dra. Irene Cruz Mendoza
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Dr. Julio Vicente Figueroa Millán
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

México, D.F. Junio 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación, bajo la dirección de la Dra. María Dolores Correa Beltrán.

La alumna fue becaria de CONACYT de agosto del 2010 a julio del 2012 con número de registro 370857 y el proyecto fue parcialmente apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social del CONACYT; convenio No. 1811

Dedicatoria

A la memoria de mi padre:

No hay día que pase sin recordarte, estas en mi mente y en mi corazón, te extraño mucho ruquito, me encantaría que estuvieras aquí para abrazarte y compartir contigo este logro, pero sé que desde donde te encuentras me cuidas y guías mi camino, me has dejado lo mejor de ti, que es la educación y el entusiasmo de nunca rendirse por lo que se anhela, con base en el esfuerzo y dedicación.

A mi familia que son mi razón para seguir adelante y el mejor regalo que la vida podría otorgarme, los amo.

A mi mamá, te admiró por tu gran fortaleza y coraje para seguir adelante, eres una gran mujer y le doy gracias a Dios por tenerte como mi madre y mi amiga.

A mis hermanos, por permanecer unidos en las buenas y en las malas, por su enorme apoyo y cariño.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi Facultad de Medicina Veterinaria, por abrir sus puertas y brindarme la oportunidad de estudiar en sus recintos. Me siento muy orgullosa de ser parte de la gran familia universitaria.

A todos mis profesores por compartir su conocimiento y pasión por la Medicina Veterinaria.

A mí tutora Dra. María Dolores Correa Beltrán por su guía, apoyo, dedicación, tiempo y esfuerzo en esta etapa de mi vida, gracias por todas esas ocasiones en las cuales nos sentamos a discutir esta tesis y por transmitirme el gusto por la ciencia, gracias por su amistad.

A mí comité tutorial: Dra. Irene Cruz Mendoza y Dr. Julio V. Figueroa Millán, les agradezco su asistencia a los tutorales, su tiempo dedicado a la lectura de cada informe, por todas sus sugerencias y atenciones en el desarrollo de esta tesis.

A los integrantes de mí jurado de examen: Dra. Ana María Cevallos Gaos, Dra. Guillermina Ávila Ramírez, Dra. Yazmín Alcalá Canto y Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, de los cuales me siento muy orgullosa que me los hayan asignado como jurado, porque son académicos que aman su profesión y están comprometidos con su trabajo, les agradezco su tiempo invertido en la lectura de mi tesis y por todas las sugerencias para que este documento se fortaleciera.

M en C Heriberto Caballero, gracias por apoyarme en las todas las ocasiones que necesitaba de tú ayuda y que tenía dudas, por tus consejos; he aprendido mucho de ti, pero sobre todo gracias por tu amistad.

M en C Claudia Rico (vecinita), gracias por ser mi amiga, por sus explicaciones y consejos en el laboratorio, por todas sus atenciones y el tiempo compartido, la quiero mucho.

MVZ Carlos Cedillo, por todo su tiempo y dedicación no solo durante esta tesis sino desde que lo conozco, usted me ha ayudado y apoyado mucho en mi formación profesional, gracias por compartir su conocimiento y su amistad.

MVZ Alejandro Besné, gracias hermano por apoyarme y ayudarme siempre que lo he necesitado, por enseñarme que a veces es bueno no preocuparse tanto.

A todos los miembros del LIE: Belinda, Irma, Sandra, Esthér, José Luis, José Antonio, Lulú, solo me queda decirles GRACIAS por dejarme ser parte de este

laboratorio y por compartir conmigo esta etapa de mi vida, porque cada uno de ustedes me ha brindado su ayuda, sus consejos y su amistad, los aprecié mucho y deseo que me permitan seguir aprendiendo de ustedes.

Héctor Luna y Rafael Reboseño, gracias por su enorme apoyo, sin ustedes parte de esta tesis no sería posible.

Laura Castañeda, gracias por todo tu apoyo, ayuda, gentileza pero sobre todo por tu amistad, eres una persona con un gran corazón, te quiero mucho Anita.

Luis Valenzuela, gracias por tu amistad y tu apoyo en las dudas computacionales y de fauna silvestre.

A los miembros del Laboratorio de Bioquímica Genética:

Dr. Sergio Flores Enríquez, muchas gracias por todo tu entusiasmo, tiempo y dedicación para esta tesis, muchos de los resultados de este escrito no serían posibles sin usted, gracias por brindarme su amistad y conocimiento.

Dra. Sara Mendéz, por resolver mis dudas, por tu apoyo, ayuda y consejos pero sobre todo por brindarme tu amistad y tu confianza, te quiero Sarita.

Dra. Itzhel García, gracias por todas tus atenciones, por apoyarme con artículos y resolver mis dudas.

A todos mis amigos que me han brindado su alegría, sus sonrisas, ánimos y buena vibra para esta tesis: Perla Acevedo, Mónica Aguilar, Claudia Valdez, Ninnet Gómez, Lázaro Verdiguél, Isabel, Rebeca Padilla y Carlos Jiménez.

Elvecia Chapa y Alma, por su amistad y continuar conmigo desde la facultad, las quiero.

A mí familia, por continuar caminando a mí lado durante todo el trayecto de este proyecto, por ayudarme a levantarme y darme ánimos cuando sentía que ya no lo lograría.

Gracias a la vida y a Dios, por permitirme seguir adelante y brindarme luz en mis horas de oscuridad.

Resumen

Toxoplasma gondii inicialmente se clasificó en tres linajes clásicos I, II y III de acuerdo con su virulencia en ratones y en cultivo celulares; posteriormente esta diversidad se reafirmó con base en sus características genéticas. En la actualidad, se han identificado otros linajes atípicos o recombinantes. Las técnicas para la caracterización genética del parásito son dependientes de DNA; sin embargo, las muestras generalmente se obtienen de pacientes con sintomatología clínica, lo que en ocasiones limita la cantidad de material genético necesario. La serotipificación es una alternativa que se basa en el reconocimiento de péptidos sintéticos provenientes de proteínas antigénicas y polimórficas por anticuerpos séricos de huéspedes infectados con linajes específicos. Algunos estudios previos han empleado péptidos del extremo C-terminal de las proteínas de los gránulos densos GRA6 y GRA7. No obstante, existen otras regiones que podrían ser elegidas para este fin, además de otras proteínas de superficie como SAG1 que es una de las más utilizadas en el diagnóstico de esta parasitosis. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estandarizar un ELISA para la detección de los linajes clásicos I, II y III de *T. gondii* en seres humanos, animales domésticos y silvestres. Se diseñaron *in silico* tres péptidos de las proteínas de GRA6 (GRA6-I, -II y -III), tres de GRA7 (GRA7-I, -II y -III) y dos de SAG1 (SAG1-I y -II/III), incluyendo regiones polimórficas de toda la secuencia de cada proteína y considerando criterios de hidrofiliidad, antigenicidad, exposición y la predicción de un modelo tridimensional para cada uno de los péptidos; las secuencias obtenidas se usaron para construir péptidos de distintas regiones unidos por espaciadores antigénicamente neutros. Con el fin de contar con sueros control específicos de linaje, se inmunizaron o infectaron ratones BALB/c con cada una de las cepas clásicas (RH, tipo I; ME49, tipo II; VEG, tipo III), evaluando la respuesta de anticuerpos de clase IgG presentes en los sueros de estos roedores con los péptidos homólogos y heterólogos. Una vez establecidas las condiciones del inmunoensayo se probaron sueros positivos a la infección por *T. gondii* de seres humanos (dos binomios madre-hijo, una mujer y un neonato), un perro, un gato y un oso negro. Se calcularon puntos de corte, considerando la media de los sueros negativos incluidos por placa más dos o tres SD, dependiendo de la especie. Los sueros de los ratones que fueron infectados con *T. gondii*, cepas tipo II y III, no reaccionaron con los péptidos homólogos de GRA7 ni SAG1, mientras que los anticuerpos de los ratones inmunizados con la cepa tipo I reaccionaron con sus péptidos homólogos y no con los heterólogos II y III. Los ensayos con el péptido GRA6-II permitieron diferenciar las infecciones de los parásitos tipo II de los tipos I o III en los ratones, los seres humanos y el perro. Con el empleo de los péptidos GRA7 y SAG1 se lograron determinar los serotipos de uno de los binomios (tipo III/I), de un neonato y de una mujer (tipo I); estos resultados coincidieron con sus respectivos genotipos. Los datos obtenidos reflejan la posibilidad de identificar el tipo de cepa de *T. gondii* mediante serología en diferentes especies.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, linajes, péptidos sintéticos, serotipo, genotipo.

Abstract

Toxoplasma gondii has been classified in three classical lineages -I, II and III- according to their virulence in mice and in cell culture. Further, this diversity based on genetic characteristics was confirmed. Currently, other lineages have been identified, classified as atypic or recombinant. Techniques for the genetic characterization of the parasite are dependent of DNA; however, samples are usually obtained from patients with clinical symptoms and sometimes, the amount of genetic material extracted is limited. Serotyping is currently used for *T. gondii* typing. This technique is based on the recognition of synthetic peptides derived from antigenic and polymorphic proteins by antibodies of infected host. Previous studies have employed peptides of the C-terminal region of the dense granules proteins GRA6 and GRA7. However, there are other regions of these molecules and other immunodominant antigens, like surface antigen 1 (or p30, SAG1) that can be used for this purpose. Therefore, the aim of this work was to standardise an ELISA for the differentiation infections due to *T. gondii* lineages I, II and III in human beings, domestic and wild animals. Three peptides of proteins GRA6 (GRA6-I, -II and -III), three of GRA7 (GRA7-I, -II and -III) and two of SAG1 (SAG1-I and -II / III) were designed *in silico*, including polymorphic regions of the complete protein sequences and considering hydrophilicity, antigenicity, surface exposure and a three-dimensional prediction model for each peptide; non-antigenic linkers were inserted among regions. Experimental immunization or infection of BALB/c mice with the classical strains (RH, type I; ME49, type II; VEG, type III) were done in order to have lineage-specific control sera. Besides, and once established the immunoassay conditions, positive serum samples from human beings (two mother-child pairs, a woman and a newborn), a dog, a cat and a black bear were tested. Cut-off points were calculated, considering the mean of the negative sera included by plate plus two or three SD, depending on the species. Sera from infected with *T. gondii* strains type II and III did not react with the homologous GRA7 or SAG1 peptides, while mice immunized with the type I strain antigen reacted with the homologous peptides but not with the heterologous II and III. GRA6-II peptide allowed distinction of *T. gondii* infections due to type II from those of types I and III in mice, human beings and dogs. GRA7 and SAG1 peptides discriminated the serotypes of one of the human pairs, a newborn and a woman, and correlated with the genotype as assessed molecularly. The data obtained show the possibility of identifying the type strain by ELISA in different species.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, lineages, synthetic peptides, serotype, genotype

Lista de cuadros:

	Página
Cuadro 1. Técnicas de diagnóstico para toxoplasmosis	29
Cuadro 2. Muestras de sueros con resultados previos de genotipo	44
Cuadro 3. Secuencias de aminoácidos de <i>T. gondii</i> seleccionadas para el diseño de péptidos sintéticos	
Cuadro 4. Aminoácidos seleccionados de las proteínas SAG1, GRA6 y GRA7 de <i>T. gondii</i> para el diseño de los péptidos sintéticos	67
Cuadro 5. Características de secuencias de péptidos sintéticos de <i>T. gondii</i>	69
Cuadro 6. Péptidos sintéticos de GRA6 de <i>T. gondii</i> reportados en la literatura	91
Cuadro 7. Péptidos sintéticos de GRA7 de <i>T. gondii</i> reportados en la literatura	95

Lista de figuras:

	Página
Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de un taquizoito de <i>T. gondii</i> proveniente de exudado de ratón	3
Figura 2. Estadios infecciosos de <i>T.gondii</i>	5
Figura 3. Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	7
Figura 4. Esquema de la secuencia de infección de <i>T. gondii</i> en una célula huésped	9
Figura 5. Estructura tridimensional de SAG1 de <i>T. gondii</i>	11
Figura 6. Esquema representativo de la formación de la vacuola parásitofora de <i>T. gondii</i>	15
Figura 7. Cinética de la respuesta inmune humoral a la primo infección de <i>T. gondii</i>	16
Figura 8. Análisis filogenético de 66 cepas de <i>T. gondii</i>	21
Figura 9. Análisis filogenético de 956 cepas de <i>T. gondii</i>	23
Figura 10. Mapa de seroprevalencia en población mexicana	26
Figura 11. Mapa de estudios de genética de <i>T. gondii</i> en México	28
Figura 12. Flujograma de estrategia general	42
Figura 13. Flujograma del modelaje tridimensional de péptidos sintéticos GRA6, GRA7, SAG1 de <i>T. gondii</i>	51
Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (ME49) y III (C56) de la proteína GRA6	56
Figura 15. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (Beverley) y III (C56) de la proteína GRA7	57
Figura 16. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (Beverley) y III (C56) de la proteína SAG1	58
Figura 17. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (Beverley) y III (C56) de la proteína SAG2	59

Figura 18. Predicción de péptido señal de las secuencias de GRA6, GRA7 y SAG1 de la cepa I (GT1)	61
Figura 19. Predicción de regiones transmembranales	62
Figura 20. Predicción de hidrofobicidad	63
Figura 21 Predicción de hidrofiliidad de la cepa I (RH)	64
Figura 22. Gráfico representativo de hidrofiliidad de GRA6 de la cepa I (RH)	65
Figura 23. Predicción de la estructura secundaria en las secuencias de los péptidos sintéticos	71
Figura 24. Estructura tridimensional de los péptidos de la proteína GRA6	72
Figura 25. Estructura tridimensional de los péptidos de la proteína GRA7	73
Figura 26. Estructura tridimensional de los péptidos de la proteína SAG1	74
Figura 27. Cinética de anticuerpos de tipo IgG de ratones Balb/c	75
Figura 28. Discriminación serológica en sueros de ratones positivos a cepas clásicas de <i>T. gondii</i> con péptidos homólogos de GRA6, GRA7 y SAG1 con tres concentraciones	76
Figura 29. Discriminación serológica de cepas clásicas de <i>T. gondii</i> en suero de ratones con péptidos sintéticos de GRA6, GRA7 y SAG1	78
Figura 30. Discriminación serológica de cepas clásicas de <i>T. gondii</i> en suero de perros con péptidos sintéticos de A) GRA6, B) GRA7 y C) SAG1 (5 µg/ml).	80
Figura 31. Discriminación serológica de cepas clásicas de <i>T. gondii</i> en suero de gatos con péptidos sintéticos de GRA6 I, II y III (5 µg/ml).	81
Figura 32. Discriminación serológica de cepas clásicas de <i>T. gondii</i> en un suero de oso negro con los péptidos sintéticos de A) GRA6, B) GRA7 I, II y III y C) SAG1 I, II/III (5 µg/ml).	82
Figura 33. Discriminación serológica de cepas clásicas de <i>T. gondii</i> en sueros de seres humanos con péptidos sintéticos de GRA6 (5 µg/ml).	84
Figura 34. Discriminación serológica de cepas clásicas de <i>T. gondii</i> en sueros de seres humanos con péptidos sintéticos de GRA7.	85

Figura 35. Discriminación serológica de cepas clásicas de <i>T. gondii</i> en sueros de seres humanos con péptidos sintéticos de SAG1	87
Figura 36. Estructura cristalográfica de SAG1 (código PDB 1KZQ).	93

Lista de abreviaturas

AMA1. Antígeno de Membrana Apical 1.

APSSP. Servidor Avanzado de Predicción de Estructura Secundaria.

BLAST. Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Básicos Locales.

BCR B. Receptor de Células B.

Ca. Calcio.

CD4+. Cúmulo de diferenciación 4.

CD8+. Cúmulo de diferenciación 8.

cDNA. Acido Desoxirribonucleico Complementario.

CPAs. Células Presentadoras de Antígeno.

DF. Distrito Federal.

ELISA. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

ENSA. Encuesta Nacional de Salud.

EUA. Estados Unidos de América.

GPI. Glucosilfosfatidilinositol.

GRA. Gránulo denso.

HeLa. Henrietta Lacks, nombre de la paciente donde se aislaron célula de cáncer cervicouterino, usados en cultivo celular.

HOSTs. Término informático acuñado para describir una de las conexiones en la vacuola parásitofora de *T. gondii*, refiriéndose a una serie de estructuras conectadas en una red que proveen y a su vez, se sirven de ella.

HPLC. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

Hz. Hertz, unidad de frecuencia en el Sistema Internacional de Unidades.

ICAM-1. Molécula de Adhesión Intercelular.

IFN. Interferón

IgA. Inmunoglobulina A.

IgG. Inmunoglobulina G.

IgM. Inmunoglobulina M.

IL. Interleucina.

INP. Instituto Nacional de Pediatría.

INPer. Instituto Nacional de Perinatología.

Kb. Kilo base.

kDa. Kilodaltons

KLH. Hemocianina de lapa californiana.

MAT. Prueba de Aglutinación Modificada.

MHC. Complejo Principal de Histocompatibilidad.

MIC. Micronemas.

MJ. Unión móvil.

mRNA. Ácido ribonucleico mensajero.

MVP. Membrana de la vacuola parásitofora.

NaCl. Cloruro de Sodio.

NK. Células Asesinas Naturales.
NMN. Red Membranosa Nanotubular.
NTPase. Nucleotido trifosfatasa.
PAMs. Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.
Pb. Pares de bases.
PBS. Tampón fosfato salino.
PBS-T. Tampón Fosfato Salino con Tween.
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.
Ph. Indica concentración de iones de hidronio. Medida de acidez o alcalinidad.
PSVS. Servidor de Validación de Estructura de Proteína.
RON. Proteínas del Anillo o Cuello Roptrial.
ROP. Roptrias
Rpm. Revoluciones por minuto. Medida para expresar velocidad angular.
RFLP. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción.
SAG1. Antígeno de Superficie 1.
SAGs. Antígenos de Superficie.
SNP. Polimorfismo de Nucleótido Simple.
SRS. Secuencias Relacionadas a SAG1.
TH1 y TH2. Células T Cooperadoras 1 y 2.
TLR. Receptor tipo Toll.
TORCH. Toxoplasma, Rubeola, Citomegalovirus y Hepatitis.
ToxoDB. Banco de datos de *Toxoplasma gondii*.
UI. Unidades Internacionales.
VERO. Células de riñón de mono verde.
VIH. Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

Contenido

Dedicatoria.....	II
Agradecimientos	III
Resumen	V
Abstract.....	VI
Lista de cuadros:.....	VII
Lista de figuras:.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	XI
1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Taxonomía	1
1.3 Estructura de los estadios infecciosos de <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.4 Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	5
1.5 Mecanismo de invasión celular por <i>T. gondii</i>	8
1.6 Antígenos de <i>T. gondii</i>	10
1.6.1 Antígenos de superficie (SAGs)	10
1.6.2 Proteínas de gránulos densos (GRAs).....	12
1.7 Respuesta inmune contra <i>T. gondii</i>	14
1.8 Epidemiología, patogenia y algunos aspectos clínicos.....	17
1.9 Generalidades genéticas de <i>T. gondii</i>	19
1.10 Epidemiología de <i>T. gondii</i> en México	23
1.11.2 Diagnóstico indirecto	31
1.11.2.2 Serotipificación	32
1.12 El uso de la bioinformática para el modelaje de estructuras.....	34
1.12.1. Modelaje de proteínas	35
1.12.1.2 Modelado por reconocimiento del plegamiento (threading).....	35
1.12.1.3 Modelado <i>ab initio</i>	36
2. Justificación	36
3. Hipótesis	37

4. Objetivo general.....	37
4.1 Objetivo particular	37
5. Material y metodología	38
5.1 Material biológico.....	39
5.1.1 Taquizoitos de <i>T. gondii</i>	39
5.1.2 Sueros de seres humanos y animales.....	40
5.1.3 Infección experimental de ratones con taquizoitos de las cepas ME49 (II) y VEG (III) de <i>T. gondii</i>	42
5.1.4 Inmunización de ratones con extracto crudo de la cepa RH (I) de <i>T. gondii</i>	42
5.2 Diseño <i>in silico</i> de péptidos sintéticos	43
5.2.3 Alineamiento de las secuencias genéticas de <i>GRA6</i> , <i>GRA7</i> , <i>SAG1</i> y <i>SAG2</i> de <i>T. gondii</i>	45
5.2.4 Predicción de péptido señal, regiones intramembranales, hidrofili- cidad e hidrofobicidad en secuencias genéticas de <i>GRA6</i> , <i>GRA7</i> , <i>SAG1</i> y <i>SAG2</i> de <i>T.</i> <i>gondii</i>	45
5.2.5 Identificación de péptido señal	46
5.2.6 Identificación de regiones intra-membranales, hidrofóbicas e hidrofílicas	46
5.2.7 Predicción de epítopos para linfocitos B.....	46
5.2.8 Modelaje de estructura tridimensional de péptidos sintéticos de <i>GRA6</i> , <i>GRA7</i> y <i>T. gondii</i>	47
5.2.9 Búsqueda de secuencias homólogas de los péptidos sintéticos	49
5.2.10 Predicción de la estructura secundaria.....	49
5.2.11 Modelaje por homología	49
5.3 Síntesis de péptidos sintéticos	50
5.4 Reconstitución de los péptidos.....	50
5.5 ELISA indirecto para determinación de anticuerpos de tipo IgG en ratones infectados e inmunizados	50
5.6 ELISA indirecto usando péptidos sintéticos como antígeno	51
6. Resultados	53
6.1 Alineamiento de secuencias	53

6.2 Identificación de péptido señal	57
6.3 Regiones intramembranales	59
6.4 Regiones hidrofóbicas	60
6.5 Regiones hidrofílicas	61
6.6 Predicción de inmunogenicidad y epítomos para linfocitos B	62
6.7 Secuencias de péptidos sintéticos.....	66
6.8 Modelaje de la estructura tridimensional de péptidos sintéticos de <i>T. gondii</i>	68
6.8.2 Obtención de modelo tridimensional de péptidos sintéticos	69
6.9 Cinética de anticuerpos de tipo IgG de ratones inmunizados con extracto crudo de la cepa RH y ratones infectados con taquizoitos de la cepa ME49 y VEG de <i>T.gondii</i>	72
6.10 Serotipificación en ratones positivos a la infección experimental de <i>T. gondii</i> con cepas I, II y III	74
6.11 Serotipificación de cepas de <i>T. gondii</i> en animales domésticos y silvestres	77
6.12 Serotipificación de <i>T. gondii</i> en seres humanos	80
7. Discusión	86
10. Referencias.....	94

1. Introducción

1.1 Generalidades

Toxoplasma gondii es un parásito unicelular cosmopolita intracelular obligado, que infecta probablemente a todos los vertebrados homeotermos (mamíferos terrestres, marinos y aves) causando importantes problemas clínicos y zootécnicos (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2007; Tenter, 2009). Aproximadamente uno de cada tres individuos alrededor del mundo está infectado, con intervalos de prevalencia entre 12 y 90%, la cual se incrementa con la edad (Hegab y Al-Mutawa, 2003; Hill *et al*, 2005).

A partir del descubrimiento de *Toxoplasma gondii* en 1908 en Francia por Nicolle y Manceaux en el roedor *Ctenodactylus gondii* y simultáneamente en Brasil por Splendore en un conejo de laboratorio, se ha estudiado ampliamente tanto la biología del parásito como su interrelación con los seres humanos y animales, proporcionando una fuente de aproximadamente 20,000 publicaciones con un promedio de 10 nuevos artículos a la semana en buscadores científicos como PubMed.

1.2 Taxonomía

Hasta el momento, sólo hay una especie descrita para el género, cuya taxonómica es la siguiente (Hill *et al*, 2007; Tenter, 2009):

Phylum Apicomplexa

Clase Sporozoasida

Subclase Coccidiasina

Orden Eimeriorina

Familia Toxoplasmatidae

Género *Toxoplasma*

Especie *Toxoplasma gondii*

1.3 Estructura de los estadios infecciosos de *Toxoplasma gondii*

1.3.1 Taquizoito

Es un estadio invasivo que se puede encontrar tanto en el huésped intermediario como en el definitivo. Este estadio generalmente presenta forma de media luna, aunque también puede observarse de forma redondeada; mide alrededor de 2×6 μm de largo, semejante al diámetro de un glóbulo rojo. Posee un complejo apical en el extremo anterior, característico del Phylum Apicomplexa el cual está cubierto por un complejo membranoso. Dentro de su célula se pueden identificar diferentes estructuras y organelos como anillos apicales y polares, conoide, roptrias, micronemas, mitocondrias, microtúbulos, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, ribosomas, gránulos densos y gránulos de amilopectina. El núcleo se encuentra en el centro de la célula y contiene grupos de cromatina y un nucléolo céntrico (**Figura 1**) (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Ferguson, 2004).

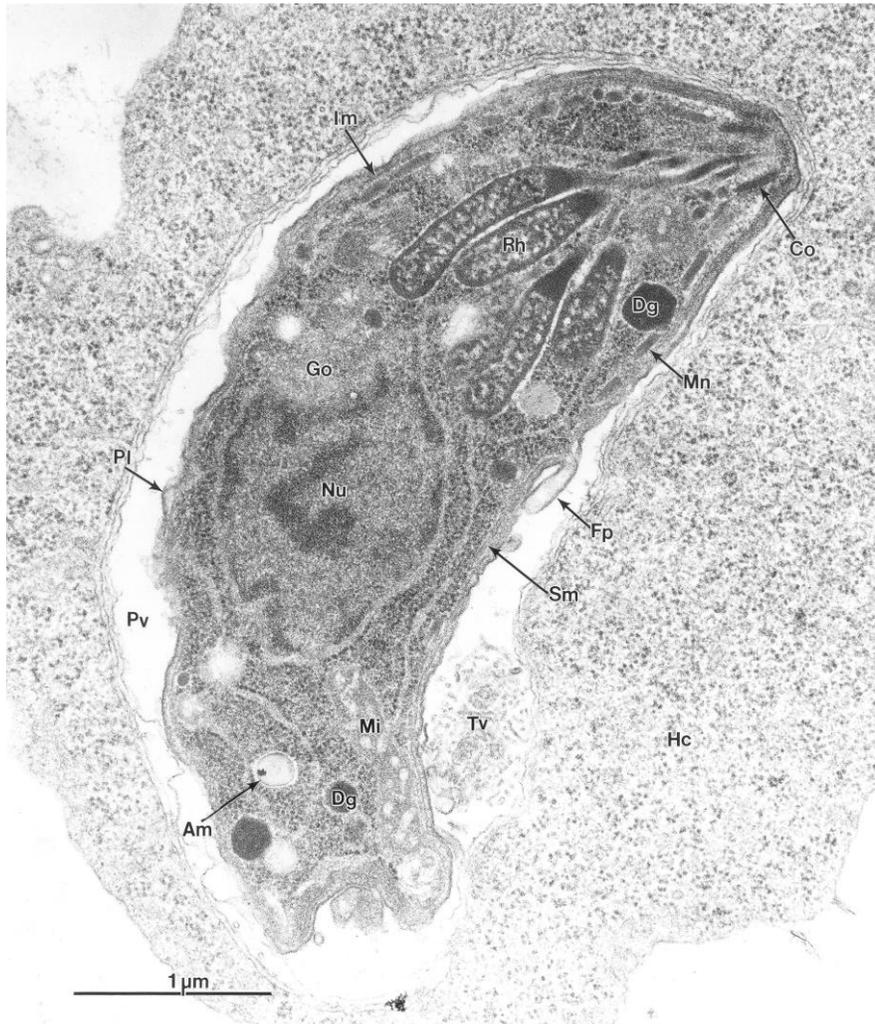


Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de un taquizoito de *T. gondii* proveniente de exudado de ratón. Am, granulo de amilopectina; Co, conoide; Dg, gránulo denso; Fp, proyección del plasmalema del taquizoito; Go, complejo de Golgi; HC, citoplasma de la célula huésped; Im, complejo de la membrana interna; Mi, mitocondria; Mn, micronema; Nu, núcleo; Pl, plasmalema; Pv, vacuola parasitófora; Rh, roptria; Sm, microtúbulos subpelicular; Tv, membranas tubulovesiculares. Escala de la barra 1 μ m. Imagen adquirida y modificada Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005.

1.3.2 Merozoito

Este estadio solo se encuentra a nivel del epitelio intestinal del huésped definitivo (felinos), generando cinco fases asexuales diferentes morfológicamente (A, B, C, D y E). Miden 5.8 x 2.9 μ m aproximadamente. Al conjunto de merozoitos se le llama esquizonte. A partir de los merozoitos tipo E se inicia la replicación sexual para generar los macro y micro gametos (Dubey, Lindsay y Speer, 1998).

1.3.3 Bradizoito

Estadio intracelular que, a diferencia del taquizoito, tiene su núcleo en la parte posterior del parásito. Presenta roptrias con contenido electrodensó, el cual varía de densidad de acuerdo a su longevidad; también contiene abundantes gránulos de amilopectina que son débilmente positivos a la tinción de ácido periódico de Schiff y variable a tinciones con plata. Los bradizoitos miden $7.0 \times 1.5 \mu\text{m}$ y se encuentran dentro de una estructura denominada quiste tisular, resistente a la destrucción por enzimas proteolíticas y alojada en diversos órganos y tejidos. Los quistes jóvenes suelen ser pequeños; sin embargo, conforme van madurando pueden contener cientos o miles de parásitos. Los quistes observados en encéfalo son de forma esférica y miden $60 \mu\text{m}$, mientras que los quistes intramusculares son más alargados llegando a medir hasta $100 \mu\text{m}$ (**Figura 2**) (Dubey, 2009).

1.3.4 Ooquiste

El ooquiste esporulado mide de 11 a $13 \mu\text{m}$ de diámetro; su pared está constituida por tres capas de diferente densidad, conteniendo dos esporoblastos elipsoidales que miden $8 \times 6 \mu\text{m}$ y cada uno cuenta con cuatro esporozoitos. Ultraestructuralmente los esporozoitos son similares a los taquizoitos pero presentan mayor cantidad de micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina. El ooquiste es un estadio extracelular, una vez que llega al intestino delgado los esporozoitos que vienen en su interior son los que se convierten a taquizoitos (**Figura 2**) (Dubey, 2009).

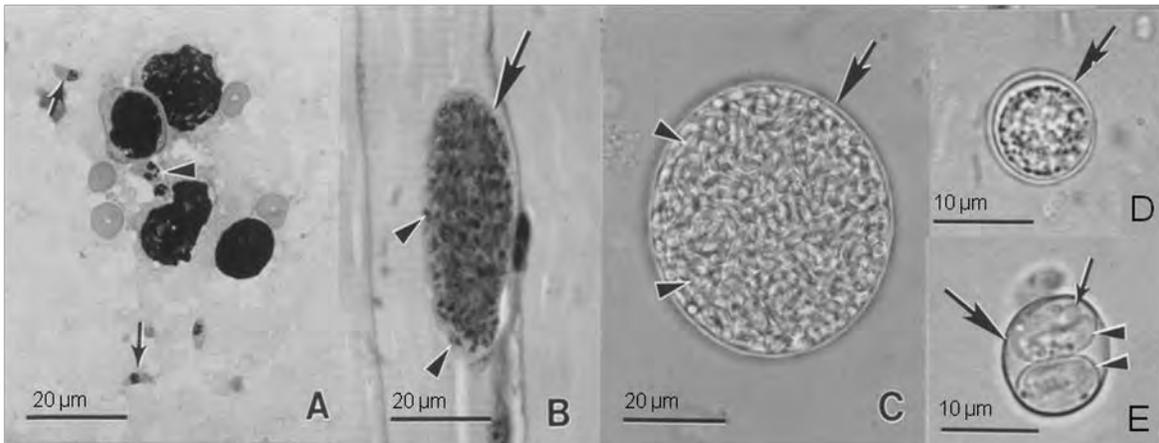


Figura 2. Estadios infecciosos de *T. gondii*. A) Taquizoitos en su forma de luna característica, en un frotis de pulmón (flechas) y algunos taquizoitos en replicación (punta de la flecha). B) Quiste tisular en una sección de músculo. La pared del quiste es delgada (flecha) y contiene bradizoitos (puntas de flecha). C) Quiste proveniente del cerebro de un ratón, se aprecia la pared del quiste (flecha) y cientos de bradizoitos dentro del él (puntas de las flechas). D) Ooquiste no esporulado en las heces de gato infectado, la pared del quiste presenta doble capa (flecha). E) Ooquiste esporulado, la pared del ooquiste presenta doble capa, conteniendo dos esporocistos (puntas de flecha), cada esporocisto tiene cuatro esporozoitos (flecha pequeña). Imagen adquirida y modificada de Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005.

1.4 Ciclo biológico de *T. gondii*

Los miembros de la familia Felidae (gatos domésticos y silvestres) son los huéspedes definitivos, pues en ellos se lleva a cabo la reproducción sexual del parásito. Los huéspedes intermediarios son todos los animales homeotermos, incluyendo al ser humano, dentro de los cuales se lleva a cabo sólo la fase asexual. Los felinos pueden jugar ambos roles. El ciclo de vida inicia cuando un felino consume ooquistes esporulados contenidos en agua contaminada o quistes tisulares en tejidos de presas infectadas. Cualquiera de estos dos estadios llega al aparato digestivo y por la acción de los jugos gástricos y de las enzimas proteolíticas del estómago e intestino delgado, se liberan los esporozoitos (de los ooquistes) o los bradizoitos (de los quistes tisulares) a la luz intestinal, para convertirse en taquizoitos los cuales invaden las células epiteliales del intestino delgado para llevar a cabo primeramente la reproducción asexual llamada

esporogonia, la cual se repite hasta cinco veces (A, B, C, D y E), antes de que los esquizontes se conviertan en gametos; posteriormente se realiza la fase sexual-gametogénesis, fecundación y generación del ooblasto, lo que da origen a millones de ooquistes no esporulados liberados al ambiente con las heces (**Figura 3**). A partir del ingreso del parásito al epitelio intestinal, los taquizoitos tienen la capacidad de atravesar barreras biológicas difundirse a otros órganos además de hacerlo también por vía sanguínea y linfática (Barragan y Sibley, 2002).

El felino tiene un período de eliminación de los ooquistes de 1 a 3 semanas (Dubey y Frenkel, 1972; Dubey, 1998). El ooquiste cuando es expulsado en las heces no se encuentra esporulado para que sea infectivo tiene que esporular, este evento se lleva a cabo en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, siendo más favorables los climas cálido-húmedos. Los ooquistes ya esporulados, tienen la capacidad de permanecer viables e infectivos en el ambiente hasta 18 meses, resistiendo fuerzas físicas y químicas de los desinfectantes comunes (Dubey y Frenkel, 1972; Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Dubey, 2009; Lindsay, Blagburn y Dubey, 2002). El ciclo sexual de este parásito se completa en aproximadamente 66 horas.

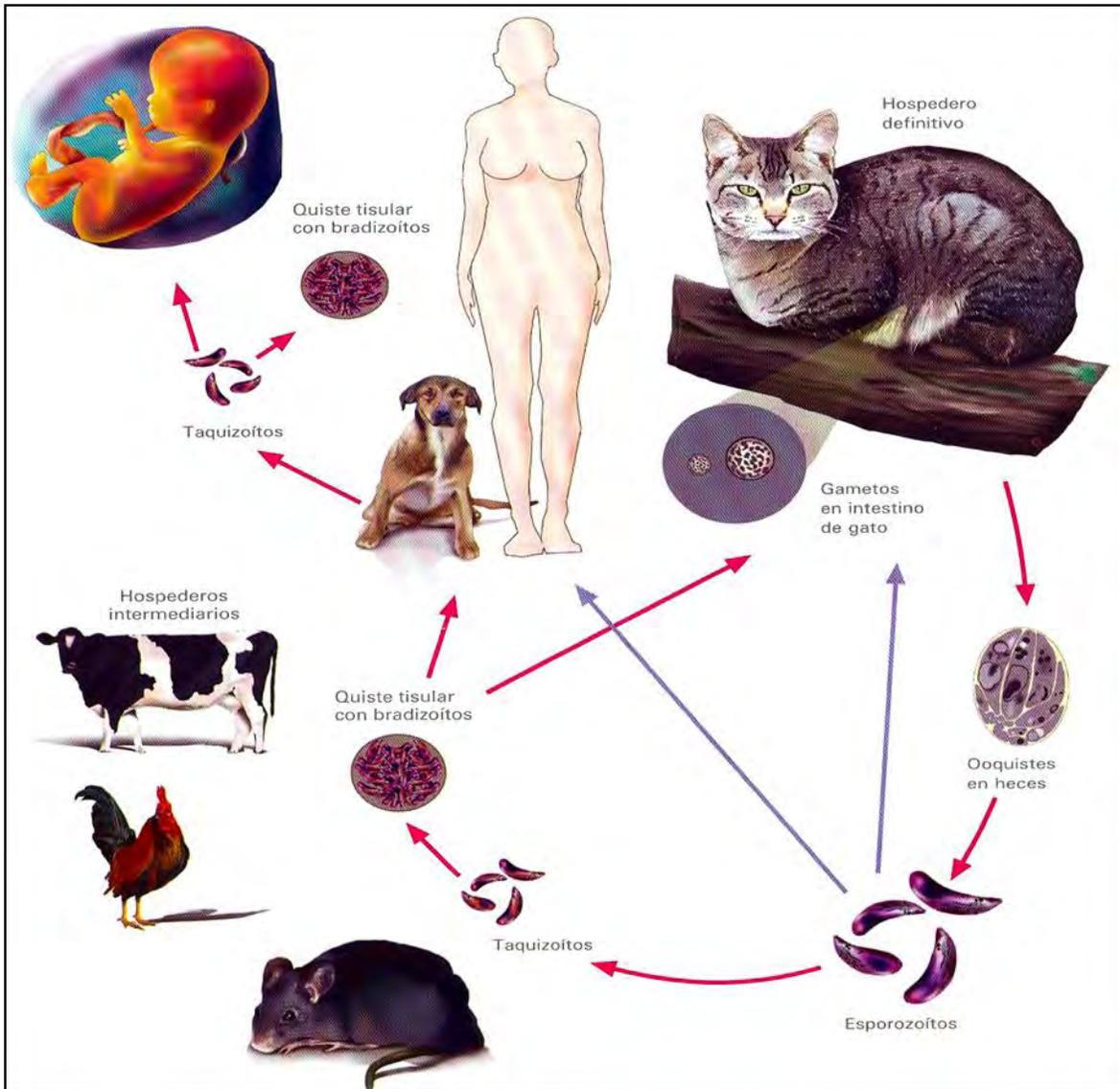


Figura 3. Ciclo biológico de *T. gondii*. Imagen adquirida de Correa *et al*, 2006.

Si el huésped es un individuo inmunocompetente, generalmente controla la replicación de los taquizoítos, eliminando a la gran mayoría de ellos; algunos, sin embargo, se transforman en bradizoítos y forman quistes, los cuales se quedan en tejidos de diversos órganos y persisten durante toda la vida del huésped. Los quistes tisulares pueden encontrarse en el sistema nervioso central, el ojo, el músculo cardíaco y el esquelético, así como en otros órganos como el hígado, el bazo, el pulmón y el riñón, sin tener alguna predilección específica por algún

órgano (Dubey, 2009; Flisser, 2006; Hill, Chirukandoth y Dubey, 2007; Lindsay, Blagburn y Dubey, 2002; Tenter, 2009).

1.5 Mecanismo de invasión celular por *T. gondii*

La invasión celular es un proceso dinámico mediado por componentes de varios organelos y de vías de señalización reguladas por calcio (Muñiz-Hernández *et al.*, 2011; Carruthers, 1999; Kafsack, Carruthers y Pineda, 2007). Inicialmente se realiza el contacto y adhesión del parásito con la célula huésped, con ayuda de algunas proteínas de superficie pertenecientes a la super familia de las SAGs (Antígenos de superficie) principalmente SAG1; estas funcionan como adhesinas e interactúan con los glicosaminoglicanos sulfatados de la célula huésped. Posteriormente se inicia la penetración de la célula huésped a través de su porción apical del parásito, para secretar proteínas de los micronemas que también tienen un papel de adhesinas, algunas de ellas se unen específicamente a moléculas como ICAM-1 (Inter-cellular adhesión molecule 1), simultáneamente se presenta la extracción del conoide. Estos dos eventos son dependientes de aumento del calcio intracelular. Las roptrias son organelos apicales que contienen proteínas conocidas como ROP (roptrias) y RON (proteínas del anillo o cuello roptrial); las roptrias RON2, 4, 5 y 8 en conjunto con la proteína de micronema llamada AMA1 (Apical membrane antigen 1) forman un complejo “unión móvil” (MJ), el cual tiene forma de anillo que le permite al parásito ingresar a la célula apretándolo desde la parte anterior hasta la posterior. De manera simultánea, las ROP son secretadas al citoplasma, algunas de ellas se mantienen en vesículas que se fusionan para ayudar a construir la vacuola parasitófora (VP), otras se mantienen de forma soluble. El parásito penetra “jalando” a las MICs transmembranales o anillo para invaginar la membrana plasmática de la célula huésped e iniciar la formación de la vacuola parasitófora donde será el espacio donde se replicará (**Figura 4**) (Lamarque *et al.*, 2011).

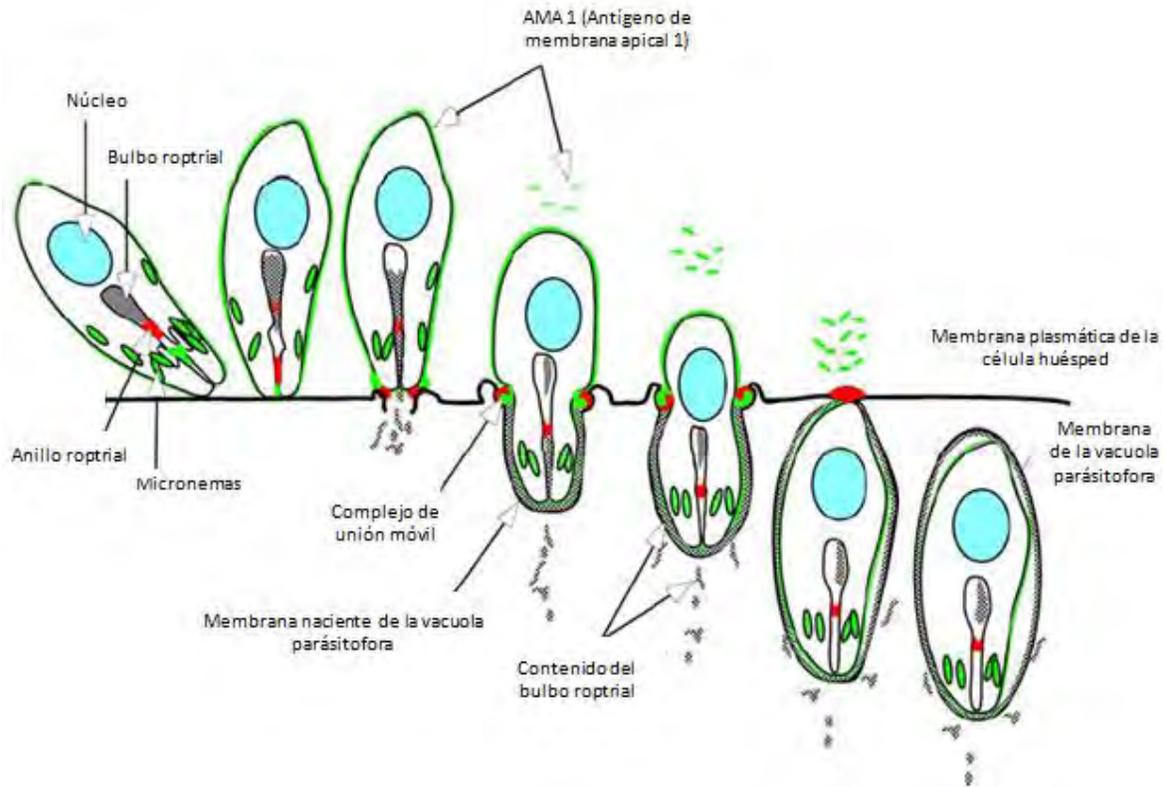


Figura 4. Esquema de la secuencia de infección de *T. gondii* en una célula huésped. Imagen adquirida y modificada de Alexander *et al*, 2005.

La construcción de la vacuola parasitofora inicia desde la invaginación de la membrana plasmática de la célula huésped usando algunos de sus componentes como los lípidos y de la secreción de las roptrias las cuales se encargan de rodear la membrana de la vacuola parasitofora (MVP) con las mitocondrias y el retículo endoplásmico, que serán usados para la nutrición del metabolismo del parásito (Gendrin *et al*, 2008; Mercier y Dubremetz, 2002). La VP constituye una barrera entre el parásito y el interior de la célula huésped por lo que le confiere protección y a su vez es una interface para la obtención de nutrientes. La VP se organiza en 3 subcompartimentos membranosos: la MPV, HOSTs, y la Red Membranosa Nanotubular (NMN) (**Figura 6**) (Alexander *et al*, 2005; Bradley *et al*, 2005; Cesbron-Delauw, 1994; Kafsack, Carruthers y Pineda, 2007; Mercier y Dubremetz, 2002; Mordue y Desai, 1999).

1.6 Antígenos de *T. gondii*

Los antígenos polimórficos relacionados a la virulencia del parásito se han utilizado para discriminar tipos de cepas de este parásito con múltiples técnicas. Aquí se describen dos clases principales de antígenos, usados en esta tesis:

1.6.1 Antígenos de superficie (SAGs)

La familia de antígenos de superficie llamada SRS (Secuencias relacionadas a SAG1) son proteínas de membrana que se encuentran en la superficie de los taquizoitos de todas las cepas genéticas. Esta super familia comprende al menos 20 proteínas homólogas y SAG1 es el miembro prototípico (Jung, Lee y Grigg, 2004). Estas moléculas juegan un papel importante en la adhesión a la célula huésped y su invasión al participar en el reconocimiento inicial de la célula blanco (Grimwood y Smith, 1992; Jung, Lee y Grigg, 2004; Mineo *et al*, 1993; Robinson, Smith y Millner, 2004). Están involucradas en la conversión de taquizoito a bradizoito, ya que se ha observado expresión diferencial entre ambos estadios (Kim, Fouts y Boothroyd, 2007).

1.6.1.1 Antígeno de superficie 1 (SAG1)

SAG1 codifica para uno de los antígenos de superficie más abundantes en los taquizoitos también llamado proteína P30, por el peso de su monómero de 30 kDa; es altamente inmunogénica y es uno de los antígenos más usados en el diagnóstico y en la elaboración de vacunas contra la infección por *T. gondii*. La proteína está codificada por un gen unicopia, sin intrones, cuyo mRNA mide 1500 nucleótidos, que representa aproximadamente el 0.1% del mRNA total del parásito en la fase de taquizoito. Hasta el momento SAG1 es la única proteína de *T. gondii* de la que se tiene la estructura cristalizada. Se presenta en forma de homo-dímero, con dos dominios, D1 en la porción N-terminal de 130 aminoácidos y D2 en el extremo C-terminal de 120 aminoácidos; adoptan la forma característica de

plegamiento de las proteínas SRS, insertándose en la membrana del parásito a través de un anclaje de tipo Glucosilfosfatidilinositol (GPI) fosfatidilglicositol, con dos hojas beta plegadas que se empaquetan juntas y asas unidas por puentes disulfuro. En el homodímero la interacción D1-D1 se produce principalmente a través de las interacciones de hojas β antiparalelas entre hojas α (Graille *et al*, 2005). Con el conocimiento de su estructura se ha logrado observar su interacción con los anticuerpos e identificar epítomos específicos (**Figura 5**).

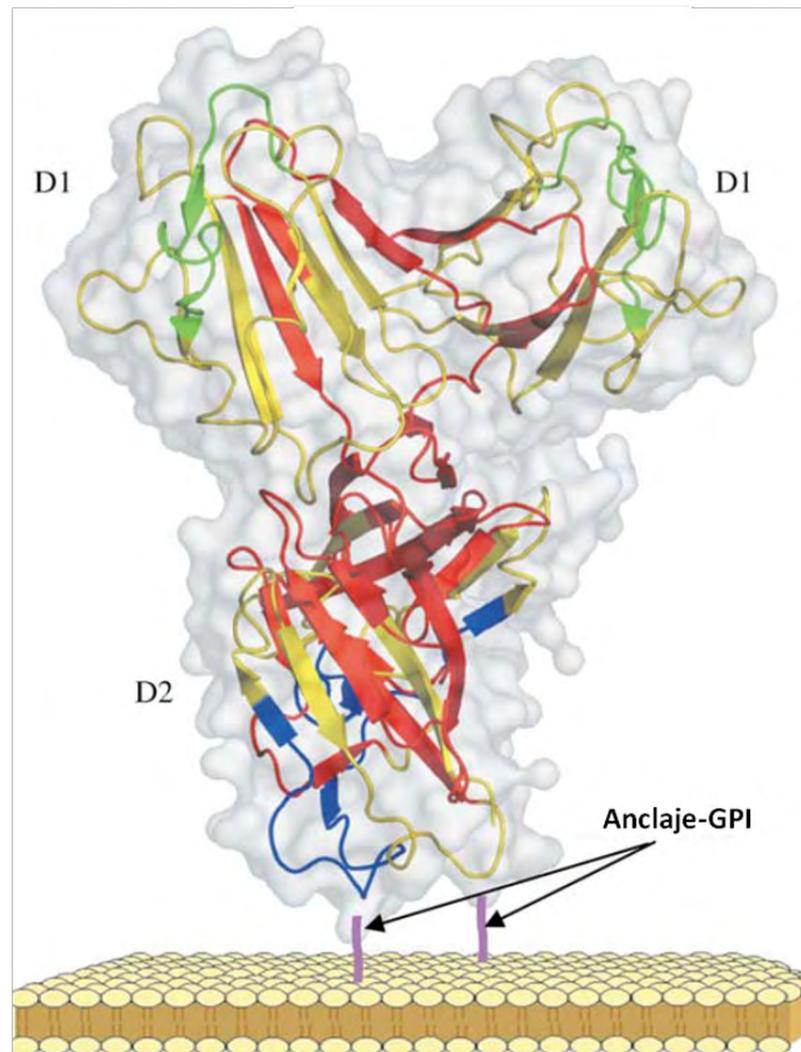


Figura 5. Estructura tridimensional de SAG1 de *T.gondii*. El homodímero de SAG1 se representa con las cintas amarillas, los péptidos para epítomos B representados en cintas verdes rojas y azules que son regiones de la molécula de SAG1 dirigidas hacia la membrana del parásito. Imagen adquirida y modificada de Graille *et al*, 2005.

1.6.2 Proteínas de gránulos densos (GRAs)

Las proteínas de los gránulos densos de se encuentran en todos los estadios de *T. gondii* han sido descritas como moléculas altamente inmunogénicas que participan en la respuesta humoral y celular. Los gránulos densos son organelos secretores presentes en todos los estadios del parásito (Lecordier, 1995; Tilley *et al*, 1997). Miden aproximadamente 200 nm de diámetro, están rodeados por una membrana única y pueden encontrarse de forma soluble y transmembranal. Sin embargo, sólo son secretadas como proteínas solubles durante y después de la invasión de manera constitutiva por las concentraciones de Ca en el interior de la VP. Una vez secretadas pueden permanecer solubles en el lumen de la vacuola o asociarse a la MPV como en el caso de GRA3 , GRA5 , GRA7 , GRA8 o a la red tubulorreticular de la MPV como GRA2 , GRA4 , GRA6 , GRA9 , GRA12 (Adjogble *et al*, 2004; Braun *et al*, 2008; Mercier *et al*, 2005; Michelin *et al*, 2009). Estas proteínas tienen gran importancia en la supervivencia intracelular y la replicación de *T. gondii* por su papel en la modificación y maduración de la VP y la adquisición de nutrientes de la célula huésped (Carey, Donahue y Ward, 2000; Coppens, Andries y Liu, 1999). El tamaño de las proteínas que pertenecen a esta familia varía entre 21 y 49 kDa. Generalmente en la región N-terminal poseen una secuencia hidrofóbica con características de péptido señal de 19 a 27 aminoácidos. Hasta el momento se conocen 23 proteínas de gránulos densos (GRA1 - GRA10 , GRA12- GRA23), 2 isoformas de hidrolasa nucleótido trifosfato (NTPase I y II) y 2 inhibidores de proteasas (TgPI 1 y 2) (Ahn *et al*, 2006; Michelin *et al*, 2009; Rome *et al*, 2008).

1.6.2.1 Proteína de gránulo denso 6 (GRA6)

El grupo de Lecordier en 1995, describieron por primera vez un antígeno de gránulos densos de 32 kDa, que fue nombrado GRA6.

GRA6 es un gen unicopia, no contiene intrones y se localiza en el cromosoma X (Khan *et al*, 2005; Lecordier, 1995). Tiene un cDNA de 1600 pb que codifica para

un producto de 230 aminoácidos, el cual contiene dos regiones hidrófobas con las características de dominios transmembranales. El primer dominio hidrofóbico se encuentra en el extremo N-terminal y carece de péptido señal. El segundo dominio se encuentra ubicado en la parte central y está flanqueado por dos dominios hidrófilos. GRA6 se encarga de dar soporte a la red intravacuolar a la red dentro del espacio vacuolar estabilizando los túbulos que la forman (Fazaeli *et al*, 2000; Lecordier, 1995; Mercier y Dubremetz, 2002). Forma un complejo con GRA2 para permanecer asociada a las membranas de la red, y posteriormente se une GRA4 (Labruyere *et al*, 1999).

La región codificante para GRA6 ya ha sido descrita como altamente polimórfica y se han determinado nueve diferentes alelos por secuenciación de 30 cepas, además de su utilidad en PCR-RFLP para discriminar los tres linajes clonales (Belfort-Neto *et al*, 2007; Khan *et al*, 2005, 2006; Miller *et al*, 2004; Petersen *et al*, 2006; Zakimi *et al*, 2006). Otros alelos diferentes ya han sido identificados en dos genotipos X y A de nutrias marinas de California (Conrad *et al*, 2005; Dubey *et al*, 2007; Miller *et al*, 2004).

Los péptidos de la región C-terminal de GRA6 han sido utilizados para diferenciar cepas tipo II de tipo I y III (Kong *et al*, 2003; Peyron *et al*, 2006).

1.6.2.2 Proteína de gránulo denso 7 (GRA7)

GRA7 es una proteína que pesa 29 kDa, por lo que también se denomina P29. Está codificada por un gen unicopia que se ubica en el cromosoma VIIa. En el extremo N-terminal presenta una región característica de péptido señal de 26 aminoácidos para su localización en membrana. Esta proteína contiene dos dominios hidrofóbicos, uno de 15 aminoácidos y otro de 29 y un sitio potencial de glicosilación cerca del extremo C-terminal (Jacobs *et al*, 1998).

Esta proteína se asocia con el complejo de membrana del parásito, con los túbulos de la red intravacuolar y con la MPV. Migra de los gránulos densos a la MPV a través de la red intravacuolar durante la invasión de las células huésped. GRA7 secuestra endolisosomas de origen celular dentro de la VP (Achbarou *et al*, 1991;

Bonhomme *et al*, 1998; Coppens *et al*, 2006; Lecordier, 1995; Ossorio, Dubremetz y Joiner, 1994).

Invasión de la célula huésped:
secreción de micronemas,
roptrias y gránulos densos

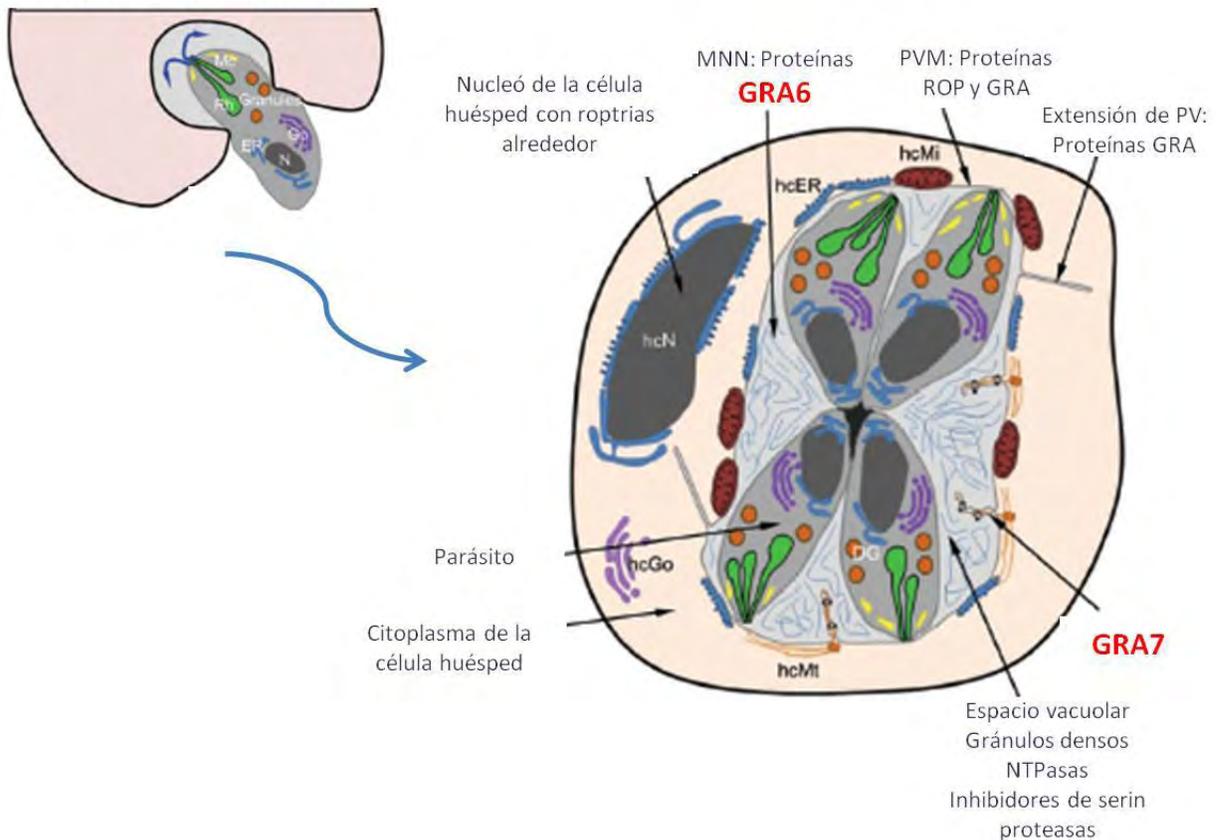


Figura 6. Esquema representativo de la formación de la vacuola parasitofora de *T. gondii*. Se pone en evidencia la participación de algunas proteínas de virulencia y sus componentes estructurales dentro de la vacuola parasitofora. Imagen adquirida y modificada de (Cesbron-Delauw *et al*, 2008).

1.7 Respuesta inmune contra *T. gondii*

La respuesta inmune de los huéspedes es uno de los factores críticos en el desarrollo de esta parasitosis, al presentar una respuesta inmune eficiente, se logra controlar la replicación de taquizoitos (infección aguda), si esto no fuera posible se pueden generar múltiples signos clínicos y lesiones de leves a graves, inclusive llegar a la muerte. Cuando el individuo logra superar la fase aguda, y posee un

sistema inmune competente, el parásito queda en fase crónica, es decir como bradizoito enquistado en algún tejido del organismo sin provocar la destrucción del mismo. La activación de la respuesta inmune es en gran parte responsable de la conversión del parásito en estadio de taquizoito a bradizoito y viceversa. Se ha sugerido que los parásitos mantienen activa la respuesta inmune a lo largo de la vida del individuo infectado, ya que pueden desenquistarse y emerger nuevos taquizoitos re-estimulando el sistema inmune, estos tipos de situaciones son comunes en pacientes con enfermedades inmunosupresoras como VIH, leucemia entre otras o en manejo clínico de trasplantes de órganos (Denkers y Gazzinelli, 1998).

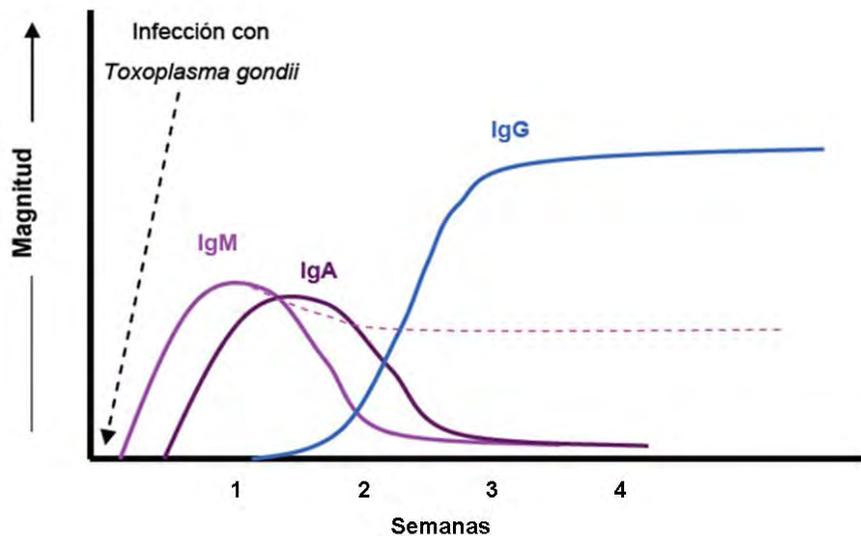


Figura 7. Cinética de la respuesta inmune humoral a la primo infección de *T. gondii*. Imagen adquirida y modificada de Flisser, 2006.

Posterior a la infección por vía oral, inicia la fase aguda, donde los taquizoitos invaden prácticamente cualquier célula nucleada, desencadenando los primeros mecanismos de la respuesta inmune innata, la cual es mediada principalmente por neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y células dendríticas; las primeras realizando procesos de fagocitosis, y las NK de lisis. Todas estas células están involucradas en la producción de interleucina 12 (IL-12), que es una de las principales citocinas que juegan un papel crítico en la defensa del organismo en

contra de la infección y replicación de los taquizoitos de *T. gondii*; su síntesis también se encuentra relacionada con el reconocimiento de PAMs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) del parásito por receptores como los TLRs. Se han descrito que los TLRs 4, 9 y 11, son los que interactúan con *T. gondii*, y a su vez este tipo de mecanismo estimula la producción de INF γ , que es la citocina principal en la coordinación de otras citocinas para la respuesta a la infección de este parásito. Las células NK son las principales productoras de IFN γ , reforzando la respuesta TH1, para estimular con mayor potencia a los macrófagos y neutrófilos para fagocitar (Ortíz-Alegria *et al*, 2010; Correa *et al*, 2007).

Las células profesionales presentadoras de antígeno (CPAs) como los macrófagos y células dendríticas, presentan antígenos del parásito por medio de dos vías a través de Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), si son presentados por medio del MHC clase I son reconocidos por linfocitos T CD8+ (citotóxicos), los cuales van a proliferar y eliminarán células infectadas por medio de apoptosis o lisis. Si se presentan por medio de MHC clase II, interactúan con linfocitos T CD4+, estos desarrollan una respuesta TH1, para aumentar el control de la replicación del taquizoito. El microambiente de las citocinas que involucran la respuesta TH2, en la fase aguda inhibe la síntesis de IFN γ , la IL-4 y 10 aparecen para modular la respuesta TH1 de la intensa inflamación. Algunos linfocitos T CD4 liberan IL-2 que activa a los linfocitos B con receptores específicos y éstos se diferencian a células plasmáticas, para producir anticuerpos séricos dirigidos contra antígenos del parásito, anticuerpos de clases opsonizantes, como la IgG₁ e IgG₃ en humanos y la IgG₂ e IgG₄ en ratones, los cuales atacan a los taquizoitos por la vía clásica del complemento. La producción de IgM aparece de 3 a 10 días después de la infección y puede persistir en la fase crónica. Los anticuerpos IgA juegan un rol protector por neutralización e inhibición de la invasión por el parásito a la célula, esta inmunoglobulina se presenta poco después de la IgM, persistiendo durante dos meses aproximadamente, aunque puede variar en pacientes adultos y recién nacidos con infección congénita. Las IgGs aparecen entre dos a tres semanas después de la primo infección, alcanzando sus niveles máximos a los dos meses y pueden permanecer con títulos basales de por vida, ya que una vez adquirida la

infección no se elimina del organismo (**Figura 7**) (Abbas y Lichtman, 2005; Tizard 2012).

1.8 Epidemiología, patogenia y algunos aspectos clínicos

Los estudios epidemiológicos de *T. gondii* se dividen en dos rubros: los que buscan conocer la seroprevalencia del parásito y los que desean conocer la variabilidad genética del parásito, actualmente se intenta asociar ambas áreas para conocer la influencia de la genética en la presentación fenotípica de la infección o de la enfermedad. La realización de este tipo de estudios es compleja y muy diversa, por factores como: las condiciones climáticas de las diferentes áreas geográficas, culturales, alimentación, especies afectadas, interrelación de la población humana y animal doméstica o silvestre, medidas sanitarias y los programas de salud que se manejen en el sitio.

La patogenia de la toxoplasmosis dependerá de una serie de factores del huésped como la susceptibilidad de la especie infectada a desarrollar la enfermedad, el estado y la respuesta del sistema inmune, edad, dieta y otros del parásito como el estadio, la dosis y el tipo cepa, así como la vía de infección.

Los huéspedes definitivos e intermediarios pueden infectarse mediante cuatro rutas principales: 1) Oral-fecal, a través de las heces de gatos primo-infectados que contaminan el suelo, depósitos de agua para consumo humano, ríos, mares, pastos, forrajes, jardines, cultivos de frutas y vegetales con ooquistes que pueden posteriormente esporular y volverse infectivos; 2) Oral, por consumo de carne cruda o mal cocida contaminada con quistes tisulares; 3) Mediante trasplantes de órganos; y 4) Trasplacentaria (Dubey, 1998, 2009; Frenkel, 1988; Hill y Dubey, 2002) . Los datos epidemiológicos indican que la exposición a los ooquistes (suelo contaminado o el agua) y la carne poco cocida son los principales factores de riesgo para la infección humana denominada “adquirida”, pero como se mencionó anteriormente se puede transmitir verticalmente (infección congénita) Además se ha descrito la transmisión del parásito por consumo de leche cruda de borrega,

cabra y vaca contaminada con taquizoitos (Camossi *et al*, 2011; Schieffer *et al*, 2003).

La toxoplasmosis clínica se presenta principalmente durante la fase aguda por la consecuente destrucción celular y la necrosis que provoca en los tejidos. No hay signos clínicos o lesiones patognomónicas, sin embargo se ha reportado que se puede presentar fiebre, linfadenomegalia retrofaringea, retinitis, neumonía, hepatitis, encefalitis e inclusive muerte (Jones *et al*, 2006). En la mayoría de casos, las infecciones crónicas permanecen clínicamente inaparentes de por vida. Sin embargo, varios estudios han encontrado una asociación entre la seropositividad y la enfermedad psiquiátrica atípica en los seres humanos (Torrey y Yolken, 2007).

La toxoplasmosis en humanos ha sido muy estudiada por el gran impacto que tiene en las mujeres gestantes: la infección primaria durante el embarazo representa un alto riesgo de transmisión congénita. Si, ésta sucede durante el primer trimestre de la gestación, la transmisión al feto se presenta entre el 10 y 25% de los casos, provocando aborto espontáneo y muerte fetal en alta frecuencia. En el segundo trimestre de la gestación, el porcentaje de infección aumenta a 30-50%, produciendo lesiones severas como hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, hepatomegalia, ictericia y epilepsia. En el último tercio de la gestación, el riesgo de transmisión vertical es mayor al 60%; sin embargo, los fetos infectados generalmente nacen asintomáticos (Dunn *et al*, 1999).

T. gondii también causa trastornos reproductivos en los animales: reabsorción o muerte embrionaria temprana, momificación, muerte fetal, aborto o nacimientos de crías débiles (Arantes *et al*, 2009). Este tipo de patologías han sido reportadas principalmente en pequeños rumiantes, por lo que tiene un fuerte impacto económico. Se ha visto la asociación de cuadros clínicos de toxoplasmosis con enfermedades virales inmunosupresoras como peritonitis infecciosa felina, leucemia viral felina, inmunodeficiencia felina, moquillo canino (Swinger, Schmidt, y Dubielzig, 2009; Webb *et al*, 2005).

1.9 Generalidades genéticas de *T. gondii*

Originalmente, se había descrito que este protozoo tenía una estructura genética clonal o “clásica” compuesta por tres genotipos (I, II y III), de acuerdo a lo encontrado en estudios de Europa y Estados Unidos de América del Norte en seres humanos, animales domésticos y algunos silvestres (**Figura 8**). Esta clasificación inicialmente se basó en las características biológicas de virulencia y patogenicidad observadas en los modelos de ratón y en cultivo celular al ser infectados experimentalmente con el parásito. Las cepas tipo I son las más virulentas en ratones y presentan una alta tasa de multiplicación y una reducida interconversión de taquizoito a bradizoito *in vitro*. Las tipo II son endémicas en la mayoría de los animales, no son virulentas en ratones, y se presentan en infecciones crónicas con persistencia de quistes tisulares, *in vitro* poseen bajo rango de multiplicación y se facilita la interconversión de taquizoito a bradizoito y la formación de quistes. Las cepas tipo III habían sido aisladas principalmente de especies silvestres y de cuadros inusuales en humanos, siendo poco virulentas para el ratón (Ajzenberg *et al*, 2004). Posteriormente, esta clasificación fue respaldada por estudios de carácter genético, el primer estudio de diversidad genética se basó en seis sistemas enzimáticos polimórficos (MLEE) (aspartato aminotransferasa, glutatión reductasa, amilasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfatasa ácida y propionil esterasa) agrupando los linajes por zimodemos. En una colección de 83 aislamientos de *T. gondii* se encontraron de dos a tres isoformas de las enzimas, lo que permitió la descripción de 12 zimodemos dentro de este estudio, la mayoría de poblaciones se agrupaban en tres zimodemos principales Z1, Z2 y Z3, esta información coincidió con la clasificación anterior, otorgando el resultado de que los genotipos clásicos presentaban diferencias fenotípicas y genotípicas. No obstante, posteriormente se determinaron las diferencias genéticas de manera más puntual, mediante PCR-RFLP (Howe y Sibley, 1995, 1997).

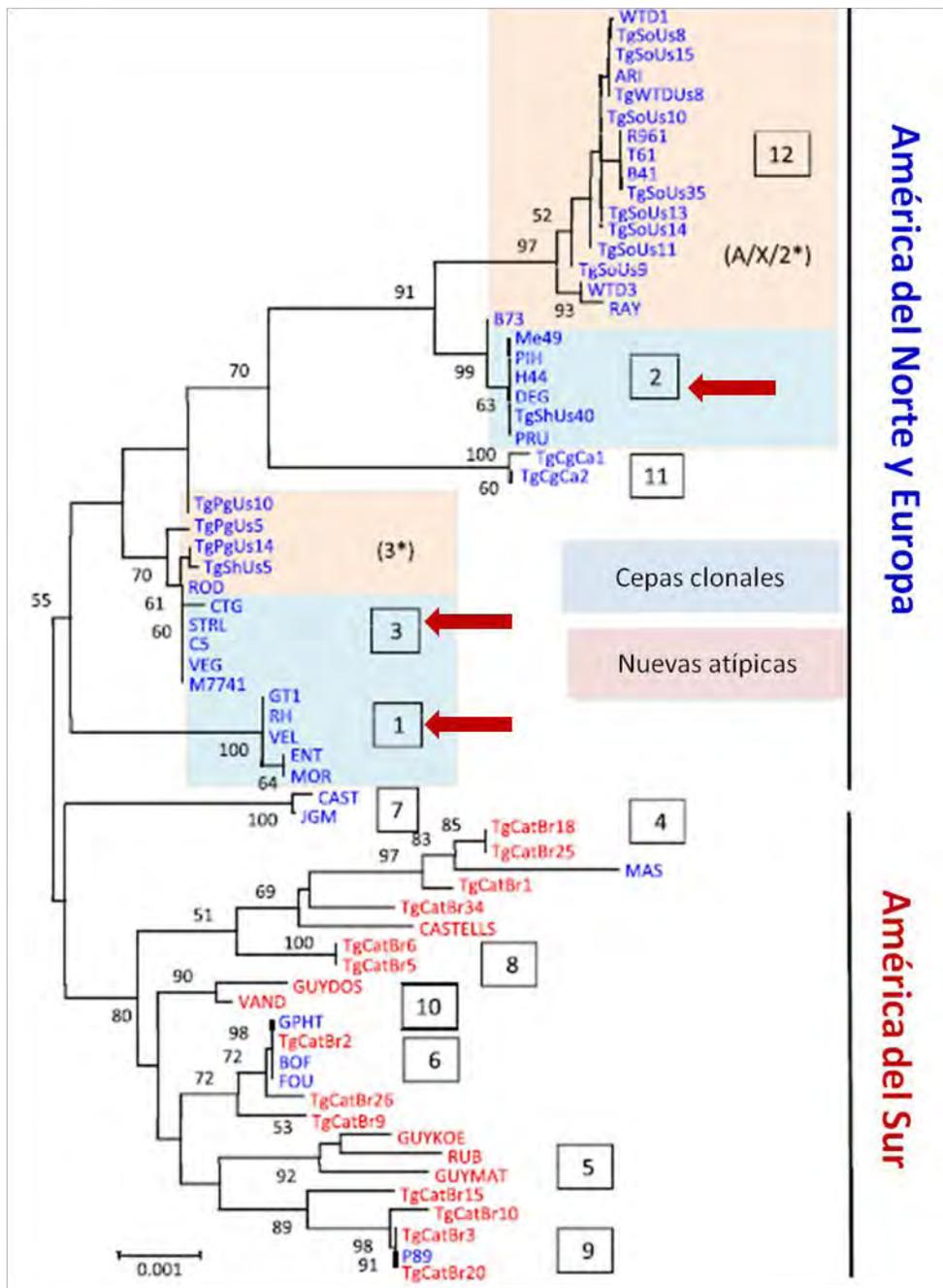


Figura 8. Análisis filogenético de 66 cepas de *T.gondii*. Se observa evidente separación entre las cepas de Europa y América del Norte (letras en azul) con relación a las de América del Sur (letras en rojo). Las cepas incluidas en este análisis provienen de seres humanos, animales domésticos y silvestres, se clasificaron en 12 haplogrupos, de los cuales el 1, 2, 3, 11 y 12 son comunes para América del Norte y Europa, mientras que el 4, 5, 6, 8, 9 y 10 lo son para América del Sur. Se indica con flechas rojas los tres genotipos clásicos o clonales. Imagen adquirida y modificada de Khan *et al*, 2011.

Con la apertura del conocimiento del genoma de *T. gondii*, se ofreció la pauta para evidenciar que el ancestro en común de estos tres genotipos es el tipo II, el cual dio lugar a un patrón de diversidad bialélica entre los tres linajes. Sin embargo, en los recientes análisis de SNP con 5 loci de 950 aislamientos de diferentes regiones y especies del mundo, se encuentran los tres genotipos clásicos dentro de los 15 haplogrupos, así mismo agrupados en 6 clados (A, B, C, D, E y F), esta es la representación actual de la variabilidad genética de este protozoario; no obstante algunos genotipos de América del Sur no han sido clasificados por presentar gran divergencia (**Figura 9**). Se estima que la diversidad existente entre los linajes es aproximadamente del 1 al 3%, y tan solo del 0.01% entre los genotipos clásicos (Khan, Dubey y Su, 2011).

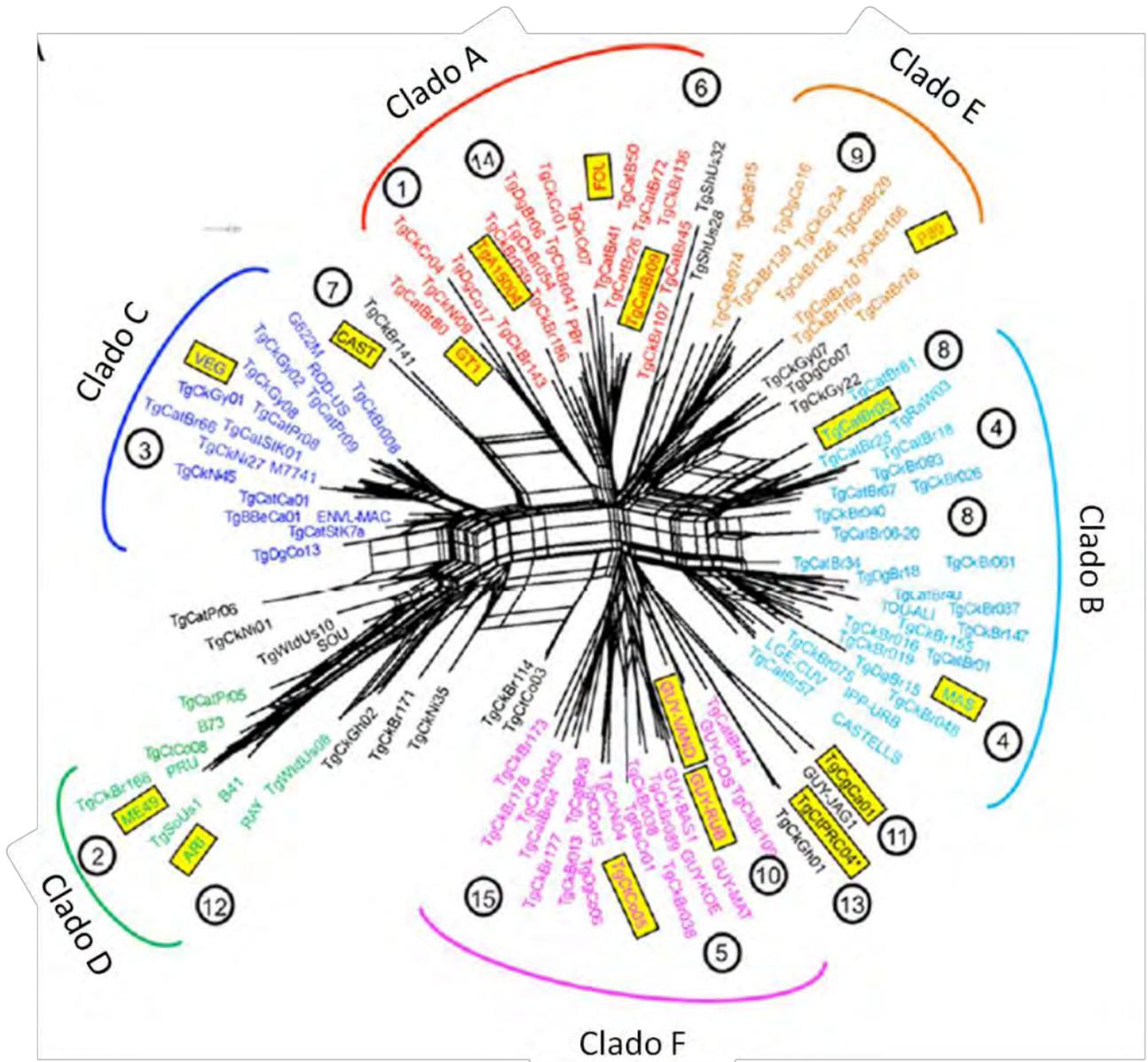


Figura 9. Análisis filogenético de 956 cepas de *T. gondii*. Árbol filogenético de análisis de vecinos (neighbor join), identificando en colores los 6 clados que representan la estructura del análisis genético; los números en círculos indican los haplogrupos y en recuadros se encuentran las cepas representativas de cada haplogrupo. Las líneas muestran el flujo de genes entre cepas. Imagen adquirida y modificada (Khan *et al*, 2011).

T. gondii cuenta con tres genomas: nuclear, mitocondrial y apicoplasto. El genoma nuclear es el más estudiado, gracias a los estudios del grupo de Khan en el 2005, se logro emitir un mapa genómico compuesto por 14 cromosomas, denominados Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, V, IX, X, XI y XII, y que en conjunto tienen un tamaño físico de 61 645 498 pb. El genoma mitocondrial no ha sido bien estudiado aunque se sabe que es muy semejante al de *Plasmodium* y que cuenta con repeticiones en *tándem*. El genoma del apicoplasto mide 35 Kb y es circular (Maréchal y Cesbron-Delauw, 2001) .

1.10 Epidemiología de *T. gondii* en México

En nuestro país la mayor parte de información de *T. gondii* se encuentra enfocada a la seroprevalencia principalmente en humanos y escasos estudios en animales, mediante diferentes técnicas inmunológicas como: inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA, MAT, Western-Blot, etc. De acuerdo a la técnica la sensibilidad y la especificidad son diferentes y podría influir en el momento de comparar frecuencias o prevalencias. Dado que se tiene mayor información en la población humana, se comentaran algunos datos relevantes respecto a su la prevalencia reportada. Algunos reportes mencionan que este protozooario se encuentra en toda la republica mexicana pero con mayor frecuencia en las zonas con clima cálido-húmedo, lo cual corresponde a la particularidad, de que son las mejores condiciones para que esporulen los ooquistes y sean infectivos, permaneciendo por mayor tiempo en el ambiente.

Roch y Varela en 1966, mediante la técnica de Sabin y Feldman evaluaron 14,869 sueros de humanos que fueron recopilados entre los años de 1953 al 1965, y determinaron 30% de positividad (Roch y Varela, 1966).

En 1976 el Instituto Mexicano del Seguro Social llevó a cabo una encuesta seroepidemiológica nacional en 51 localidades urbanas de México, utilizando inmunofluorescencia indirecta, describiendo seropositividad del 26 %, siendo más elevada en zonas costeras de ambos litorales del país (Velasco *et al*, 1992).

En 1987, durante la Encuesta Nacional Seroepidemiológica por medio de inmunofluorescencia indirecta se encontró del 19% al 30% de seroprevalencia en población abierta, a partir de un año a 98 años de edad (Velasco-Castrejón *et al*, 1992), en comparación con estos valores, recientemente en la encuesta realizada en el 2000 y 2006, se determinó por medio de ELISA indirecto que la seroprevalencia aumentó al menos en un 8%, este aumento se asoció al cambio climático (Caballero-Ortega *et al*, 2012) (**Figura 10**).

Quintal y Navarrete (1975) emplearon la técnica de hemaglutinación indirecta en Yucatán, y se detectó el 11.48%. En un estudio realizado en el estado de Jalisco, en mujeres embarazadas para la detección de anticuerpos contra *T. gondii*, la seroprevalencia para IgM fue del 20.7% y para IgG del 34.9%, y en un grupo de mujeres con antecedente de aborto, se detectó el 44.9% de anticuerpos IgG y el 33% de IgM (Ortiz-Alegría *et al*, 2004).

En relación a la toxoplasmosis congénita, sólo hay un estudio de 2005 en el que se reportaron dos casos entre 1000 recién nacidos vivos del valle de México, frecuencia muy alta en comparación con otras regiones del mundo, se usó un ELISA de captura (Vela-Amieva *et al*, 2005).

Cañedo-Solares *et al*, (2008) determinaron que las subclases IgG1 e IgG3 en madres se encuentran asociadas a transmisión vertical y la IgG2 en neonatos se encuentra en mayor proporción en los pacientes con lesiones clínicas.

En una revisión de reportes publicados en diferentes bases de datos desde el año de 1951 hasta el 2012, se encontró un total de 132 estudios reportados en 41 publicaciones que incluían 70,123 personas y 19,213 casos positivos, y con estos datos se realizó un meta-análisis que sugiere que el promedio de la media de prevalencia fue de 27.97%, y la prevalencia de medias ponderada fue de 19.27%. Con los resultados de este análisis se mostró una tendencia a la baja de 0.1% por año de la toxoplasmosis en un período de 70 años y esto representa una reducción en la prevalencia de 5.8%, aunque estos datos son contradictorios con lo mencionado en el trabajo de Caballero-Ortega *et al*, (2012).

Las comparaciones entre diferentes grupos de riesgos mostraron que la prevalencia ponderada fue mayor en las mujeres con abortos involuntarios

(36.03%), en pacientes inmunocomprometidos (28.54%), en los pacientes con alguna enfermedad mental (38.52%) y en otros grupos de riesgo (35.13%).

La prevalencia ponderada de 4,833 recién nacidos asintomáticos fue de 0.616% mientras que de 895 recién nacidos sintomáticos fue de 3.02% (Galvan-Ramirez *et al*, 2012).

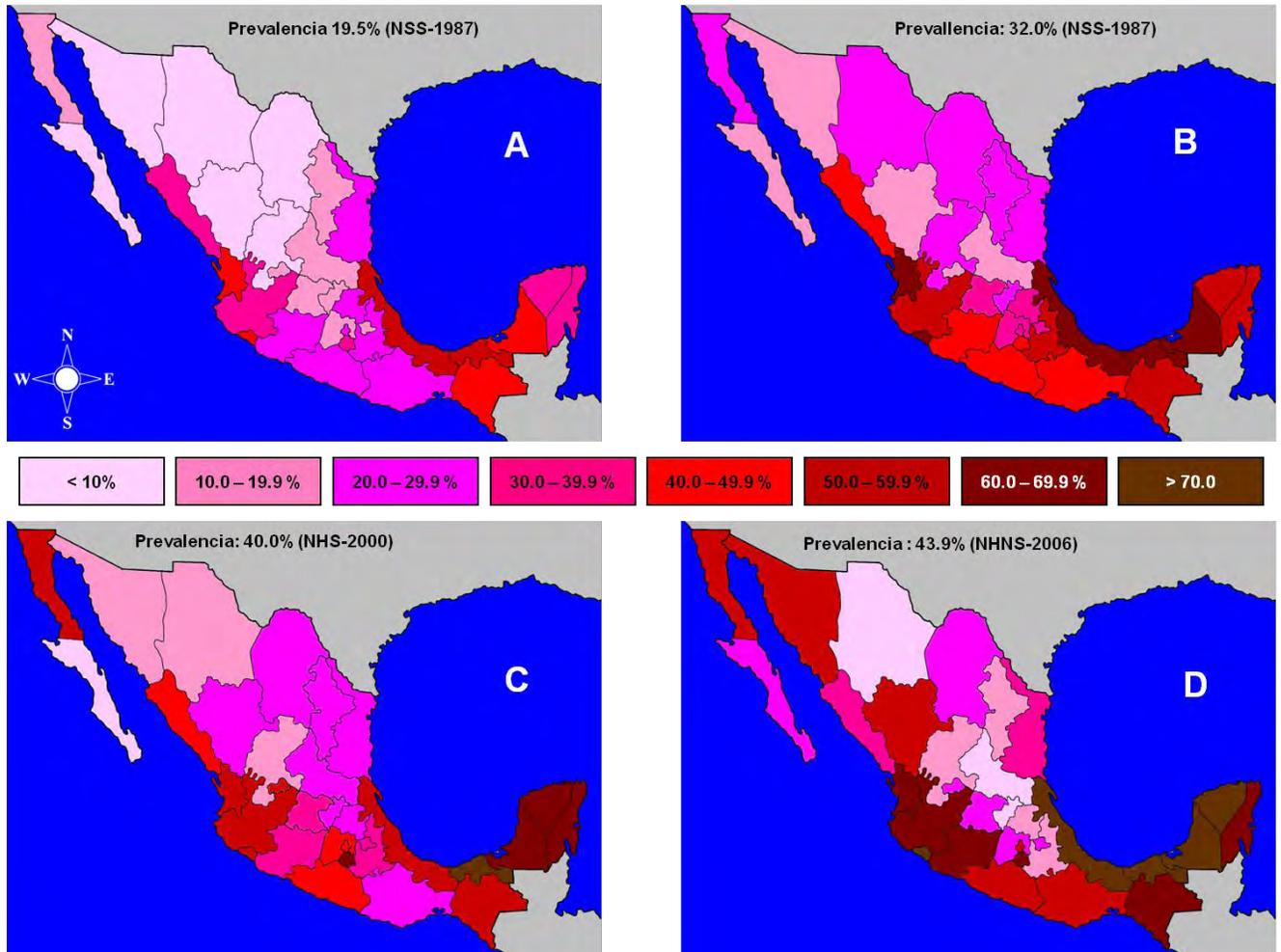


Figura 10. Mapa de seroprevalencia en población mexicana. Mapa de México, donde se muestran los rangos de prevalencia por estado de anticuerpos anti-*T. gondii*, en la Encuesta Nacional Seroepidemiologica de 1987 (NSS-1987, utilizando dos diluciones de suero 1:128 y 1:16 mediante IFAT), la Encuesta Nacional de Salud del 2000 (ENSA 2000) y de la Encuesta del Sistema Nacional de Salud y Nutrición (NHNS-200). En estos últimos estudios, los valores de prevalencia se ajustaron teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad para el ELISA. Los rangos de prevalencia están indicados por las diferentes tonalidades de colores. Imagen adquirida y modificada de Caballero-Ortega *et al*, 2012.

T. gondii se encuentra en prácticamente todas las especies que han sido estudiadas en nuestro país, en los estados del norte principalmente en Durango y Michoacán, se han realizado estudios de seroprevalencia con la prueba de aglutinación modificada (MAT), en algunos animales domésticos de consumo humano como en pollos con un 6.9% (36 casos positivos/ de 519); en conejos con 16.3% (70/429); en cabras con 15.2% (52/341); borregos con 23.1% (99/429); en caballos con 6.1% (30/495) (Alvarado-Esquivel *et al*, 2011 y 2012).

Usando como herramienta al ELISA, se han reportado trabajos de seroprevalencia en gatos domésticos del DF, con 21.8% (37/169) y de Colima 28.8 % (8/80), en conejos del DF, con 26.9% (83/311), en borregos del estado de Puebla con 29.1% (102/351) y Colima 77-84% (79-86/103), 5.8 % (25/432) en venados cola Blanca del noroeste de México (Besne-Merida *et al*, 2008; Caballero-Ortega *et al*, 2008a; Caballero-Ortega *et al*, 2008b).

En animales silvestres la seroprevalencia se ha encontrado entre el 50% y el 100%. En un estudio de 75 mamíferos marinos en cautiverio (delfines de diversas especies, leones marinos de California, manatís antillanos y lobos marinos de la Patagonia), se obtuvieron prevalencias de 50 al 100%. En 167 mamíferos de diferentes especies pertenecientes a tres zoológicos de la Cd. de México, mediante MAT se encontró una prevalencia general de 53.3% (89 casos positivos), algunas de las especies contempladas para este estudio fueron felinos y primates de nuevo mundo (Alvarado-Esquivel *et al*, 2011 y 2012).

Aunque de forma puntual con esta información se pretende dar a conocer algunos estudios de prevalencia en México en diversas especies, haciendo reiteración que son pocos los estados y especies donde se han realizado. En cuanto a reportes relacionados con la diversidad genética de *T. gondii* existe escasa información, algunos de ellos se comentan a continuación: En gallinas del Distrito Federal donde se logró el aislamiento y genotipificación de seis cepas, cinco tipo III y una tipo I (Dubey, Morales y Lehmann, 2004), en Durango se estudiaron perros, gatos, ratas, ratones, ardillas, zarigüeyas y ardillas, y se encontraron 5 genotipos, 1 (III), 3 (recombinantes) y 1 (atípico) sólo en perros y gatos (Dubey *et al*, 2009). En otro

trabajo en este mismo estado, pero analizando muestras de aves de diferentes especies, se logró describir un genotipo atípico en una paloma (Alvarado-Esquivel *et al*, 2011). Por otro lado, en monos ardilla probablemente infectados cerca de o en el DF se demostró el genotipo I, que ocasionó un cuadro agudo y mortal (Cedillo-Peláez *et al*, 2011). Asimismo, en un trabajo de diagnóstico molecular en seres humanos de binomios madre/recién nacido del valle de México e Hidalgo, los genotipos encontrados fueron tipo I o relacionados a éste, pero con bandas atípicas (Rico-Torres *et al*, 2012). Alvarado-Esquivel *et al*, 2013 obtuvo un aislamiento atípico en un ratón inoculado con el corazón de un puma positivo serológicamente con MAT proveniente de Durango (**Figura 11**).

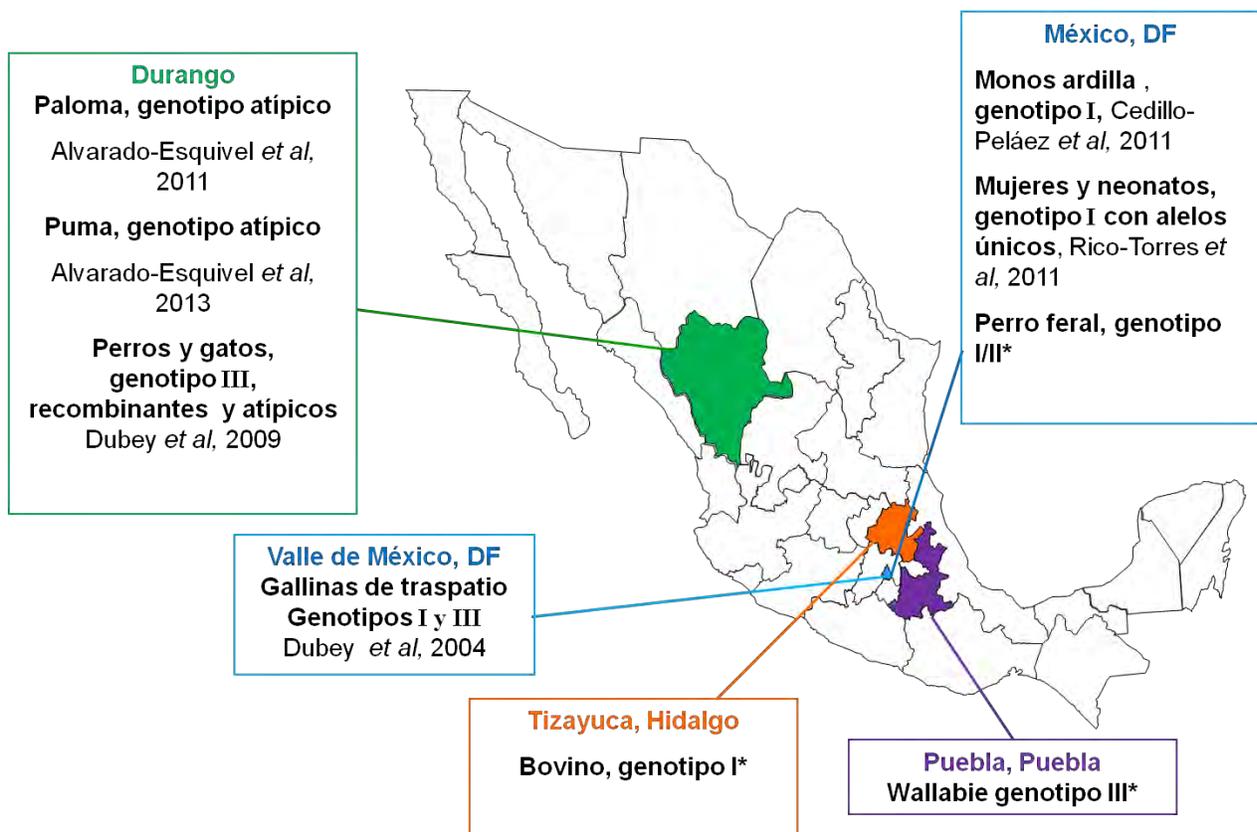


Figura 11. Mapa de estudios de genética de *T. gondii* en México. Imagen realizada por el grupo del Laboratorio de Inmunología Experimental del INP. * indica resultados aún no publicados.

1.11 Diagnóstico de la toxoplasmosis

El problema de diagnóstico es uno de los aspectos más importantes y desafortunadamente menos comprendidos de la toxoplasmosis. Esto se debe a que un resultado específico puede tener un significado clínico distinto dependiendo del tipo de caso que se esté estudiando y el propósito del análisis.

El diagnóstico de la infección por *T. gondii* se puede realizar mediante técnicas directas e indirectas, en las cuales se emplean diferentes muestras biológicas. El diagnóstico directo se basa en la observación del parásito o en la obtención de su DNA. Las técnicas indirectas se basan principalmente en la detección de los anticuerpos dirigidos contra el parásito (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Técnicas de diagnóstico para toxoplasmosis

Método	Diagnóstico	Técnica	Detección
DIRECTOS	Microscópico	Coproparasitoscópico Tinción:	Ooquistes, taquizoítos y quistes tisulares con bradizoítos
		<ul style="list-style-type: none"> • Giemsa • Hematoxilina y eosina 	
	-----	Inmunohistoquímica Inmunofluorescencia	
	-----	Ultraestructural	
	Aislamiento del parásito	Cultivo celular Bioensayos	
	Detección del genoma del parásito	PCR convencional PCR en tiempo real	DNA de <i>T. gondii</i>
INDIRECTOS	Detección de anticuerpos	<ul style="list-style-type: none"> • Sabin y Feldman (Dye test) • Prueba intradermoreacción a la toxoplasmina • Aglutinación directa e indirecta • Inmunofluorescencia directa e indirecta • Fijación del complemento • Hemaglutinación directa e indirecta • ELISA • DOT ELISA • Western blot 	Anticuerpos anti- <i>T. gondii</i> circulantes en fluidos corporales

1.11.1 Diagnóstico directo

1.11.1.2 Aislamiento del parásito en cultivo celular y bioensayo

El diagnóstico directo más comúnmente utilizado, desde hace algunos años, es la identificación del parásito y su replicación en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los cultivos celulares son modelos *in vitro* que actualmente se usan con mayor frecuencia por sus múltiples ventajas, principalmente para la sustitución de modelos animales. Los tipos celulares más utilizados para la propagación de taquizoitos de *T. gondii* son las células de riñón de mono verde (VERO), los fibroblastos humanos o las células HeLa. La división y propagación se realiza en 6 a 10 días dependiendo del tipo de cepa. Para el aislamiento *in vivo*, se utilizan principalmente ratones susceptibles como los C57BL/6J, los knock outs para IFN γ o RAG2, pero sí lo que se pretende es generar anticuerpos se usan cepas resistentes a la infección como Balb/C. Se pueden infectar por diferentes vías, aunque la más utilizada es la intraperitoneal, con muestras provenientes de casos clínicos tanto de tejido como de líquidos corporales. Dependiendo de la virulencia de la cepa, el ratón puede desarrollar una infección aguda con abundante carga parasitaria o bien una infección crónica con la formación de quistes principalmente en sistema nervioso central (Cedillo-Peláez *et al*, 2011; Montoya, 2002; Rico-Torres, 2005) .

1.11.1.3 Métodos moleculares para diagnóstico y caracterización genética de *T. gondii*

Los marcadores genéticos se pueden dividir en dos categorías: los utilizados para diagnóstico y para determinación del genotipo. Los marcadores de diagnóstico principalmente son empleados con muestras clínicas en PCR convencional, anidada o cuantitativa en tiempo real, en, mediante elementos repetitivos de DNA del parásito como el gen *B1*, el cual tiene 35 copias, ITS-1 (espaciador transcrito interno) de 110 copias o 18S rDNA

Los marcadores para genotipificar a *T. gondii* se han desarrollado para identificar los aislamientos obtenidos, son adecuados para los estudios de epidemiología molecular y genética de las poblaciones.

Estos marcadores se identifican usando diversas técnicas como Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE), PCR-RFLP, análisis por microsatélites y secuenciación que son los más frecuentemente utilizados y son los que han generado datos significativos para la comprensión de la diversidad genética de *T. gondii*. Los marcadores más utilizados de acuerdo con los considerado por Toxo DB para determinar un genotipo son SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, PK1 y apico.

PCR-RFLP

La PCR para la detección de *T. gondii* fue propuesta por Burg y colaboradores en 1989, y empezó a ser aplicada a principios de los 90' s para el diagnóstico de la infección aguda (Rico-Torres, 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite generar millones de copias de DNA a partir de una región específica del genoma, a través de sucesivos ciclos de amplificación enzimática, por lo que la hace ser una técnica muy usada (Singh, 1997; Burg *et al*,1989). Existen diferentes variantes de PCR como anidada, semi-anidada, múltiple y en tiempo real. Estas pueden detectar pequeñas cantidades de DNA del parásito, inclusive desde un taquizoito como el PCR en tiempo real.

EL RFLP se considera una herramienta que permite caracterizar el DNA amplificado. Este método permite detectar variaciones menores en un gen como la sustitución de una sola base dentro de la secuencia. Para el uso de los genes unicopia es uno de los métodos más utilizados. Este método es rápido y fácil de usar, pero se han reportado algunos problemas técnicos, como la amplificación incompleta o la digestión incompleta del DNA, aunado a la contaminación de la muestra con DNA del huésped (Howe *et al*, 1997)

Secuenciación

Es uno de los métodos actualmente más utilizados ya que identifica cada uno de los nucleótidos de la secuencia de DNA de la muestra de interés. La comparación de las secuencias de un gen de varias cepas, puede permitir la identificación de mutaciones puntuales, eliminaciones o inserciones para obtener el polimorfismo de la secuencia de genes.

1.11.2 Diagnóstico indirecto

1.11.2.1 Inmunodiagnóstico

Las pruebas serológicas se han usado con éxito tanto en seres humanos como en animales, ya que detectan diferentes clases de anticuerpos, lo que representa una gran amplificación biológica de la presencia del parásito (Correa *et al*, 2006; Tizard, 2012). Se puede utilizar diversos métodos como hemaglutinación, la inmunofluorescencia, la prueba de Sabin y Feldman, pero en la actualidad las más utilizadas son el ELISA y el western blot, que utilizan principalmente extractos de taquizoitos. El diagnóstico clínico con fines de decisión terapéutica, debe establecerse claramente para determinar si está en fase aguda o crónica, principalmente para efectos del tratamiento, ya que sólo es útil para el primer caso. Al observar la cinética de anticuerpos en una primo infección se encontró que se producen primero anticuerpos de clase IgM e IgA y posteriormente IgG. Por esto el diagnóstico de primo infección se realiza mediante la detección de anticuerpos de clase IgM e IgA, y se confirma por el aumento en los títulos de la clase de IgG o midiendo su avidéz, donde los anticuerpos crónicos o “viejos” suelen tener mayor afinidad que los que se generan por primera ocasión. En los casos de toxoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos por medicamentos inmunosupresores debido a trasplantes o cáncer, o por infecciones como VIH, suele deberse por reactivación de una infección adquirida con anterioridad. En estos casos no hay producción de IgM, pues la infección es crónica por lo que se debe buscar incremento en los títulos de anticuerpos IgG.

El diagnóstico prenatal de la infección congénita es muy importante ya que permite detectar a las madres infectadas y probablemente evitar la transmisión a su producto. La seroconversión de una mujer seronegativa durante el embarazo es considerada como infección aguda, en países de baja prevalencia se hace una prueba tamiz buscando anticuerpos IgG y en mujeres positivas se buscan IgM, aunque se ha visto que cerca del 40% siguen siendo positivas a IgM durante dos años después de la infección primaria, cuando se tienen este tipo de situaciones, se busca la demostración de infección fetal mediante detección del parásito en el líquido amniótico, aislamiento o bien por PCR, si estas técnicas resultan positivas se confirma la infección vertical.

La infección congénita se evalúa postnatalmente por la detección de IgM e IgA específica, ya que estos anticuerpos no cruzan la placenta, el incremento de los títulos de los anticuerpos IgG en muestras seriadas con intervalos de dos a cuatro semanas, o su persistencia en la sangre del bebé durante más de 10 meses, se considera confirmatorios. Otra técnica muy útil es el western blot, en el que se comparan los tipos de reconocimiento antigénico de los anticuerpos de la madre con los del hijo, en el caso de haber antígenos reconocidos por el suero del bebé y con menor o nula intensidad por los anticuerpos de la madre, se considera que está produciendo neo anticuerpos y por ende se encuentra infectado (Beghetto *et al*, 2006; Elyasi *et al*, 2010; Vela-Amieva *et al*, 2005). Desde hace algunos años se han propuesto ELISAs usando uno o múltiples antígenos recombinantes para incrementar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico temprano principalmente de la infección congénita (Araújo y Ferreira, 2010; Beghetto *et al*, 2006; Pfrepper, Enders y Gohl, 2005).

1.11.2.2 Serotipificación

La serotipificación es un enfoque muy diferente para la caracterización y el estudio genético de la población de microorganismos, principalmente muy usada en bacterias y poco usada en parásitos. En *T. gondii*, se basa en la uso de péptidos sintéticos derivados de sitios polimórficos de los genes que codifican para antígenos inmunodominantes incluyendo GRA6 y GRA7 (Kong *et al*, 2003). La

detección de anticuerpos contra estos péptidos podrían permitir la identificación de la cepa del parásito sin necesidad de aislamiento o de DNA (Sousa *et al*, 2008). Los primeros en aplicar esta técnica en la tipificación de toxoplasmosis fueron el grupo de (Kong *et al*, 2003), quienes sintetizaron 60 péptidos basándose en la región C-terminal de proteínas antigénicas de GRA, SAG, ROP, NTP, BSR y proteínas SRS, acopladas a proteínas acarreadoras como KLH, obteniendo resultados exitosos con los péptidos de SAG2, GRA3, GRA6 y GRA7, en suero de ratones infectados experimentalmente con cepas clásicas, discriminando serotipos II de I y III, sin embargo al transpolar la técnica en seres humanos con genotipo conocido solo se obtuvo reacción con los péptidos de GRA6 y GRA7. A partir de estos resultados, diversos grupos han adoptado el diseño de los péptidos de Kong, haciendo algunas modificaciones técnicas o metodológicas como la sustitución del uso de proteínas “acarreadoras” por placas especiales de acoplamiento de aminoácidos, el uso de vectores clonales para elaborar péptidos quiméricos e incrementando la longitud de la secuencia al hacer repeticiones en “tándem” (Morisset *et al*, 2008; Peyron *et al*, 2006; Sousa *et al*, 2008).

La serotipificación empleando los péptidos de GRA6 y GRA7 se ha empleado con sueros de pacientes asintomáticos y sintomáticos con diversa signología clínica como toxoplasmosis congénita, retinocoroiditis, encefalitis, sistémica, y en casos de desórdenes mentales esquizofrénicos (Xiao *et al*, 2009). Todos los estudios se han realizado principalmente en población europea y norteamericana, algunos en grupos de América Latina de países como Colombia, Guyana Francesa, México y un solo reporte en África (Sousa *et al*, 2008). Sin embargo, los resultados que se han obtenido, solo discriminan entre serotipos II de I y III. En el estudio de Xiao *et al*, (2009) se propone el diseño de dos péptidos GRA7 I y GRA7 III para lograr diferenciar entre cepas tipo I y III, basándose en la secuencia de cepas RH y C56 de la proteína, en la región C-terminal desde el sitio 200 hasta 236, identificando 5 SNPs entre ambos péptidos, logrando diferenciar entre estas dos cepas en sueros de ratones infectados experimentalmente, y posteriormente desafiando con sueros de seres humanos positivos para ambas cepas, mostrando resultados exitosos, sin

embargo no muestran los gráficos con esta información y el número de muestras es escasa.

La mayoría de péptidos que se han probado se han basado en las cepas clásicas I, II y III, algunos trabajos como el de (Sousa *et al*, 2009) propone péptidos de GRA6 basados en secuencias atípicas de dos cepas de América Latina y una de África, desafiándolos en pacientes con genotipos atípicos de estas mismas regiones geográficas, pero los resultados muestran reacción cruzada con otras cepas clásicas y en algunos casos ni siquiera hay reacción.

Sí bien la serotipificación es una técnica innovadora con resultados favorables para la identificación de cepas tipo II de las I y III, en ratones y población humana con infección para *T. gondii*, son escasos los estudios, la mayoría en sus conclusiones hacen insistencia en la búsqueda de nuevos péptidos basados en antígenos inmunogénicos y el adecuado diseño de los mismos para aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica. En la sección de la discusión se presentan cuadros con información de los péptidos y de los estudios relacionados con la serotipificación de *T. gondii*.

1.12 El uso de la bioinformática para el modelaje de estructuras

Como previamente se mencionó las proteínas SAG y GRA son componentes importantes para la virulencia e invasión de *T. gondii*, y se sabe que son muy antigénicos, por lo que la mayoría de huéspedes infectados tendrán anticuerpos contra ellos. Y aprovechando esta condición se han elaborado péptidos sintéticos a partir de las proteínas SAG 1 y 2 así como GRA 6 y 7 para la serotipificación de *T. gondii* (Kong *et al*, 2003). Sin embargo a pesar de que se han identificado regiones inmunogénicas de estas proteínas (Wu *et al*, 2009), a excepción de SAG 1, no existen reportes sobre cómo se lleva a cabo la interacción de los epítomos de éstas y el sitio de unión a su ligando (anticuerpo). Para SAG 1 se ha reportado su estructura cristalográfica interaccionando con su anticuerpo (Graille *et al*, 2005). Debido al escaso reporte de las estructuras tridimensionales determinadas experimentalmente de estas proteínas, una estrategia para conocer su estructura

es el uso de herramientas bioinformáticas. Si deseamos conocer el detalle atómico de una proteína de manera confiable, es recomendable obtener su estructura por métodos experimentales como cristalografía de rayos X o por espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Sin embargo dichos métodos no siempre son exitosos y presentan inconvenientes; por ejemplo, la dificultad de cristalizar a las proteínas y el largo tiempo que dichos procesos requieren. Una alternativa distinta a la cristalografía son los métodos computacionales para facilitar la predicción de estructura de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos. Debido a que no se ha determinado experimentalmente la estructura de las proteínas que deseamos estudiar, una forma rápida, económica y accesible para determinar su forma tridimensional es hacer uso de las herramientas bioinformáticas.

1.12.1. Modelaje de proteínas

Actualmente se han desarrollado diversas metodologías para modelar la estructura de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos utilizando métodos bioinformáticos (Zhang, 2008).

A continuación se definirá brevemente en qué consisten las técnicas.

1.12.1.1 Modelado por homología

Este método modela la estructura de una proteína de interés utilizando como molde estructuras obtenidas experimentalmente de miembros relacionados a nivel de familia de proteínas (Martí-Renom y Stuart, 2000) Sin embargo, estos métodos sólo pueden emplearse cuando existe una estructura molde que se encuentre disponible.

1.12.1.2 Modelado por reconocimiento del plegamiento (threading)

Este método usa tanto información de similitud de secuencia (cuando existe) como información estructural para modelar una estructura de proteína (Ellrott *et al*, 2008).

1.12.1.3 Modelado *ab initio*

Este método se aplica cuando no es posible hallar una estructura similar u homóloga relacionada a la proteína de interés. Predice la estructura tridimensional de una proteína partiendo únicamente de su secuencia primaria de aminoácidos. Utilizando principios de física que gobiernan el plegamiento de proteínas, el método busca las posibles conformaciones de cada residuo aminoacil a través del uso de algoritmos de mecánica y dinámica molecular, así como el empleo de bases de datos de elementos de estructura secundaria estándar (Pillardy *et al*, 2001).

Con la utilización de cualquiera de estos métodos se puede proponer un modelo de los péptidos de interés usados en este trabajo, a través de su secuencia de aminoácidos y con ello sugerir información importante en la interacción de los anticuerpos con los péptidos, aunque cabe resaltar que estos modelos son “teóricos” basados en algoritmos de diferentes servidores, no quiere decir que sean la estructura tridimensional real de la proteína, primero porque los péptidos son una serie de fragmentos provenientes de la proteína completa, para saber con exactitud la estructura se tendría que cristalizar cada proteína.

2. Justificación

Los escasos estudios de la diversidad genética de *T. gondii* en México han puesto en evidencia la presencia de los genotipos I, III, recombinantes y atípicos, pero dada la gran diversidad climática de nuestro país y la importancia que ejerce este factor sobre la dispersión de este parásito, es sustancial conocer la variabilidad genética.

La genotipificación por medio de secuenciación de fragmentos polimórficos o el PCR-RFLP son las pruebas de referencia; sin embargo, requieren del DNA del parásito que permita amplificar fragmentos en suficiente cantidad, lo cual no siempre es posible; por esta razón, hace relativamente poco se iniciaron diseños de péptidos sintéticos pertenecientes a proteínas antigénicas y polimórficas para los tres linajes clásicos de *T. gondii*, como las de gránulos densos (GRA6 y 7), usándolas como antígenos en un ELISA, basándose en la técnica de

serotipificación ampliamente descrita para otros microorganismos principalmente en bacterias; sin embargo poco empleada en parásitos. Si bien, ya se tiene información basada en estudios de serotipificación, utilizando los péptidos de las proteínas anteriormente mencionadas, contemplando únicamente la región C-terminal de la proteína, con escasos polimorfismos entre los linajes; no obstante se han obtenido resultados parciales y algunos no concluyentes, sobre todo por las reacciones cruzadas entre péptidos, además estos trabajos se han realizado con muestras de seres humanos de Europa, EUA y algunos países de América latina. En esta tesis se proponen diseños de péptidos diferentes a los ya reportados, de las proteínas GRA6 y GRA7, y se presenta un nuevo péptido basado en la proteína de superficie SAG1 para ser usados en sueros de seres humanos y animales de México.

3. Hipótesis

La prueba de serotipificación discriminará los linajes clásicos I, II y III de *Toxoplasma gondii* en seres humanos y animales.

4. Objetivo general

Estandarizar una prueba de serotipificación para detección de linajes clásicos I, II y III de *Toxoplasma gondii* en humanos, animales domésticos y silvestres.

4.1 Objetivo particular

Relacionar los resultados de serotipificación con los de genotipificación.

5. Material y metodología

En la **Figura 12** se muestra la estrategia general de este trabajo. Se realizaron tres acciones de manera independiente: la selección de las proteínas para el diseño de los péptidos polimórficos e inmunodominantes; éstas fueron las proteínas GRA6, GRA7, SAG1 y SAG2. Se escogieron estas cuatro proteínas porque han sido descritas como antígenos potenciales para la síntesis de péptidos sintéticos y su uso en ELISA para diagnóstico de *T. gondii* y la determinación de los genotipos clonales I, II y III.

Simultáneamente, se realizó la selección de sueros de casos de seres humanos y animales con conocimiento previo de su genotipo. Finalmente, para determinar la reacción de cada tipo de péptido, se inmunizaron ratones con la cepa tipo I (RH), y se infectaron con las cepas tipo II (ME49) o III (VEG) de *T. gondii* para la obtención de suero positivo a cada genotipo y de esta manera observar la reacción del suero homólogo con el péptido homólogo por ELISA, es decir, si el suero correspondía a un ratón infectado con cepa tipo I, éste debía reaccionar con los péptidos del mismo tipo.

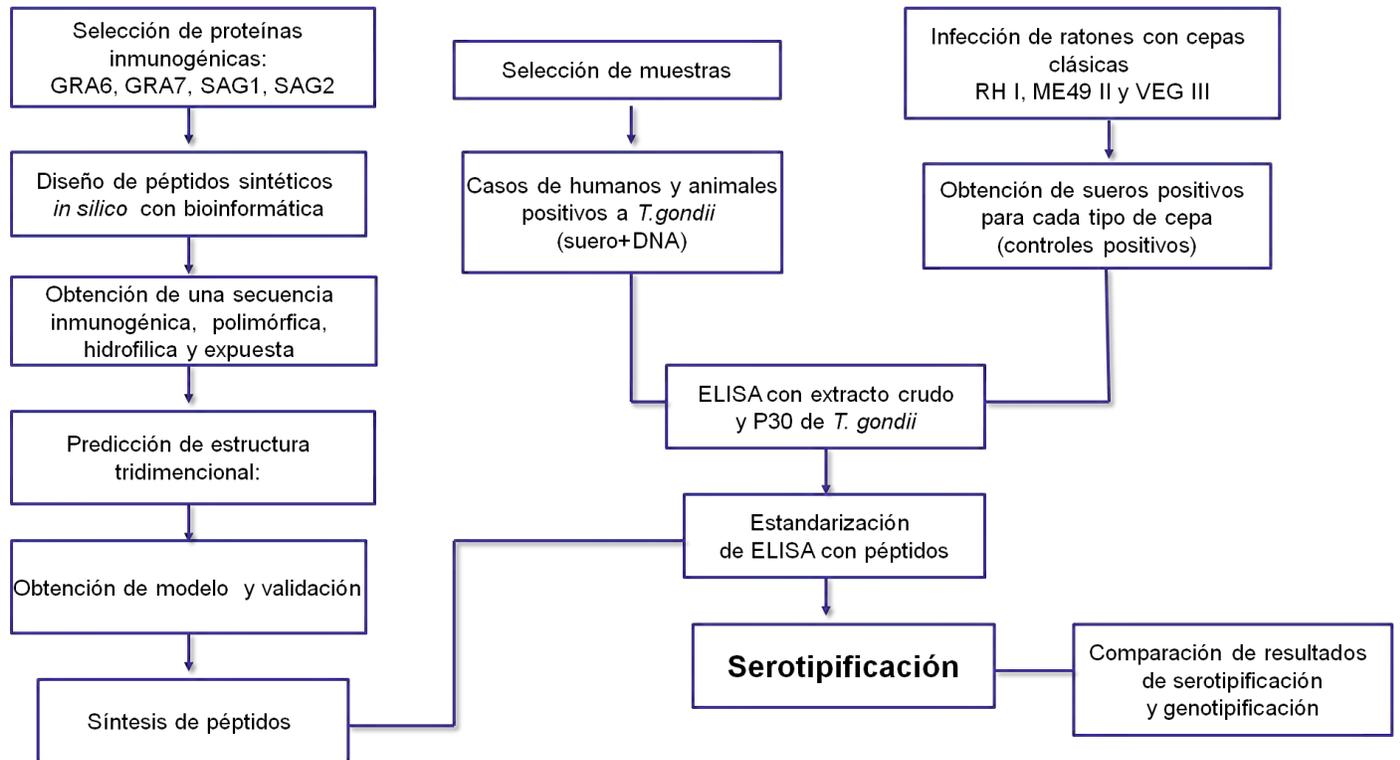


Figura 12. Flujograma de estrategia general

5.1 Material biológico

5.1.1 Taquizoitos de *T. gondii*

Los taquizoitos vivos que se emplearon para la infección en ratones fueron de las cepas ME49 (II) y VEG (III) de *T. gondii*. Dichas cepas se mantuvieron por medio de pases en ratones C57BL6 RAG2^{-/-} y Balb/c respectivamente; además ambas cepas se cultivaron en células VERO. Una vez obtenida la cantidad necesaria de taquizoitos de cada cepa, éstos se inocularon por vía intraperitoneal en ratones Balb/c, en una dosis única sin adyuvante.

Para obtener suero de ratones inmunizados con una cepa tipo I y dado que ésta es muy virulenta en ratones, se elaboró un extracto crudo con las proteínas solubles de la cepa RH (I): los taquizoitos se obtuvieron por medio de pases en ratones

Balb/c, inoculándolos con un millón de parásitos suspendidos en solución de NaCl 0.15M amortiguada con fosfatos 0.01M (PBS), pH 7.2, por vía intraperitoneal. Transcurridos 4 a 6 días, los taquizoitos se cosecharon mediante lavados peritoneales; el material colectado se centrifugó a 1,200 rpm durante 5 minutos para eliminar detritus celular y se calculó su viabilidad y su pureza. Posteriormente, los parásitos se suspendieron en una solución de PBS estéril que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los taquizoitos se sonicaron 3 veces a 7hz por periodos de 1 minuto con descansos intermedios de 5 minutos dentro de un recipiente con hielo, para obtener sus proteínas membranales e intracelulares. El material que fue sonicado se centrifugó a 10,000 x g durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante se fraccionó y se almacenó a -70°C hasta su uso. Finalmente, la cantidad de proteínas del extracto se cuantificó con el método de Bradford, empleando un reactivo comercial de Bio-RAD.

5.1.2 Sueros de seres humanos y animales

Se seleccionaron casos de seres humanos y animales positivos a *T. gondii* de un banco de muestras del Laboratorio de Inmunología Experimental, el cual pertenece al INP con resultados previos de su genotipo, los cuales se muestran en el **Cuadro 2**. Desafortunadamente no contamos con un suero prototipo de casos de infección por genotipo II.

Se eligieron dos sueros de binomios madre-hijo con infección perinatal, un suero de una mujer gestante y un suero de un neonato con infección congénita, provenientes del Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Además, se eligieron sueros de animales pertenecientes también al mismo banco; un suero de perro feral de la Reserva Ecológica de Ciudad Universitaria en San Ángel, un suero de gato doméstico proveniente del Estado de Colima y un suero de oso negro de una colección privada.

Como testigos negativos a la infección por *T. gondii* se seleccionaron 5 sueros de mujeres gestantes negativas a diferentes infecciones congénitas de TORCH (*T. gondii*, Rubeola, Citomegalovirus, Hepatitis) VIH y Sífilis, así como cinco sueros de

perros y gatos negativos a *T. gondii* previamente corroborados por dos técnicas inmunológicas; ELISA y western blot.

Cuadro 2. Muestras de sueros con resultados previos de genotipo

Identificación	Especie	Marcadores para PCR-RFLP					Genotipo
		GRA6	SAG3	BTUB	BTUB*	SAG2	
1, 1.1	Madre y neonato			I/u-1		I/u-1	I atípico
2	Madre			I/u-2		I/u-1	I atípico
3, 3.1	Madre y neonato		I				I
4	Neonato		I			I	I
1	Perro**	II	II			I	II/I
		I	I	I		I	
1	Gato	I	I	I	I	I	I
1	Oso negro		I/u-1, II/u-1, III/u-1				atípico

La identificación se asignó para clasificar las muestras y se usará en los resultados. “u” banda única extra. *BTUB* gen de betatubulina. *Se usó una enzima de restricción diferente a la de la columna previa. ** Tejidos provenientes de dos ratones infectados con tejidos de un perro con infección positiva a *T. gondii*. Rico-Torres *et al*, 2012; Cedillo Pelaéz, 2009; Besné Mérida, 2008.

5.1.3 Infección experimental de ratones con taquizoitos de las cepas ME49 (II) y VEG (III) de *T. gondii*

Se infectaron en total 10 ratones hembras de la cepa Balb/c, de 8 semanas de edad. Para el manejo por cepa se requirieron 5 ratones, las cuales se inocularon por vía intraperitoneal con 10,000 taquizoitos con 95% de pureza y 90% de viabilidad de las cepas ME49 (II) y VEG (III) (Rico-Torres, 2005).

Se tomaron muestras sanguíneas del seno retro-orbital previo a la inoculación y posteriormente a los 7, 15, 30 y 45 días para hacer una cinética de anticuerpos de tipo IgG. La sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para separar el suero, el cual se fraccionó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Como testigos negativos se mantuvo un lote de 5 ratonas sin infección con las mismas características y condiciones.

5.1.4 Inmunización de ratones con extracto crudo de la cepa RH (I) de *T. gondii*

Se inmunizaron 5 ratones Balb/c hembras, de 8 semanas de edad, por vía intraperitoneal con 20 µl (2mg/ml) de extracto crudo de taquizoitos de la cepa RH, el cual se encontraba a -20°C; el inóculo se homogenizó con 980 µl de agua inyectable, para obtener un volumen de 1000 µl (Correa *et al*, 2000; Rico-Torres 2005). Se realizó un segundo estímulo antigénico bajo las mismas condiciones a los 8 días posteriores a la primera inmunización, en ambos estímulos no se utilizó adyuvante.

Se tomaron muestras sanguíneas previas a la inmunización y posteriormente a los 7, 14, 30 y 45 días, para medir la cinética de producción de anticuerpos de tipo IgG. Las infecciones y las inmunizaciones se realizaron vía intraperitoneal con jeringas de insulina estériles de diámetro 0.5 x 16 mm.

5.2 Diseño *in silico* de péptidos sintéticos

5.2.1 Selección de antígenos de *T. gondii*

Con base en los estudios previos de serotipificación (Kong *et al*, 2003) se seleccionaron algunas proteínas antigénicas de *T. gondii* de las cuales se han usado como péptidos sintéticos con éxito que permiten identificar el serotipo. Las proteínas de superficie (SAG1 y SAG2) así como de gránulos densos (GRA6 y 7), han sido las más utilizadas para serotipificar cepas de *T. gondii*; por esta razón fueron elegidas para este trabajo.

5.2.2 Búsqueda de secuencias genéticas de GRA6, GRA7, SAG1 y SAG2 de *T.gondii*

Se realizaron búsquedas de secuencias completas de nucleótidos y posteriormente de aminoácidos en bases de datos como **GenBank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y **ToxoDB** (<http://toxodb.org/toxo/>).

Las secuencias seleccionadas para el análisis bioinformático se resumen en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Secuencias de aminoácidos de *T. gondii* seleccionadas para el diseño de péptidos sintéticos

Proteína y número de acceso al GenBank					
Cepa	Tipo	GRA6	GRA7	SAG1	SAG2
RH	I	L33814.1	DQ459443.2	ACT64638.1	AAF79156.1
ME49	II	AF239285.1		AFO54849.1	
BEVERLEY	II		EU157141.1		AAF79155.1
VEG	III			AFO54871.1	
C56	III	AF239284.1	DQ459458.2		AAF79156.1

5.2.3 Alineamiento de las secuencias genéticas de *GRA6*, *GRA7*, *SAG1* y *SAG2* de *T. gondii*

Para la identificación de regiones polimórficas no sinónimas entre las secuencias de las proteínas *GRA6*, *GRA7*, *SAG1* y *SAG2* y sus linajes genéticos (I, II y III), se realizaron alineamientos múltiples simultáneos de las secuencias seleccionadas, mediante dos servidores:

CLUSTALW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/),

MUSCLE (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/).

5.2.4 Predicción de péptido señal, regiones intramembranales, hidrofiliidad e hidrofobicidad en secuencias genéticas de *GRA6*, *GRA7*, *SAG1* y *SAG2* de *T. gondii*

Se seleccionaron regiones de toda la secuencia de la proteína donde fueran polimórficos además de ser antigénicos, hidrofílicos y con posibilidad de ser antigénicos para linfocitos B. La metodología utilizada fue similar a la descrita por (Sousa *et al*, 2009). Los aminoácidos polimórficos fueron considerados cuando no eran sinónimos, es decir que presentaran características físico-químicas diferentes. Algunas de las características que se deben de tomar en cuenta cuando se diseñan péptidos *in silico* para los fines de este tipo de estudios, es la selección de antígenos con potencial inmunogénico, se buscan aquellos que tengan mayor posibilidad de entrar en contacto con el sistema inmune (Carmona *et al*, 2012) son: la localización subcelular de las proteínas para determinar si tienen rutas secretoras (se busca el péptido señal, el cual no es de interés); las señales de unión a la membrana como la glicosilación o la presencia de dominios intramembranales, que aunque están presentes en las proteínas maduras, pueden no estar disponibles para los receptores de los linfocitos B o para el adecuado acceso de las inmunoglobulinas.

5.2.5 Identificación de péptido señal

La predicción del péptido señal se hizo con el servidor **SignalP 4.1** (Nordahl *et al*, 2011) (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), el cual fue excluido del análisis para la selección de péptidos sintéticos ya que son etiquetas que son eliminadas de las proteínas *in vivo*, una vez que éstas llegan a su sitio de acción biológica; es decir, tienen nula probabilidad de ser antigénicas para el huésped, además de ser muy conservada.

5.2.6 Identificación de regiones intra-membranales, hidrofóbicas e hidrofílicas

Mediante el servidor **TMHMM 2.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) y ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>). Se predijeron las regiones intra-membranales para ser excluidas, ya que generalmente son regiones hidrofóbicas y tienen una función de anclaje de la proteína a la membrana de la célula huésped, por lo que no es común que estén expuestas a los receptores B; además, estas secciones suelen ser más conservadas entre variantes genéticas.

Para predecir la hidrofiliidad y exposición de las regiones inmunogénicas, de los péptidos sintéticos se usó el servidor ABCpred (http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) (Saha *et al.*, *al.*, 2005).

5.2.7 Predicción de epítomos para linfocitos B

Para la predicción de epítomos B se usó ABCpred; tiene una base de 2,479 epítomos para linfocitos B lineales con una amplia gama de patógenos como virus, protozoarios y hongos. Como criterio de selección de las secuencias inmunogénicas se tomó en cuenta un puntaje igual o mayor a 0.80, que es el punto de corte que sugiere el servidor (Saha *et al*, 2005).

Con base en el análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos completas, se eligieron fragmentos que contaran con polimorfismos entre los tres linajes clonales, hidrofílicos, expuestos, antigénicos y con epítomos para linfocitos B. Los fragmentos de las secuencias seleccionadas de las proteínas se unieron mediante una secuencia de 10 aminoácidos de glicina y serina (GGSGGGSGSG), la cual se obtuvo de una de una secuencia de mayor longitud, que se utiliza para evitar el impedimento estérico con los fragmentos de interés (He y Taussing, 1997).

5.2.8 Modelaje de estructura tridimensional de péptidos sintéticos de GRA6, GRA7 y *T. gondii*

En la **Figura 13** se muestra la estrategia que se siguió para el modelaje tridimensional de cada uno de los péptidos. Esta sección se realizó por el interés de conocer la disposición en el espacio de las moléculas del péptido sintético, su plegamiento y principalmente su estructura secundaria; además de observar si había diferencias entre las estructuras de los péptidos de cada proteína de los tres linajes clonales I, II y III. También se predijo la accesibilidad al solvente, que es muy importante para este trabajo puesto que en todo momento se utilizan amortiguadores hidrosolubles, para ELISA.



Figura 13. Flujograma del modelaje tridimensional de péptidos sintéticos GRA6, GRA7, SAG1 de *T. gondii*.

5.2.9 Búsqueda de secuencias homólogas de los péptidos sintéticos

Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, Gish, y Miller, 1990) para identificar las secuencias con mayor similitud a la secuencia blanco de cada uno de los péptidos. Se definió si las secuencias encontradas tenían estructuras cristalográficas reportadas en el Protein Data Bank (PDB). En todas las secuencias encontradas se identificó que la identidad era mayor al 30 %, por lo que se decidió emplear el método de modelaje por homología. Se ha reportado que en proteínas con similitud de aminoácidos menor a este porcentaje, son estructuralmente diferentes de manera significativa (Rost, 1999).

5.2.10 Predicción de la estructura secundaria

Se utilizó el servidor APSSP (Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server (<http://imtech.res.in/raghava/apssp/>)). Este servidor predice la estructura secundaria con base en una secuencia de aminoácidos comparándola con otras secuencias homólogas.

5.2.11 Modelaje por homología

Para obtener un modelo tridimensional se empleó el servidor Esyspred3D web **server 1.0** el cual se basa en las múltiples alineaciones de secuencias homólogas con respecto a la secuencia blanco, además de tomar en cuenta la estructura secundaria y predicciones de exposición (Lambert *et al*, 2002).

Después de obtener los modelos resultantes, cada uno de ellos se validó con el servidor PSVS (Servidor de Validación de Estructura de Proteína) el cual utiliza la estructura tridimensional que se obtuvo. (<http://psvs-1.4-dev.nesg.org/>) (Bhattacharya *et al*, 2007). Se eligió el modelo tridimensional de mayor similitud a la estructura secundaria obtenida. Finalmente, se modeló la estructura tridimensional con el visualizador PyMOL (DeLano, 2002) y finalmente se obtuvo la predicción de accesibilidad al solvente de los residuos aminoácidos con el servidor GETAREA (Fraczkiewicz y Braun, 1998) (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>).

5.3 Síntesis de péptidos sintéticos

Se sintetizaron ocho péptidos, tres para cada proteína de gránulos densos (GRA6 y GRA7) y dos para antígeno de superficie (SAG1), por la empresa Invitrogen Accesolab, que fueron purificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con 0.1% de Trifluoroacético en 100% de acetonitrilo, a rangos de pureza de 80 al 90%. Los péptidos liofilizados se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

5.4 Reconstitución de los péptidos

Los viales de cada péptido contenían 5 mg. Se pesó 1 mg para solubilizar con amortiguador de fosfatos 10 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 7.5. Posteriormente se realizaron los cálculos pertinentes basándose en el peso más elevado de los 8 péptidos el cuál correspondió a GRA61 (5821.96 g/mol) para tener condiciones equimolares con los demás péptidos, quedando a 400 mM cada uno de ellos. A partir de esta concentración se realizó una dilución 1:100 para tener 4mM y a partir de este vial se calcularon 3 concentraciones 5 µg/ml (86 µM), 10 µg/ml (172 µM) y 20 µg/ml (344 µM) las cuales fueron usadas como antígenos en la ELISA para serotipificar.

5.5 ELISA indirecto para determinación de anticuerpos de tipo IgG en ratones infectados e inmunizados

Las placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Núm de catalogo 439454) se sensibilizaron con 100 µl de extracto crudo de *T. gondii* de la cepa RH, que es con la que se cuenta en el laboratorio a una concentración de 2 µg/ml en amortiguador de carbonatos (15 mM), pH 9.6 y se incubaron a 4°C toda la noche (Caballero-Ortega *et al*, 2012).

Los pozos se lavaron 5 veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS) adicionado con 0.05% de Tween 20 (-T) y posteriormente los sitios inespecíficos de unión se bloquearon con 200 µl de albumina sérica bovina al 0.1% en PBS-T y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se realizaron nuevamente los lavados con PBS-T y se colocaron los sueros diluidos 1:100 en PBS-T de los ratones infectados

con cepas ME49 y VEG y los sueros de los ratones inmunizados con extracto crudo de cepa RH se incubaron durante 2 h a 37°C. Se repitieron cinco lavados. Se adicionaron 100 µl de conjugado anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución 1:1,000 (Sigma-Aldrich) en PBS-T y se incubaron durante 2 h a 37°C. Se repitieron los lavados y los anticuerpos IgG totales fueron revelados con 100 µl por pozo de una solución de sustrato/cromógeno (5 ml de citrato de sodio 0.1 M y 5 ml de ácido cítrico 0.1 M más 5 mg de Ortofenilendiamina, adicionada con 4 µl de peróxido de hidrógeno al 30%). Después de 10-20 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 1 N. Los valores de absorbancia se obtuvieron mediante un lector de ELISA (Turner Biosystems 9300-010) a 490 nm de longitud de onda y se capturaron a través del programa Modulus™ MicroplateReader.

5.6 ELISA indirecto usando péptidos sintéticos como antígeno

Para el forrado de las placas de poliestireno de 96 pozos (Thermo Scientific Nunc Immobilizer Amino) se utilizaron 3 concentraciones iniciales de 5, 10 y 20 µg/ml, de cada uno de los 8 péptidos de manera independiente, diluyéndolos en un amortiguador de fosfatos (10 mM), cloruro de sodio (150 mM) pH 7.5 y se incubaron a 4°C durante toda la noche.

Se realizaron 4 lavados con PBS adicionado con 0.1% de Tween 20. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con 200 µl de albumina sérica bovina al 0.1% en PBS-T 0.1% a 37°C durante 1 hora. Se repitieron los lavados. Posteriormente se colocan sueros de ratones positivos y negativos a *T. gondii*, a una dilución 1:100 y 1:200 en PBS-T, durante 2 horas a 37°C. Se repitieron los lavados. Se agregaron 100 µl de conjugado comercial anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma Aldrich) a una dilución 1:1,000 en PBS-T. La detección de anticuerpos IgG totales fue revelada con 100 µl por pozo de una solución de sustrato/cromógeno mencionada anteriormente.

La metodología para las ELISAs con otras especies fue muy similar a lo anteriormente descrito, las modificaciones son las siguientes: para el caso de los perros se manejó la dilución del suero 1:400, del gato 1:200 y del oso negro 1:100;

los conjugados que se emplearon fueron anti-IgG de perro y de gato acoplados a peroxidasa a diluciones 1:2500 y 1:1000 respectivamente (Sigma-Aldrich) Para el oso negro se empleó una mezcla de proteína A de *Staphylococcus aureus* y proteína G *Streptococcus pyogenes* acoplada a peroxidasa a una dilución 1:5,000 en PBS-T, este conjugado anteriormente ya ha sido estandarizado para otras especies, pero al no contar con conjugado comercial para esta especie se tomo la decisión de usar esta opción.

6. Resultados

6.1 Alineamiento de secuencias

Se obtuvieron los aminoácidos polimórficos (SNP) entre las secuencias de las proteínas GRA6, GRA7, SAG1 y SAG2 para los linajes clásicos I, II y III, mediante alineamientos múltiples, con el servidor CLUSTALW2, dichos alineamientos únicamente se realizaron con las tres secuencias de interés para cada uno de los genotipos. Se identificaron 16 SNPs en las secuencias para las proteínas GRA 6 de los tres linajes. En la proteína GRA6 tipo II se encontraron 16 SNPs y dos deleciones; una de 5 aminoácidos y la segunda de uno. Las secuencias tipo I y II son muy similares (**Figura 14**).

```
I MAHGGIHLRQKRNFCPVTVSTVAVVFVFMGVLVNSLGGVRVAAADSSG 48
III MAHGGIHLRQKRNFCPLTVSTVAVVFVFMGVLVNSLGGVAVAAADSDG 48
II MAHGGIYLRQKRNFCPLTVSTVAVVFVFMGVLVNSLGGVAVAAADSSG 48
*****:*****:*****.*****.*

I VKQTPSETGSSGGQQEAVGTTEDYVNSSAMGGGQGDSLAEDDTTSEAAEG 98
III VKQTPSETGSSGGQQEAVGTTEDYVNSSAMGGGQGDSLAEDDTTSDAAEG 98
II VRQTPSETGSSGGQQEAVGTTEDYVNSSAMGGGQGDSLAEDDTTSDAAEG 98
*:*****:*****.*****

I DVDPPFVLANEGKSEARGPSLEERIEEQGTRRRYSSVQEPQAKVPCKRTQ 148
III DVDPPFVLANEGKSEARGPSLEERIEEQGTRRRYSSVQEPQAKVPSKRTQ 148
II DVDPPFALANEGKSEARGPSLEERIEEQGTRRRYSSVQEPQAKVPSKRTQ 148
*****.*****.*****

I KRHLIGAVVLAVSVAMLTAFFLRRTGRRSPQEPSGDGGGNDAGNNAGNG 198
III KRHLIGAVVLAVSVAMLTAFFLRRTGRRSPPEPSGDGGGNDAGNNAGNR 198
II KRHLIGAVVLAVSVAMLTAFFLRRTGRRSPQEPSGGGGNDAGNNAGNG 198
*****.*****.*****

I GNEGRGYGGRGEGGAEDDRRPLHPERVNVFDY 230
III GNEGRGYGGRGEGGGEDDRRALHPERVNVFDY 230
II GNEGR-----GEGG-EDDRRPLHPGSVNEFDF 224
*****      *****.*****.*** ** **:
```

Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (ME49) y III (C56) de la proteína GRA6. Los SNPs están resaltados en amarillo y en colores cada residuo aminoácido.

En la proteína GRA7 se observan 18 SNPs principalmente a partir de la posición 149 al 236 la cual corresponde a la región carboxilo terminal de la proteína (**Figura 15**).

```

I MARHAIFFALCVLGLVAAALPQFATAATASDDELMSRIRNSDFFDGQA 48
II MARHAIFSALCVLGLVAAALPQFATAATASDDELMSRIRNSDFFDGQA 48
III MARHAIFFALCVLGLVAAALPQFATAATASDDELMSRIRNSDFFDGQA 48
*****

I PVDSLRPTNAGVDSKGTDDHLTTSMDKASVESQLPRREPLETEPDEQEEV 98
II PVDSLRPTNAGVDSKGTDDHLTTSMDKASVESQLPRREPLETEPDEQEEV 98
III PVDSLRPTNAGVDSKGTDDHLTTSMDKASVESQLPRREPLETEPDEQEEV 98
*****

I HFRKRGVRSDAEVTDDNIYEEHTDRKVVPKSEGKRSFKDLLKKLALPAV 148
II HFRKRGVRSDAEVTDDNIYEEHTDRKVVPKSEGKRSFKDLLKKLALPAV 148
III HFRKRGVGSDAEVTDDHIYEEHTDRKVVPKSEGKRSFKDLLKKLALPAV 148
*****

I GMGASYFAADRILPELTEQQQTGEEPLTTGQNVSTVLGFAALAAAFAFLG 198
II GMGASYFAADR LVP ELTEEQQRGDEPLTTGQNVGTVLGFALAAAFAFLG 198
III GMGASYFAADRILPELTEQQQTGDEPLSTGQNVSTVIGFAALAAAVAFGLG 198
*****

I MGLTRTYRHFSPRKNRSRQPAL EQVPESGKDGEDARQ 236
II MGLTRTYRHFSPRKNRSRQPAL EQVPESGEDGEDARQ 236
III LGIKR TYRHFSPRKNRSRQPAP EHEVPESGEDREDARQ 236
: * : . ***** * : ***** : * *****

```

Figura 15. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (Beverley) y III (C56) de la proteína GRA7. Los SNPs están resaltados en amarillo y en colores cada residuo de aminoácido.

En la **Figura 16** se aprecian 10 SNPs, entre las cepas I y II/III de SAG1, además de una región muy conservada entre las tres cepas entre el aminoácido 55 y el 194.

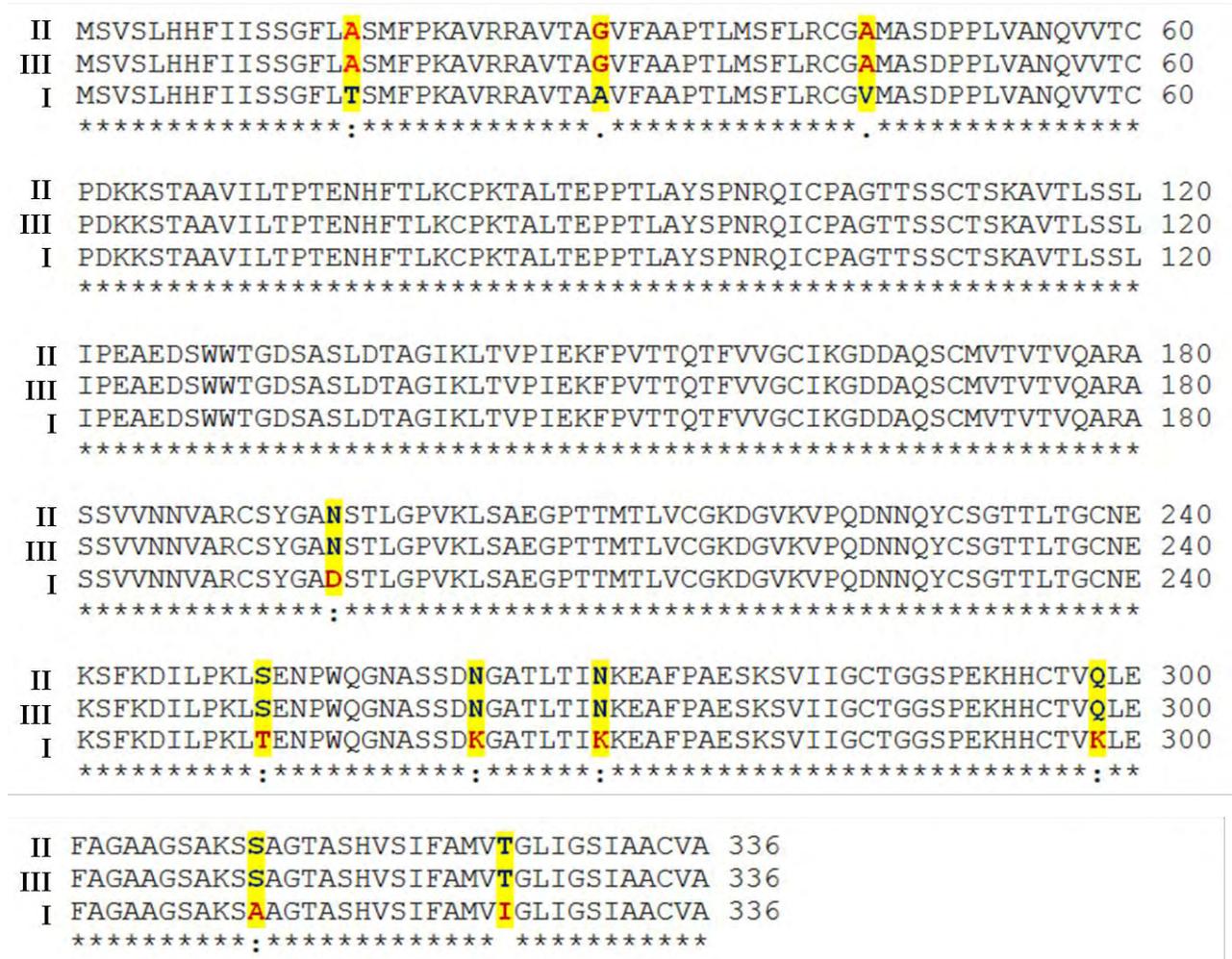


Figura 16. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (Beverley) y III (C56) de la proteína SAG1. Los SNPs están en color amarillo y en colores cada residuo de aminoácido.

En el alineamiento de la proteína SAG2 se observan 5 SNPs; los cambios se observan principalmente entre las cepas II de I/III (**Figura 17**).

```

I MSFSKTTSLASLALTGLFVVFVKFALASTTETPAPIECTAGATKTVDAPSS 50
III MSFSKTTSLASLALTGLFVVFVKFALASTTETPAPIECTAGATKTVDAPSS 50
II MSFSKTTSLASLALTGLFVVFVKFALASTTETPAPIECTAGATKTVEAPSS 50
*****:****

I GSVVFQCGDKLTISPSGEGDVFYGKECTDSRKLTTVLPGAVLTAKVQQPA 100
III GSVVFQCGDKLTISPSGEGDVFYGKECTDSRKLTTVLPGAVLTAKVQQPA 100
II GSVVFQCGDKLTISPSGEGDVFYGKECTDSRKLTTVLPGAVLKAKVEQPP 100
*****.***:*.

I KGPATYTLSYDGTPEKPQVLCYKCVAEAGAPAGRNNDG-SSAPTPKDCKL 149
III KGPATYTLSYDGTPEKPQVLCYKCVAEAGAPAGRNNDG-SSAPTPKDCKL 149
II KGPATYTLSYDGTPEKPQVLCYKCVAEAGAPAGRNNDGGSSAPTPKDCKL 150
*****

I IVRVPGADGRVTSGFDPVSLTGKVLAPGLAGLLITFV 186
III IVRVPGADGRVTSGFDPVSLTGKVLAPGLAGLLITFV 186
II IVRVPGADGRVTSGFDPVSLTGKVLAPGLAGLLITFV 187
*****

```

Figura 17. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las cepas I (RH), II (Beverley) y III (C56) de la proteína SAG2. Los SNPs se identificaron en color amarillo y en colores cada residuo de aminoácido.

Al analizar los resultados de los alineamientos para cada una de las proteínas contempladas para este estudio, se decidió que SAG2, debía ser eliminada ya que los SNPs detectados fueron pocos en comparación con las otras proteínas y los cambios fueron entre las cepas I/III de las tipo II, lo que corresponde a lo ya reportado en otros trabajos.

6.2 Identificación de péptido señal

Se realizó la predicción de péptido señal con el servidor SignalP4.1. Esta región fue predicha para no ser incluida en el diseño de los péptidos sintéticos. En la Figura 18 se presentan tres imágenes correspondientes a las predicciones de péptido señal de GRA6, GRA7 y SAG1 de las cepas tipo I. Se observa que GRA6 I no presenta péptido señal, GRA7 sí y para el caso de SAG1 los valores de la predicción, se encuentran muy cercanos al punto de corte, y no se puede definir un resultado; sin embargo en la literatura se menciona que esta proteína sí contiene péptido señal, para fines de este trabajo se considero eliminar los primeros 30 aminoácidos. El tamaño aproximado de cada péptido señales son de 27 a 30 aminoácidos.

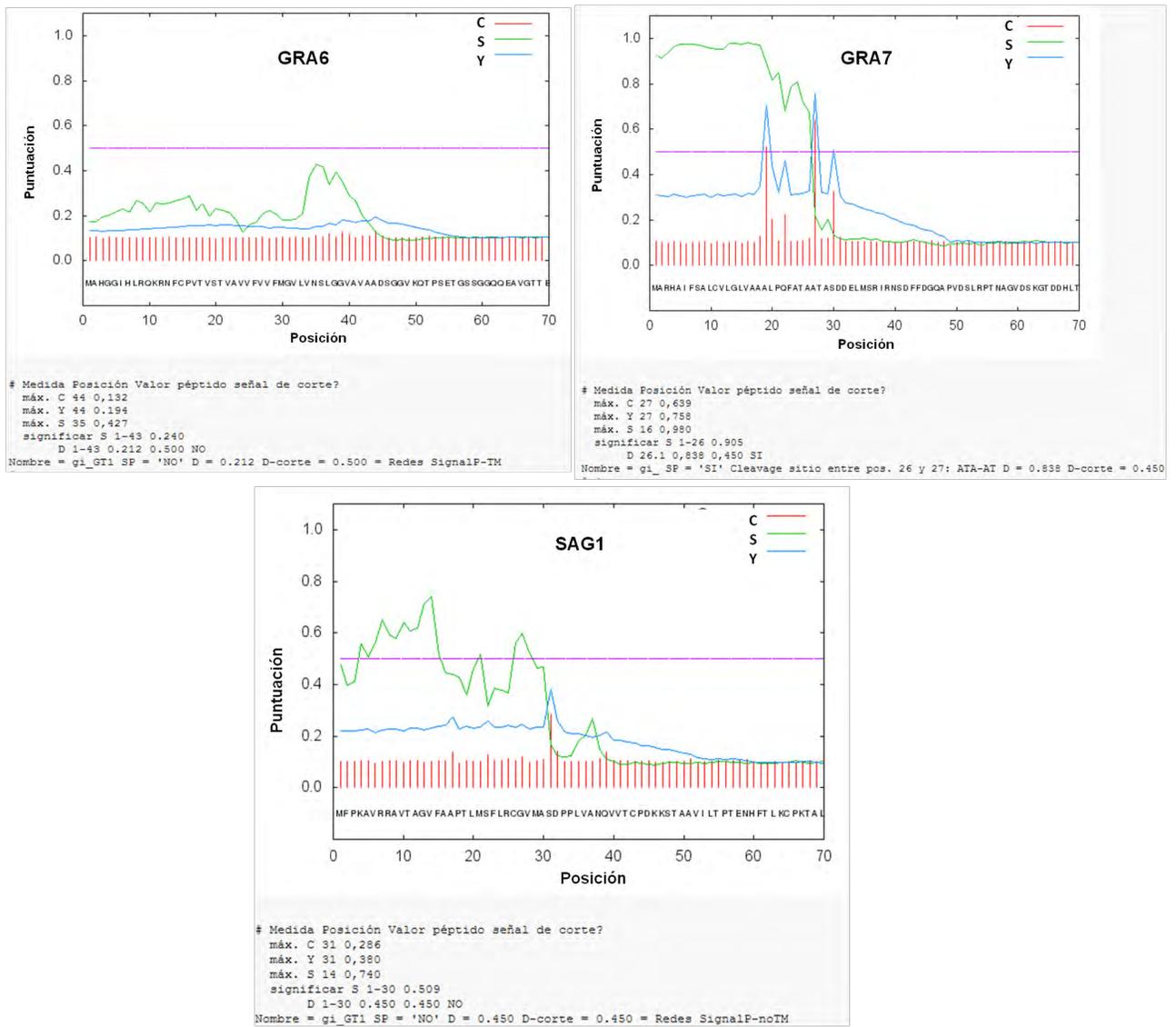


Figura 18. Predicción de péptido señal de las secuencias de GRA6, GRA7 y SAG1 de la cepa I (GT1). La flecha roja indica el péptido señal y la línea roja punteada indica el punto de corte en el que se basa el servidor para emitir la predicción. Se aprecian tres medidas que en conjunto determinan la presencia de un péptido señal, C=líneas rojas donde el valor más alto indica el punto de escisión del péptido señal y posterior a ello inicia la proteína madura; S= líneas verdes que reportan para cada aminoácido un valor indicando si corresponde al péptido señal o de la proteína madura, si el puntaje de cada aminoácido es alto y rebasa el punto de corte se considera péptido señal; Y= líneas azules es un resultado derivado de los valores C y S.

6.3 Regiones intramembranales

Para la predicción de regiones intramembranales se utilizó el servidor TMHMM 2.0, el cual emite resultados gráficos como se puede observar en la figura 20: GRA6 cuenta con dos regiones intra-membranales, una en la porción N-terminal de 30 aminoácidos y otra muy cercana a la porción C-terminal de alrededor de 40 aminoácidos. Este resultado es muy similar para GRA7; en estas proteínas las regiones predichas por el servidor corresponden a las que atraviesan la membrana de la VP para anclarse tanto en el parásito como en la célula huésped, ya que como se mencionó son puentes de comunicación y sostén de la VP. Para SAG1 hay una región intramembranal en la porción C-terminal que es el sitio de unión con la membrana de la célula huésped (**Figura 19**).

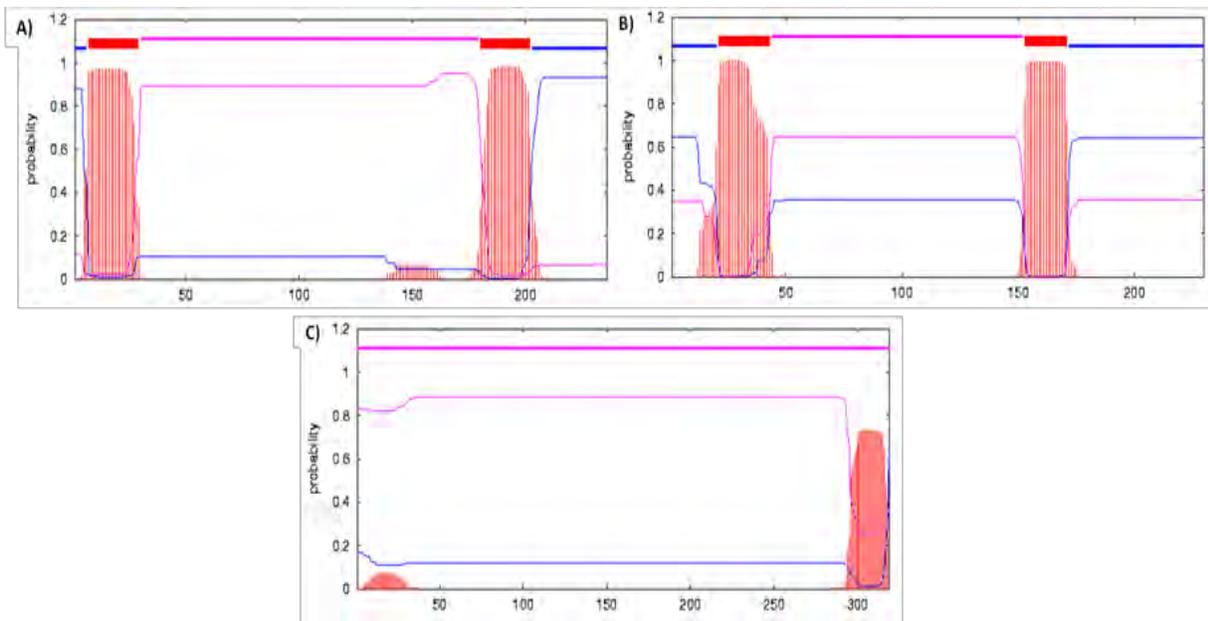


Figura 19. Predicción de regiones transmembranales. A) GRA6, B) GRA7 y C) SAG1 tipo I. Las regiones transmembranales se marcan en rojo, las líneas en color azul indican lo que está fuera y las líneas rosas lo que está dentro de la célula del huésped. Representando las regiones intramembranales con curvas sombreadas de color rojo y en la parte superior marcadas con una barra roja.

6.4 Regiones hidrofóbicas

Para la predicción de regiones hidrofóbicas se utilizó el servidor Protscale en la opción Hphob/Kyte and Doolittle. Los resultados los emite mediante gráficos, cuando los picos de las curvas del gráfico rebasan el 0 hacia los valores positivos se consideran regiones hidrofóbicas. En la **Figura 20** se aprecia que GRA6 presenta dos regiones, las cuales coinciden con las regiones intramembranales anteriormente descritas; para GRA7 el servidor emite tres regiones intramembranales, aunque para esta proteína sólo se conocen dos regiones hidrofóbicas verdaderas y una hipotética. En cuanto a SAG1 se encontró una región hidrofóbica en la porción C-terminal, que también coincide con los resultados para la región intramembranal.

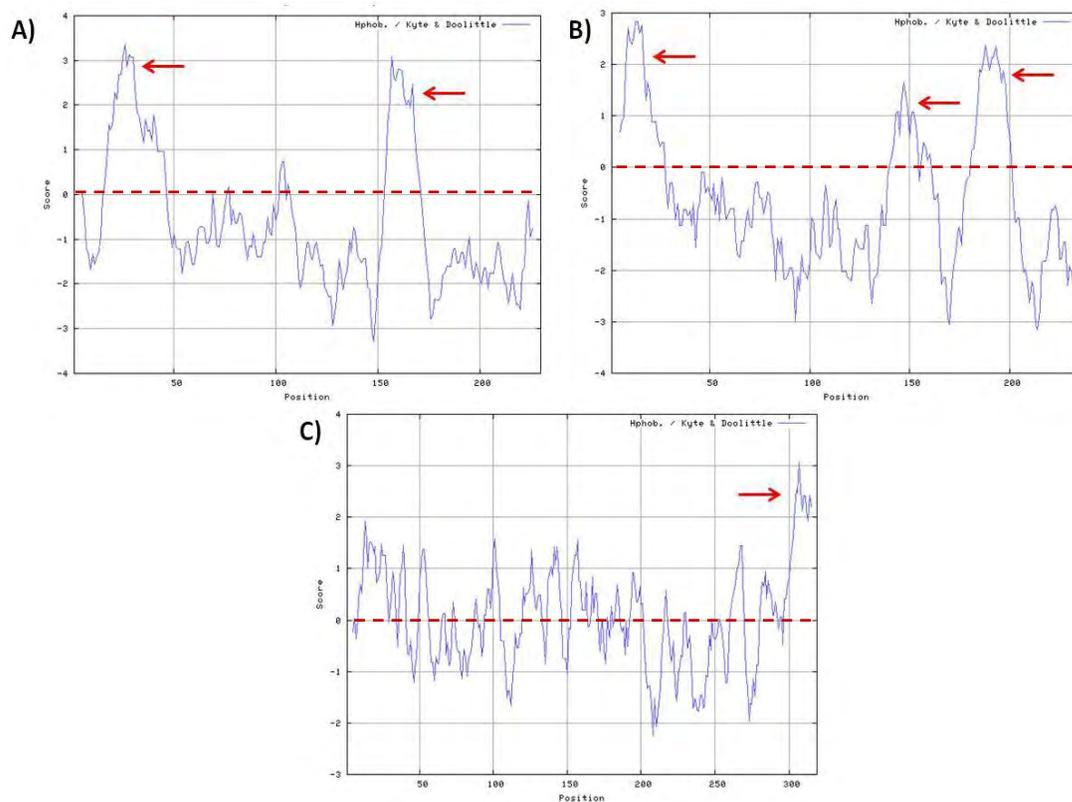


Figura 20. Predicción de hidrofobicidad. A) GRA6, B) GRA7 y C) SAG1 tipo I. Las flechas rojas indican regiones hidrofóbicas. En GRA6 se observan dos, las cuales son las regiones transmembranales, en GRA7 la primera región corresponde al péptido señal y las otras dos a regiones transmembranales, en SAG1 se evidencia una pequeña región en la última porción de la proteína.

6.5 Regiones hidrofílicas

El servidor usado para esta predicción fue ABCpred el cual evalúa la secuencia y emite dos tipos de resultados: un cuadro con las secuencias subrayando en color azul las regiones de mayor hidrofiliidad y una serie de gráficas por cada 60 aminoácidos, marcando el punto de corte a partir del número cero. Las regiones hidrofílicas son muy importantes, porque indican exposición a la superficie y solubilidad. En la **Figura 21** se presenta un ejemplo con la secuencia de RH que es tipo I para cada proteína y en la **Figura 22** se aprecia un gráfico de la proteína GRA6 tipo I indicando las regiones hidrofílicas con flechas rojas.

GRA6 ¹MAHGGIHLRQKRNFCPVTVSTVAVVVFVFMGVLVNSLGGVAVAADSGGVKQTPSETGSSGGQQEAVGTTEDYVNSS
AMGGGQGDLSLAEDDTTSEAAEGDVDPFPVLANEGKSEARGPSLEERIEEQGTRRRYSSVQEPQAKVPSKRTQKRH
RLIGAVVLAVSVAMLTAFFLRRTGRRSPQEPSGDGGGNDAGNNAGNGGNEGRGYGGRGEGGAEDDRRPLLHPERVN
VFDY²³⁰

GRA7 ¹MARHAIFFALCVLGLVAAALPQFATAATASDDELMSRIRNSDFFDGQAPVDSLRPTNAGVDSKGTDDHLLTSMDKASV
ESQLPRREPLETEPDEQEEVHFRKRGVRSDAEVTDDNIYEHTDRKVVPRKSEGKRSFKDLLKKLALPAVGMGASYFA
ADRILPELTEQQQTGEEPLTTGQNVSTVLGFAALAAAAAFLGMGLTRTYRHFSPRKNRSRQPALEQEVPESGKDGEDA
RQ²³⁶

SAG1 ¹MFPKAVRRAVTAGVFAAPTLM SFLRCGVMASDPPLVANQVVTCPDKKSTAAVILTPTENHFTLKCPKTALTEPPTLAYS
PNRQICPAGTTSSCTSKAVTLSSLIPEAEDSWWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFVVGCIKGDDAQSCMVTVT
VQARASSVVNNVARCSYGADSTLGPVKLSAEGPTTMTLVCGKDGVKVPQDNNQYCSGTTLTGCNEKSFKDIILPKLTE
NPWQGNASSDKGATLTIKKEAFPAESKSVIIGCTGGSPKHHCTVKLEFAGAAGSAKSAAGTASHVSIFAMVIGLIGSIAA
CVA³¹⁹

Figura 21. Predicción de hidrofiliidad de cepa I (RH). Las letras en verde subrayadas indican las regiones de mayor hidrofiliidad

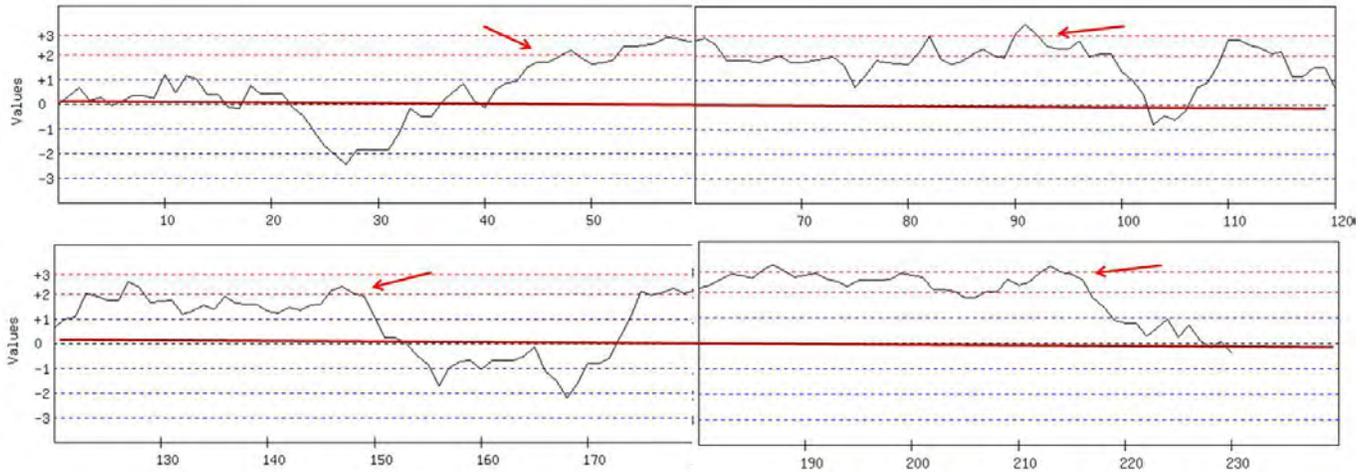


Figura 22. Gráfico representativo de hidrofiliidad de GRA6 cepa I (RH). Las regiones que sobrepasan el punto de corte (línea roja) indican regiones con mayor hidrofiliidad, las cuales se encuentran señaladas con flechas.

6.6 Predicción de inmunogenicidad y epítomos para linfocitos B

El análisis se llevó a cabo mediante el servidor ABCpred, el cual predice epítomos de células B en secuencias de antígenos, utilizando una red neuronal artificial (Saha y Raghava, 2006). A continuación se muestran las secuencias de cada proteína, subrayando en color azul los fragmentos con mayor antigenicidad para linfocitos B comunes para los tres tipos de cepas y en color rojo epítomos específicos por cepa.

GRA6 I

1MAHGGIHLRQKRNFPCVTVSTVAVVFWFMGVLVNSL**GGVAVAADSGGVKQTP**
 SETGSS**GGQQA**VGTT**EDYVNS**SAMGGGQGD**SLAEDDTT**SEAAEGD**VDPFPVL**
ANEKGSEARGPSLEER**IEEQGTRRRYSSVQEPQ**AKVPSKRTQKRHRLIGAVVLAV
 SVAMLTAFLLRRTGRRSP**QEPSGDGGNDAGNNGGNE**GRGYGGR**GEGGA**
EDDRRPLHPERVNVFDY₂₃₀

GRA6 II

1MA**HGGIYLRQKRNF**CPLTVSTVAVVFWFMGVLVNSL**GGVAVAADSGGVRQTP**
 SET**GSSGGQQA**VGTT**EDYVNS**SAMGGGQGD**SLAEDDTTSDAAEGD**VDPFPAL
 ANEKGSEARGPSLEER**IEEQGTRRRYSSVQEPQ**AKVPSKRTQKRHRLIGAVVLAV
 SVAMLTAFLLRRTG**RRSPQEPSGGGGNDA**GNNAGNNGGNEGRGE**GGEDDRRP**
LHPGSVNEFDF₂₂₄

GRA6 III

1MAHGGIHLRQKRNFCLTVSTVAVVFFVFMGVLVNSL GGVAVAADSDGVKQTPS
ETGSSGGQQEAVGTTEYVNSSAMGGGQGDSLAEDDTTS DAAEGDVDPFPVLA
NEGKSEARGPSLEERIEEQGTRRRYSSVQEPQAKVPSKRTQKRHRLIGAVVLAVS
VAMLTAFFLRR TGRRSPPEPSGDGGNDAGNNAAGNRGNEGRGYGGRRGEGGGE
DDRRALHPERVNVFDY₂₃₀

GRA7 I

1MARHAIFSAFCVLGLVAAALPQFAT AATASDDELMSRIRNSDFFDGQAPVDSLRP
TNAGVDSKGTDDHLTTSMDKASVESQLPRREPLETEPDEQEE VHFRKRGRVRSDA
EVTDDNIYEEHTDRKVVPRKSEGKRSFKDLLKKLAL PAVGMGASYFAADRILPEL
TEEQQRGDEPLTTGQNVGTVLGFAALAAAAAFLG MGLTRTYRHFSPRKNRSRQ
ALEQEVPESGEDGEDARQ₂₃₆

GRA7 II

1MARHAIFSAFCVLGLVAAALPQFAT AATASDDELMSRIRNSDFFDGQAPVDSLRP
TNAGVDSKGTDDHLTTSMDKASVESQLPRREPLETEPDEQEE VHFRKRGRVRSDA
EVTDDNIYEEHTDRKVVPRKSEGKRSFKDLLKKLAL PAVGMGASYFAADRILPEL
TEQQQTGEEPLTTGQNVSTVLGFAALAAAAAFLG MGLTRTYRHFSPRKNRSRQ
ALEQEVPESGKDGEDARQ₂₃₆

GRA7 III

1MARHAIFSAFCVLGLVAAALPQFAT AATASDDELMSRIRNSDFFDGQAPVDSLRP
PTNAGVDSKGTDDHLTTSMDKASVESQLPRREPLETEPDEQEE VHFRKRGRVGS
AEVT DDHIYEEHTDRKVVPRKSEGKRSFKDLLKKLAL PAVGMGASYFAADRILPE
LTEQQQTGDEPLSTGQNVSTVIGFAALAAVAFLGLG IKRTYRHFSPRKNRSRQ
PAPEHEVPESGEDREDARQ₂₃₆ **SAG1 I**

1MFPKAVRRAVTAGVFAAPTLMSFLRCGVMASDPPLVANQVVTCPDKKST AAVIL
TPTENHFTLKCPKTAL TEPPTLAYSPNRQICPAGTTSSCTSKAVTLSSLIPE AEDS
WWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFV VGCIKGDDAQSCMVTTVQARASS
VVNNVARCSYGADSTLGPVKLS AEGPTTMTLVCGKDGVKVPQDNNQYCSGTTLT
GCNEKSFKDIL PKLTENPWQGNASSDKGATLTIKKEAFPAESK SVIIGCTGGSPE
KHHCTVQLEFAGAAGSAKSAAGTASHVSIFAMVIGLIGSIAACVA₃₁₉

SAG1 II

1MFPKAVRRAVTAGVFAAPTLMSFLRCG AMASDPPLVANQVVTCPDKKST AAVIL
TPTENHFTLKCPKTAL TEPPTLAYSPNRQICPAGTTSSCTSKAVTLSSLIPE AEDS
WWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFV VGCIKGDDAQSCMVTTVQARASS
VVNNVARCSYGANSTLGPVKLS SAEGPTTMTLVCGKDGVKVPQDNNQYCSGTTLT
GCNEKSFKDIL PKLSENPWQGNASSDNGATLTINKEAFPAESKSVII GCTGGSPE
KHHCTVQLEFAGAAGSAKSSAGTASHVSIFAMVTGLIGSIAACVA₃₁₉

Con los resultados del análisis bioinformático se eligieron fragmentos de las secuencias que cumplían con las características de polimorfismo entre las tres

cepas clásicas I, y III, hidrofiliidad, antigénicas, expuestas y con epítomos para linfocitos B, para la síntesis de los péptidos, esta información se muestra en el **Cuadro 4.**

Cuadro 4. Aminoácidos seleccionados de las proteínas SAG1, GRA6 y GRA7 de *T. gondii* para el diseño de los péptidos sintéticos

	Cepa	Tipo	Posición	Fragmentos de secuencia
GRA6	RH	I	7-17, 41-47, 49-51, 93-95, 104-106, 143-145, 174-187, 198-230	HLRQKR NFC PV VRVAADSGG VKQ, SEA, PVL, PCK, TGRRS PQEPSGDGG , GGNEGRGYGGR GEGGAEDDRR PLHPERVNVFDY
GRA6	ME49	II	7-17, 41-47, 49-51, 93-95, 104-106, 143-145, 174-187, 198-224	YLRQKR NFC PL , VAVAAD SGG , VRQ, SDA, PAL, PSK, TGRRS PQEPSGGGG , GGNEGR ----GEGG-EDDRR PLHPG SVNEFD F
GRA6	C56	III	7-17, 41-47, 49-51, 93-95, 104-106, 143-145, 174-187, 198-230	HLRQKR NFC PL , VAVAAD SDG , VKQ, SDA, PVL, PSK, TGRRS PPEPSGDGG , RGNEGRGYGGR GEGGGEDDRR ALHPERVNVFDY
GRA7	RH	I	158-161, 166-173, 176-180, 200-205, 219-234	DRLV , EEQQRGDE , TTGQN , GLTRTY , PALEQ EV PESGEDGED
GRA7	Beverley	II	158-161, 166-173, 176-180, 200-205, 219-234	DRIL , EQQQTGEE , TTGQN , GLTRTY , PALEQ EV PESGKDGED
GRA7	C56	III	158-161, 166-173, 176-180, 200-205, 219-234	DRIL , EQQQTGDE , STGQN , GIKRTY , PAPEH EV PESGEDRED
SAG1	RH	I	193-197, 249-252, 262-266, 270-272, 296-300, 309-313	GADST , KL TE , D K GAT, KKE , TV KLE , KS AAG
SAG1	ME49, VEG	II/III	193-197, 249-252, 262-266, 270-272, 296-300, 309-313	GAN ST , KL SE , D N GAT, NKE , TV QLE , KS SAG

Los residuos de aminoácidos en rojo indican los SNPs en cepas tipo I, en azul para II y en verde para el tipo III.

6.7 Secuencias de péptidos sintéticos

En esta tesis se realizó el diseño *in silico* de 8 péptidos sintéticos polimórficos de las proteínas GRA6, GRA7 y SAG1 de *T. gondii*, para usarlos como antígenos en un ELISA indirecto que permitiera la discriminación entre los tres linajes clásicos (I, y III) por medio de anticuerpos presentes en sueros de seres humanos y animales. Los criterios para su selección fueron los siguientes: ser polimórficos entre los tres linajes, antigénicos, con epítomos para linfocitos tipo B e hidrofílicos. Algunas de las características de las secuencias de los péptidos se presentan en el **Cuadro 7**, donde se observan los polimorfismos entre los tres linajes para las proteínas contempladas para este estudio y la longitud de cada péptido. Las secuencias de los péptidos sintéticos con la secuencia de unión (letras en rojo), en colores y resaltado de color amarillo los aminoácidos polimórficos entre los tres linajes. Se agregó una cisteína en el extremo N-terminal de la secuencia, para mayor acoplamiento del péptido a la placa de ELISA.

Cuadro 5. Características de secuencias de péptidos sintéticos de *T. gondii*

Nombre	Secuencia	Número de SNPs entre cepas			
		Longitud	I/II	I/III	II/III
GRA6 I	CRSPQEPSGDGGNDggsgggsgsgGN GN EGR GYGGR GEGGAEDDRR PLHP ERVN VFDY	59	5	4	8
GRA6 II	CRSPQEPSG GG NDggsgggsgsgGN GN EGR----- ---- GEGG- EDDRR PLHP GSVNE FDF	53			
GRA6 III	CRSP PE PSGDGGNDggsgggsgsgGN GN EGR GYGGR GEGG G EDDRR ALHP ERVN VFDY	59			
GRA7 I	CDRLV EE EQ R GD ET TGQ N ggsgggsgsg GL TRTYggsgggsgsg PALE Q ES G ED G ED	58	6	10	8
GRA7 II	CDRIL EE QQ Q T G E ET TGQ N ggsgggsgsg GL TRTYggsgggsgsg PALE Q ES G KD G ED	58			
GRA7 III	CDRIL EE QQ Q T G DE ST GQ N ggsgggsgsg G IKRTY ggsgggsgsg PAPE H ES G ED R ED	58			
SAG1 I	CGAD S Tggsgggsgsg KL T E D K GAT K KEggsgggsgsg TV K LEggsgggsgsg K S A AG	58	6	6	
SAG1 II/III	CGAN S Tggsgggsgsg KL S E D N GAT N KEggsgggsgsg TV Q LEggsgggsgsg K S S AG	58			

Los residuos de aminoácidos en letras rojas indican los SNPs en las cepas tipo I, en azul las II y en verde las tipo III. Las minúsculas y en color azul corresponden a las secuencias de unión. Las letras en color rosa indican los aminoácidos que están presentes en las cepas tipo I y III de GRA6, y ausentes en las tipo II. En la región N-terminal de la secuencia se encuentra una Cisteína en color naranja.

6.8 Modelaje de la estructura tridimensional de péptidos sintéticos de *T. gondii*

6.8.1 Predicción de la estructura secundaria

La predicción se realizó con el servidor Psipred, el cual emite resultados gráficos; en la **Figura 23** se aprecia cada una de las secuencias de los péptidos sintéticos, indicando con diferente simbología la interpretación de la predicción.

Las barras azules indican la confianza de la predicción (Conf) de la estructura secundaria de cada aminoácido en función de los que están a su costado, las barras con mayor altura e intensidad en el color azul son resultados más confiables. Pred es el resultado representando en figuras, en líneas negras cuando corresponde a estructuras desordenadas (loop), los cilindros rosados son alfa hélices y las flechas amarillas representan beta plegadas. Las siguientes siglas también denominadas Pred se refieren a la estructura secundaria, identificadas con letras C= estructura desordenada, H= alfa hélices y E= beta plegadas estos resultados correlacionan con los gráficos. Las letras AA indican los aminoácidos de la secuencia blanco.

N-terminal un bucle incompleto hacia C-terminal. Entre estos dos modelos se observan características muy similares pero en diferente ubicación. GRA7 III presenta un bucle incompleto hacia la mitad de la secuencia, este modelo presenta dimorfismo estructural muy marcado con respecto los dos anteriores (**Figura 25**). Finalmente, el dimorfismo estructural predicho de SAG1-I vs II/III es muy evidente, ya que SAG1 I tiene en sus dos extremos un bucle completo de alfa hélice, y SAG1 II/III carece de ellos (**Figura 26**).

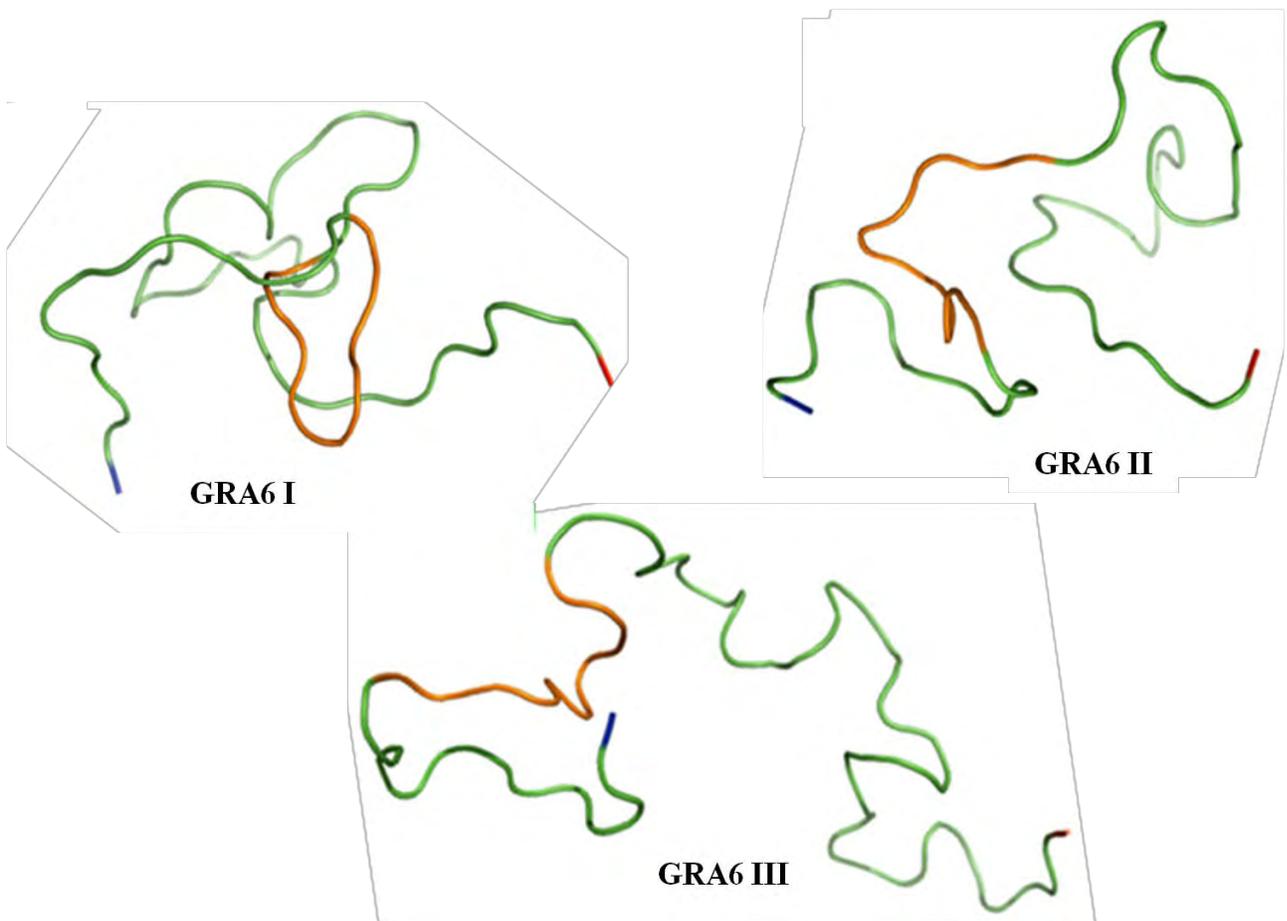


Figura 24. Estructura tridimensional de los péptidos de proteína de GRA6. En color azul se indica el extremo N-terminal, en rojo el C-terminal; la sección en amarillo corresponde a la secuencia espaciadora y la verde a las secuencias de los péptidos específicos.

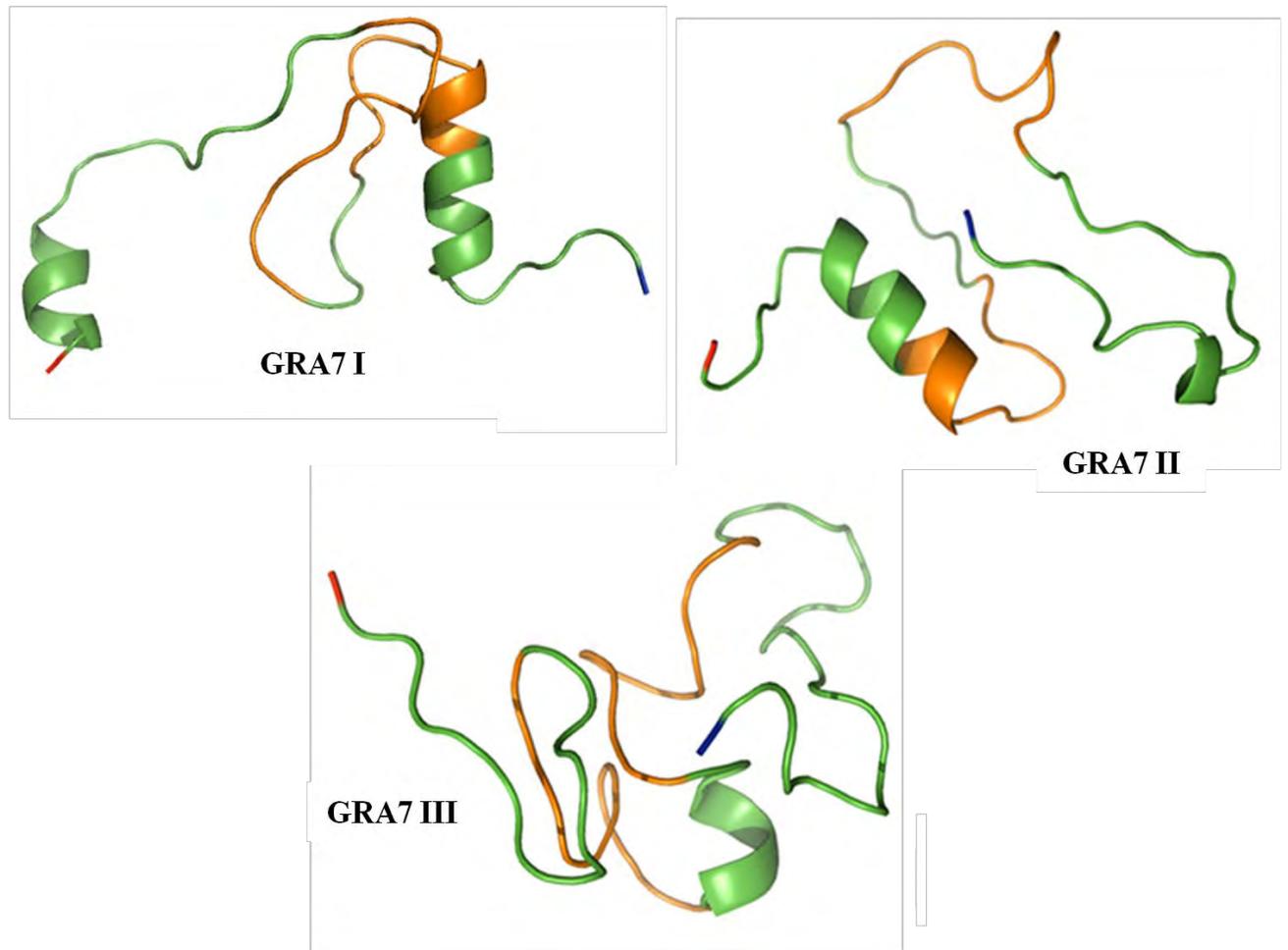


Figura 25. Estructura tridimensional de los péptidos de la proteína GRA7. En color azul se indica el extremo N-terminal, en rojo el C-terminal, la sección en amarillo corresponde a la secuencia espaciadora y verde a las secuencias de los péptidos.

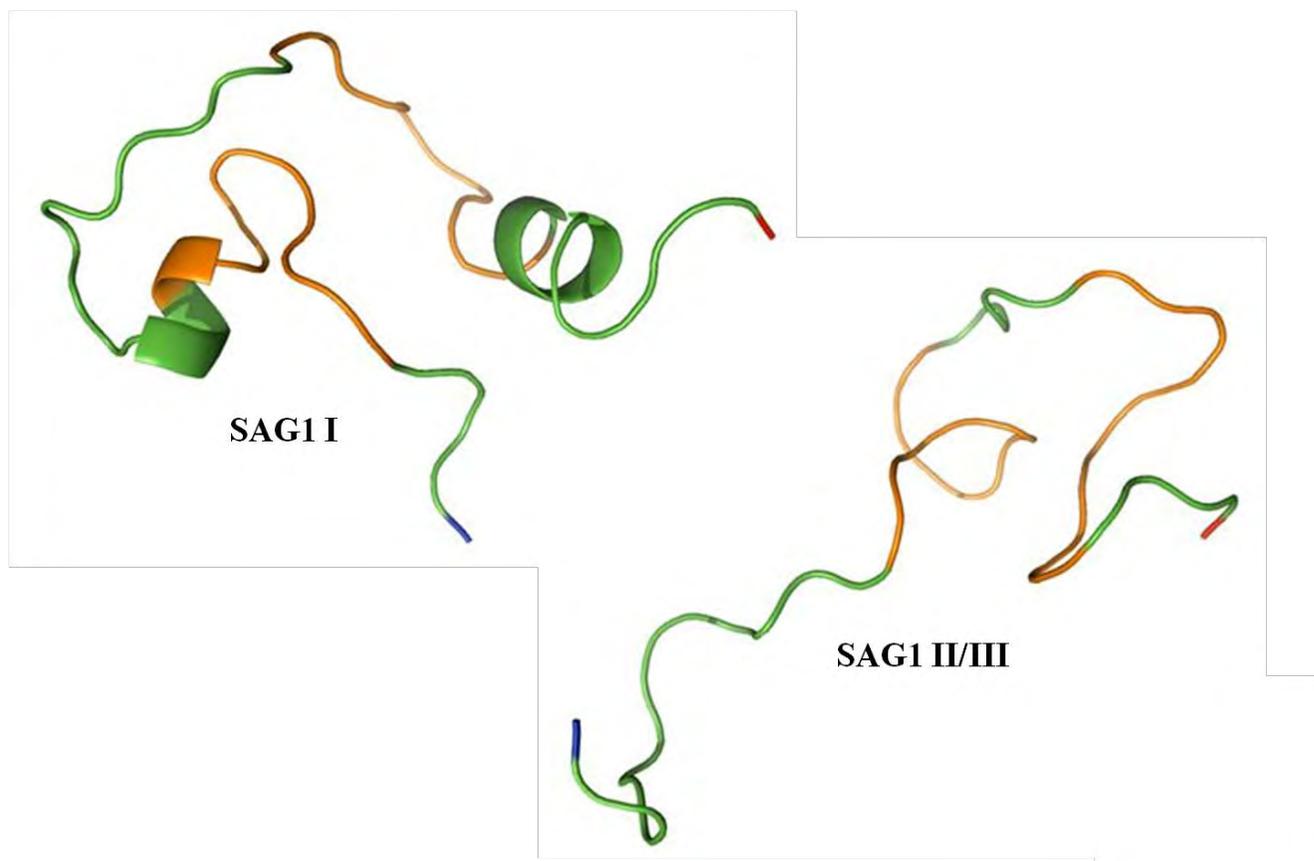


Figura 26. Estructura tridimensional de péptidos de proteína SAG1. En color azul se indica el extremo N-terminal, en rojo el C-terminal, la sección en amarillo corresponde a la secuencia espaciadora y verde a las secuencias de los péptidos.

6.9 Cinética de anticuerpos de tipo IgG de ratones inmunizados con extracto crudo de la cepa RH y ratones infectados con taquizoitos de la cepa ME49 y VEG de *T.gondii*

Se llevó a cabo la cinética de anticuerpos de tipo IgG mediante ELISAs indirecto, con sueros de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con extracto crudo de la cepa RH y de ratones infectados con taquizoitos vivos de las cepas ME49 y VEG de *T. gondii*.

En la **Figura 27-A**, se aprecia la cinética de los ratones inmunizados con extracto crudo, los ratones 3 y 5 fueron los que mejor reaccionaron a este procedimiento,

inclusive el ratón 3 al día 45 se aprecia que sigue incrementando la cantidad de IgG; los ratones 1 y 4 aunque si presentaron reacción inmunológica fue menor que los anteriores, el ratón 2 no logró inmunizarse correctamente. En la **Figura 27-B**, se presenta la cinética de IgGs de los ratones infectados con taquizoitos con la cepa tipo II (ME49), desde el día de infección se observa a producción de anticuerpos, con aumento al día 7 y 14 de los ratones 1 y 3 que fueron los que presentaron mayor respuesta, y al día 45 siguen incrementando la cantidad de IgG. En la **Figura 27-C**, se observa que tres de los ratones que fueron infectados con taquizoitos de la cepa VEG reaccionaron, sin embargo el ratón 5 al día 27 dejó de responder ya que se observa una disminución de anticuerpos, los ratones 1 y 3, fueron los elegidos para probarse en la serotipificación.

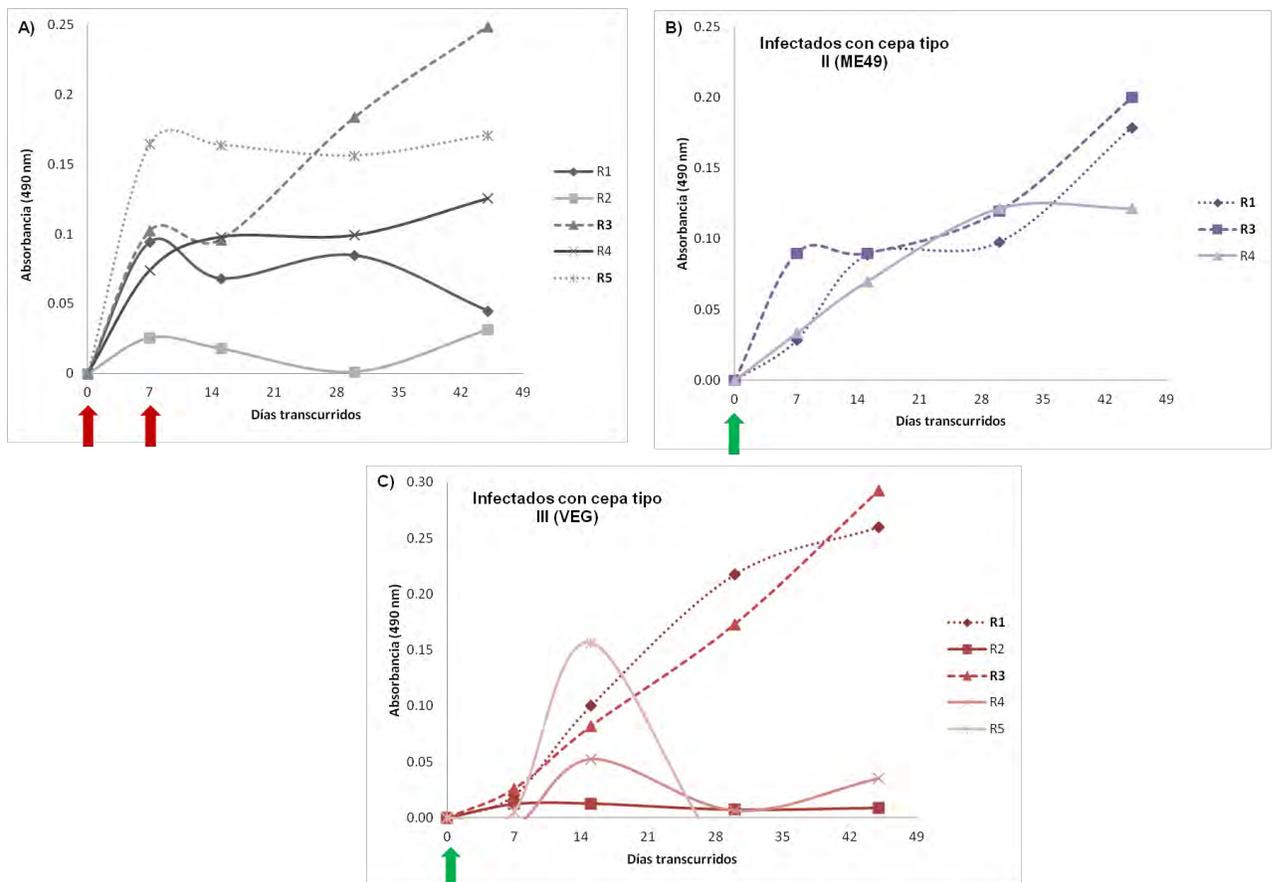


Figura 27. Cinética de anticuerpos de tipo IgG de ratones Balb/c. A) Inmunizados con extracto crudo, B) Infectados con taquizoitos de ME49 y C) VEG de *T. gondii*. Las flechas rojas indican los días en que se realizó la inmunización y en color verde la infección con taquizoitos. Las líneas discontinuas indican los sueros de ratones seleccionados para ser usados en ensayos posteriores.

6.10 Serotipificación en ratones positivos a la infección experimental de *T. gondii* con cepas I, II y III

Se emplearon los dos sueros de los ratones elegidos de mayor absorbancia de cada lote, con la finalidad de evidenciar la reacción de los péptidos sintéticos con los sueros que contienen anticuerpos específicos para cada tipo de cepa I (RH), II (ME49) o III (VEG), estos ensayos se realizaron con la finalidad de discriminar el serotipo para cada cepa de *T. gondii*.

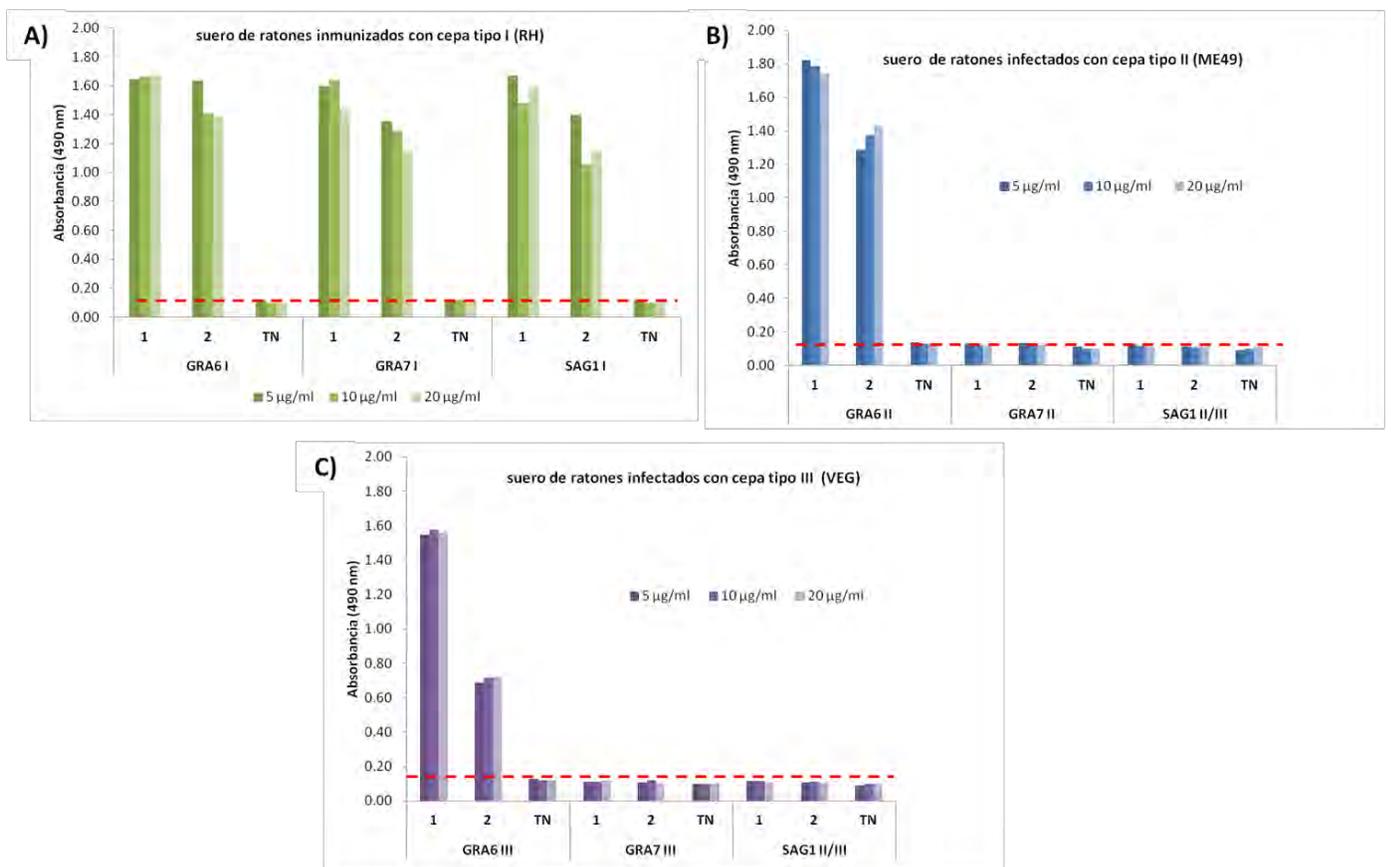


Figura 28. Discriminación serológica en sueros de ratones positivos a cepas clásicas de *T. gondii* con péptidos homólogos de A) GRA6, B) GRA7 y C) SAG1 con tres concentraciones. Cada una de las gráficas corresponde a un ELISA usando los sueros de los ratones anteriormente seleccionados, se gráfico el promedio de los sueros negativos (TN), aún así se indica con una línea roja punteada el punto de corte con 3SD.

En el **gráfico A** de la **Figura 28**, se aprecia la reacción antígeno anticuerpo sin variaciones importantes de la absorbancia de los dos sueros de ratones inmunizados con cepa tipo I (RH) a una dilución 1:100, con los péptidos GRA6, GRA7 y SAG1 tipo I a las tres concentraciones, además de buscar la concentración adecuada para estos péptidos se observa que los sueros reaccionan con los péptidos homólogos. En los **gráficos B y C** de la **Figura 28**, se muestran las reacciones de antígeno anticuerpo de los sueros de ratones infectados con taquizoitos de la cepa tipo II (ME49) y tipo III (VEG), con los péptidos GRA6, GRA7 y SAG1 tipo II y III, en las cuales se aprecia respuesta únicamente con el péptido GRA6 II y III, lo cual indica que la reacción homológica solo se presentó con el péptido de GRA6 y no para los otros péptidos.

Estos resultados no se esperaban, ya que se pretendía que cada tipo de suero de ratón con anticuerpos “específicos” de cada tipo de cepa reaccionará con su péptido homólogo.

En estos gráficos se aprecian diferencias en la respuesta inmunológica entre los ratones con los diferentes péptidos, lo que refleja la idiosincrasia en la respuesta inmunológica de cada ejemplar al mismo antígeno.

En todos los ensayos se utilizaron cinco sueros de ratones negativos (sin infección ni inmunización), pero con las mismas características de los desafiados, para evidenciar alguna reacción inespecífica. Con los sueros negativos se logró determinar puntos de corte para cada uno de los péptidos y de cada concentración, no se identificaron dichos puntos en las gráficas, porque son muy parecidos a los valores de las absorbancias que se observan en los testigos negativos, además de que visualmente se prestaría a confusión indicarlos en una misma gráfica. Con base en los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se decidió utilizar la concentración de 5 µg/ml para todos los péptidos sintéticos.

En la **Figura 29**, se evalúan los péptidos sintéticos de A) GRA6 para los tres linajes clásicos, con los sueros de los ratones inmunizados e infectados con todas las cepas y se aprecia que los péptidos GRA6 tipo I y III presentan reacción cruzada con todas las muestras, este resultado no era el esperado, se pretendía que la

interacción de cada suero fuese solamente con su péptido homólogo. El péptido GRA6 tipo II, logra discriminar entre los sueros tipo II de los tipo I y III; este resultado refleja poca especificidad de los péptidos de GRA6 tipo I y III.

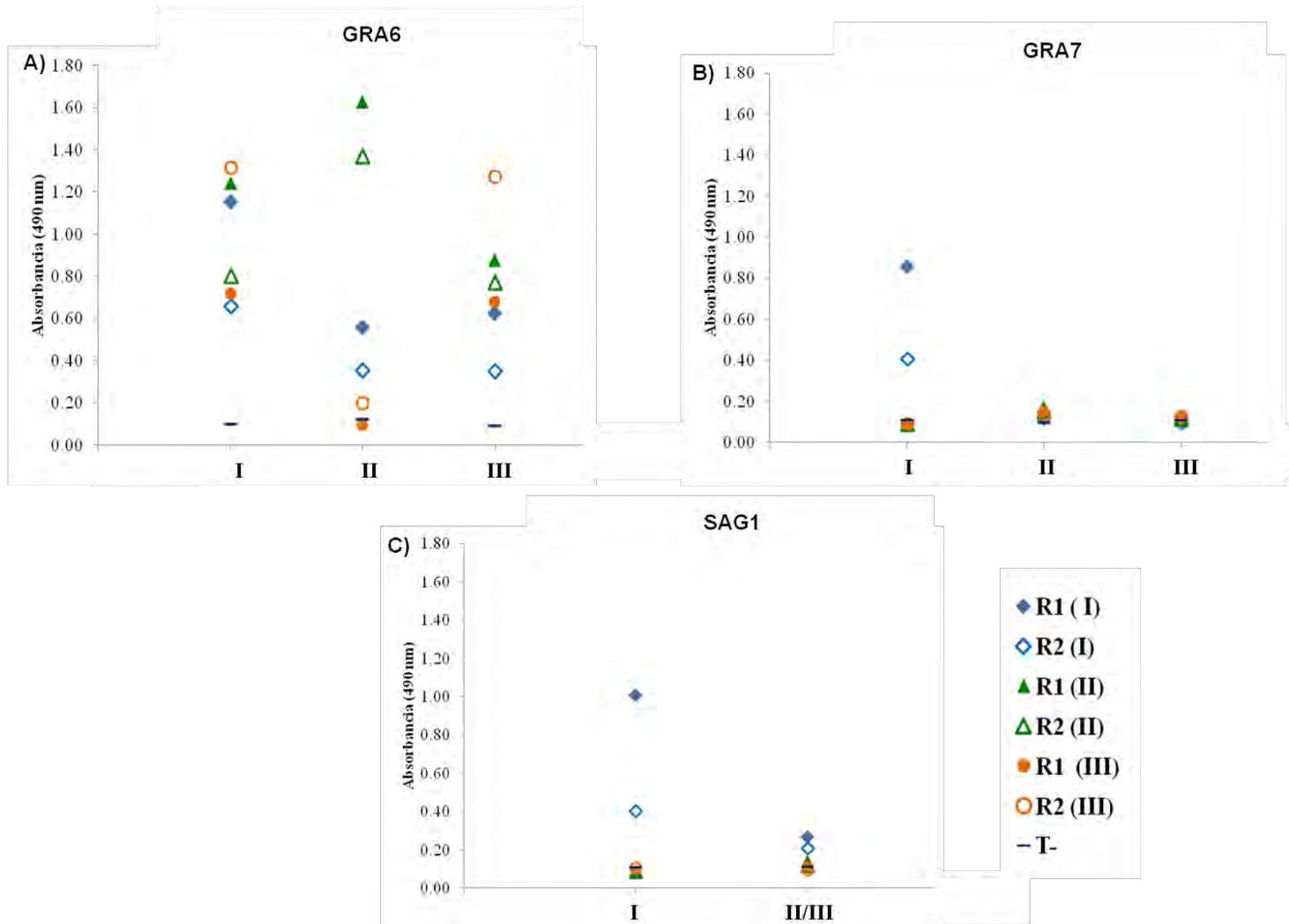


Figura 29. Discriminación serológica de cepas clásicas de *T.gondii* en suero de ratones con péptidos sintéticos de A) GRA6, B) GRA7 y C) SAG1 (5 µg/ml). Las muestras identificadas en color azul corresponden a los dos sueros de los ratones seleccionados como positivos (R1 y2) a la cepa tipo I (RH), así mismo los de color verde para la cepa tipo II (ME49) y amarillo para tipo III (VEG).” T- “se refiere al suero considerado como testigo negativo. PC corresponde al punto de corte determinado con 3SD.

En las **Figura 29-B y C**, se observa un resultado identificado con anterioridad; los péptidos GRA7 y SAG1 tipo II y III no evidencian reacción con los sueros homólogos, a diferencia de los péptidos tipo I, los cuales si interactúan con los sueros correspondientes. En resumen, los resultados que se han obtenido hasta el momento en sueros de ratones de laboratorio, son los siguientes: el péptido GRA6 tipo II discrimina sueros de ratones infectados con la cepa tipo II de los I y III. Los péptidos GRA6 I y III presentan reacción cruzada con todos los sueros. Los péptidos GRA7 y SAG1 tipo I, logran interactuar con los sueros homólogos, pero los tipos II y III no presentan evidencia de reacción.

6.11 Serotipificación de cepas de *T. gondii* en animales domésticos y silvestres

Se evaluaron tres sueros de animales positivos a la infección de *T. gondii*, de los cuales fue uno de perro, de gato y de oso negro, estas muestras habían sido genotipificadas en otros trabajos, como se mencionó en la metodología. Se utilizaron sueros de cinco animales para cada especie, sin evidencia de infección como testigos negativos del ensayo; a excepción del oso negro del que únicamente se contaba con la muestra positiva. Se calculó el punto de corte mediante el cálculo de la media más tres desviaciones estándar para los casos del perro y del gato. Cabe resaltar que el genotipo del perro con el gen *GRA6* (344 pb), fue tipo I y II; así mismo el gato fue tipo I y el oso negro “atípico”.

En la **Figura 30** se muestran los gráficos de la interacción de los sueros del perro con los péptidos GRA6 (A), GRA7 (B) y SAG1 (C). Los resultados observados son: la muestra del perro es positiva para los péptidos GRA6 I y III, para todos los péptidos de GRA7 y SAG1 aunque con mayor absorbancia para GRA7 II y SAG1 I. En general se observa mayor reacción con los péptidos de GRA6. El resultado con GRA6 pudiera ser compatible con el genotipo para esta muestra.

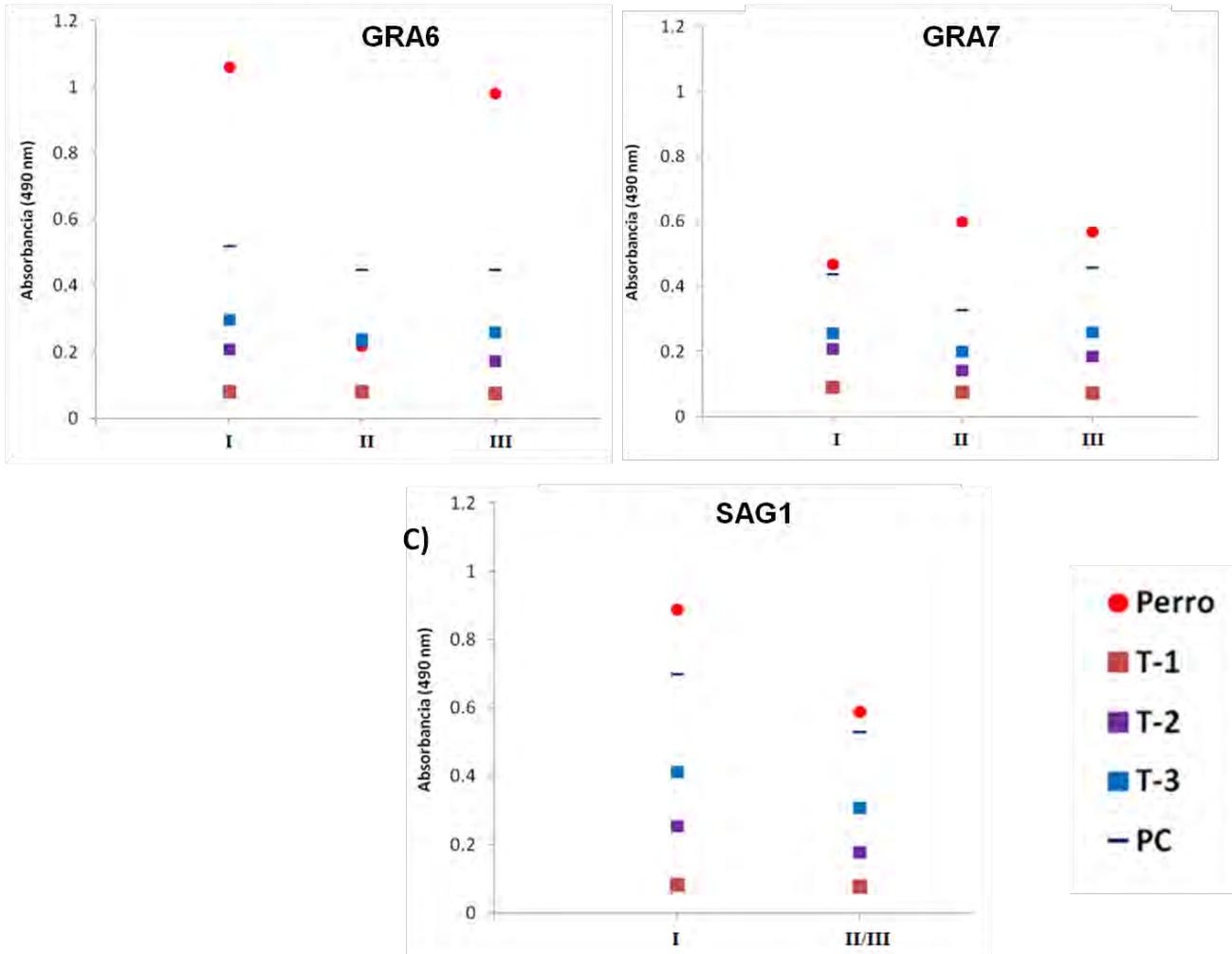


Figura 30. Discriminación serológica de cepas clásicas de *T. gondii* en suero de perros con péptidos sintéticos de A) GRA6, B) GRA7 y C) SAG1 (5 µg/ml). La muestra identificada con un círculo de color rojo corresponde al suero del perro positivo a la infección, los cuadros de colores corresponden a los sueros negativos (T-1 al T-3) y la línea en color azul indica el punto de corte (PC) con 3SD.

En la **Figura 31** se presenta el gráfico de la reactividad del suero del gato con los péptidos A) GRA6, B) GRA7 y C) SAG1. La muestra solo es positiva para los péptidos de GRA6 con mayor absorbancia para el tipo II posteriormente para tipo I y por ultimo para III. Este resultado no correlaciona con el genotipo.

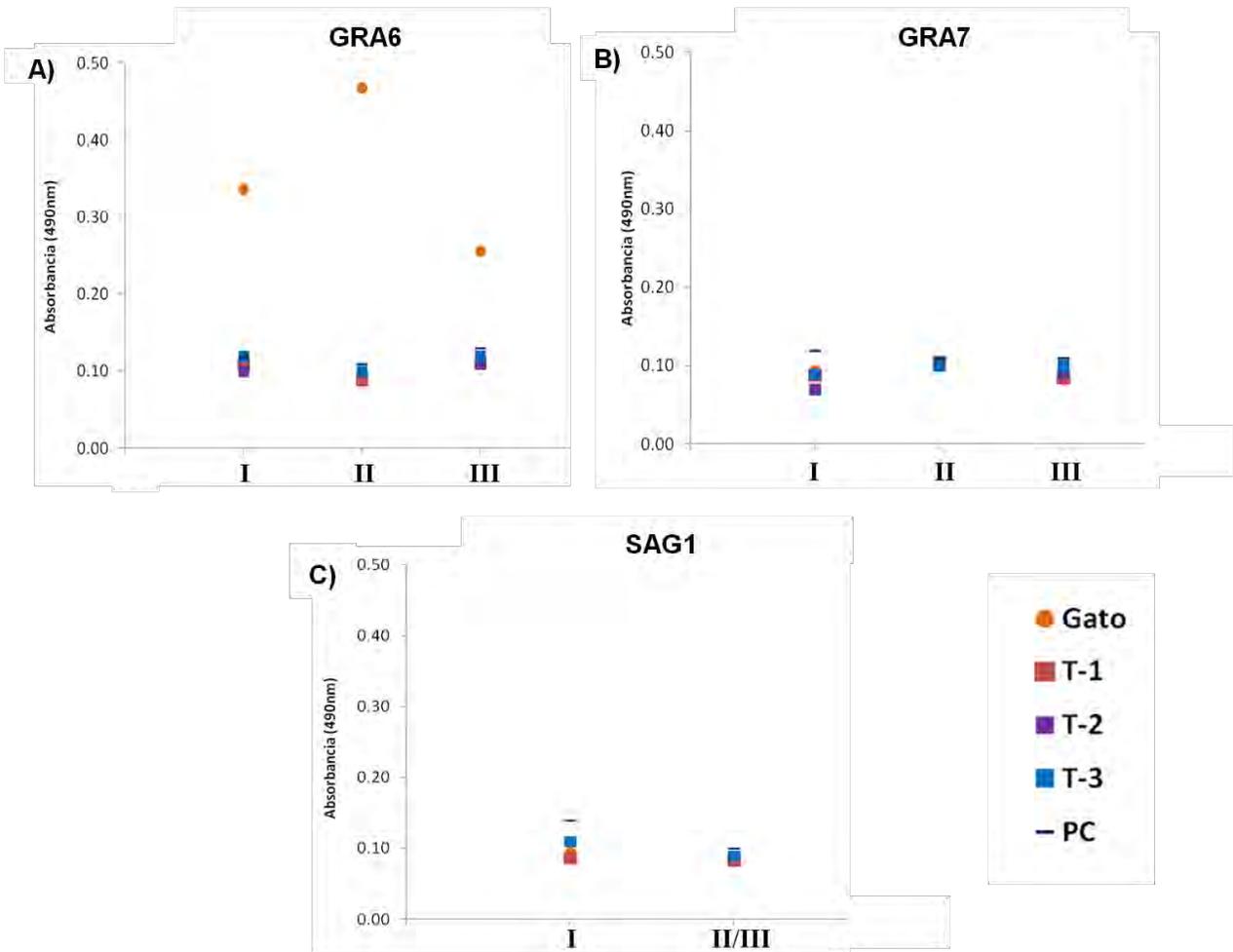


Figura 31. Discriminación serológica de cepas clásicas de *T. gondii* en suero de gatos con péptidos sintéticos de GRA6 I, II y III (5 µg/ml). La muestra identificada con un círculo de color naranja corresponde al suero del gato positivo a la infección, los cuadros de colores corresponden a los sueros negativos (T-1 al T-3), y la línea en color azul indica el punto de corte (PC) con 3SD.

En la **Figura 32**, se aprecian tres gráficos que muestran el patrón serológico de la muestra del oso negro con los péptidos sintéticos A) GRA6, B) GRA7 I, II y III, y C) SAG1 I y II/III; los resultados a continuación mencionados se deben considerar con cautela, ya que al evaluar una sola muestra de esta especie, no es representativa; sin embargo se decidió visualizar lo encontrado, porque se observan respuestas diferentes a cada péptido, incluso se hay mayor reacción con los péptidos de GRA6 que con los de GRA7 y no con SAG1.

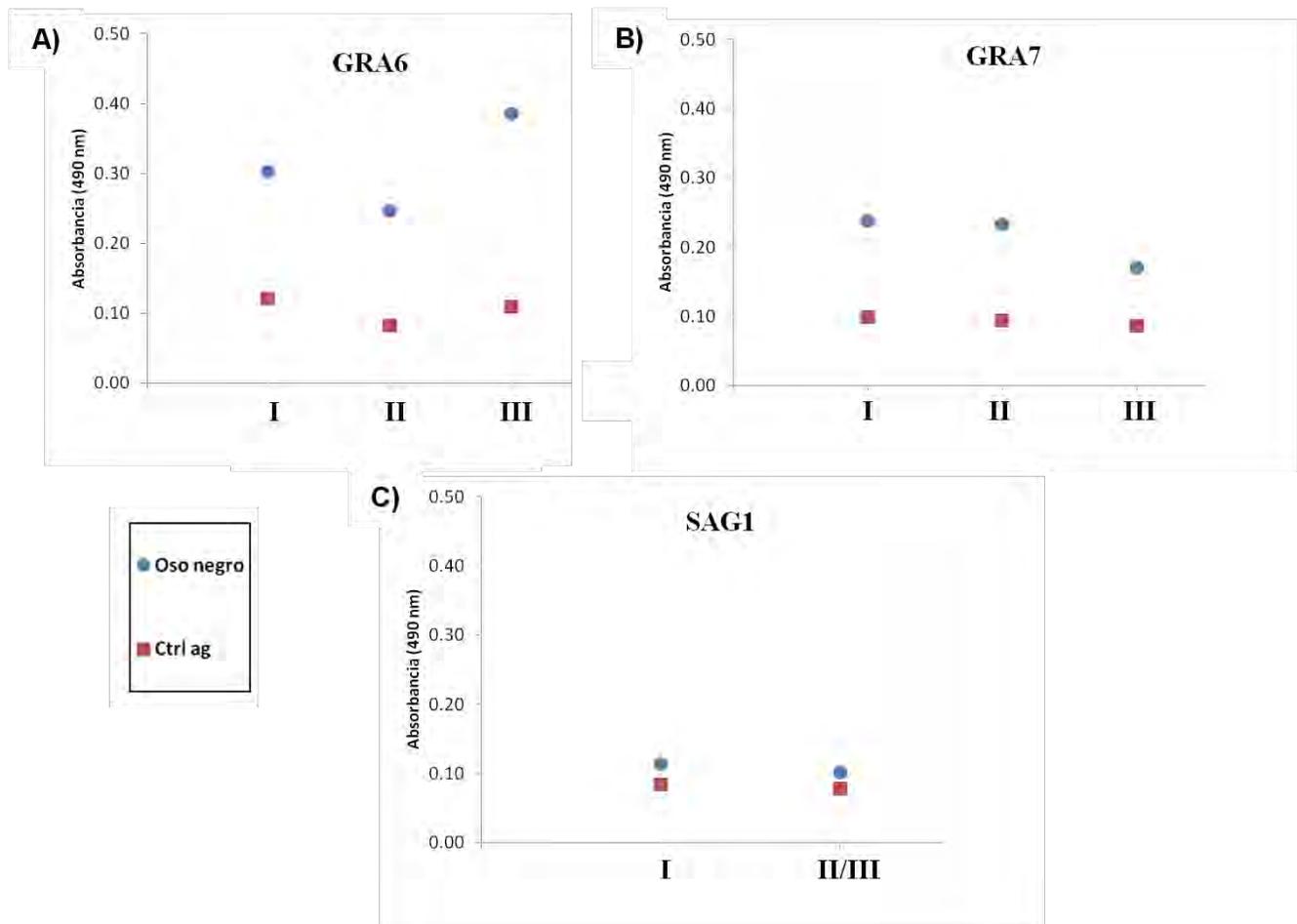


Figura 32. Discriminación serológica de cepas clásicas de *T. gondii* en un suero de oso negro con los péptidos sintéticos de A) GRA6, B) GRA7 I, II y III y C) SAG1 I, II/III (5 µg/ml). La muestra identificada con un círculo de color azul corresponde al suero del oso negro positivo a la infección, el cuadro de color rojo es el testigo de antígeno, ya que no se contaba con sueros negativos de la misma especie.

6.12 Serotipificación de *T. gondii* en seres humanos

Se procesaron dos muestras de mujeres con sus respectivos neonatos (1, 1.1, 3, 3.1), un suero de una mujer gestante (2) y otra de un neonato (4), para estas dos últimas muestras no se logró tener la muestra pareada. De todos estos casos ya se tenía previo conocimiento del genotipo con genes diferentes a los que dan origen a las proteínas usadas en este trabajo, esta información no permite en su totalidad relacionar los resultados emitidos por la serotipificación y la genotipificación. En la

Figura 33 se presenta la reactividad de las muestras de los seres humanos con los péptidos sintéticos de GRA6 I, II y III. En todos estos gráficos se presentan los datos con el cálculo del punto de corte mediante 2SD (A) y con el índice de reactividad (IR) (B) él cuál nos permite mejorar la interpretación de los resultados, disminuyendo el ruido de fondo de la reacción. El binomio madre/hijo (3,3.1) son positivos para GRA6 I y III, pero con mayor absorbancia para el tipo III, se observa que hay mayor distancia con respecto a los negativos.

GRA6

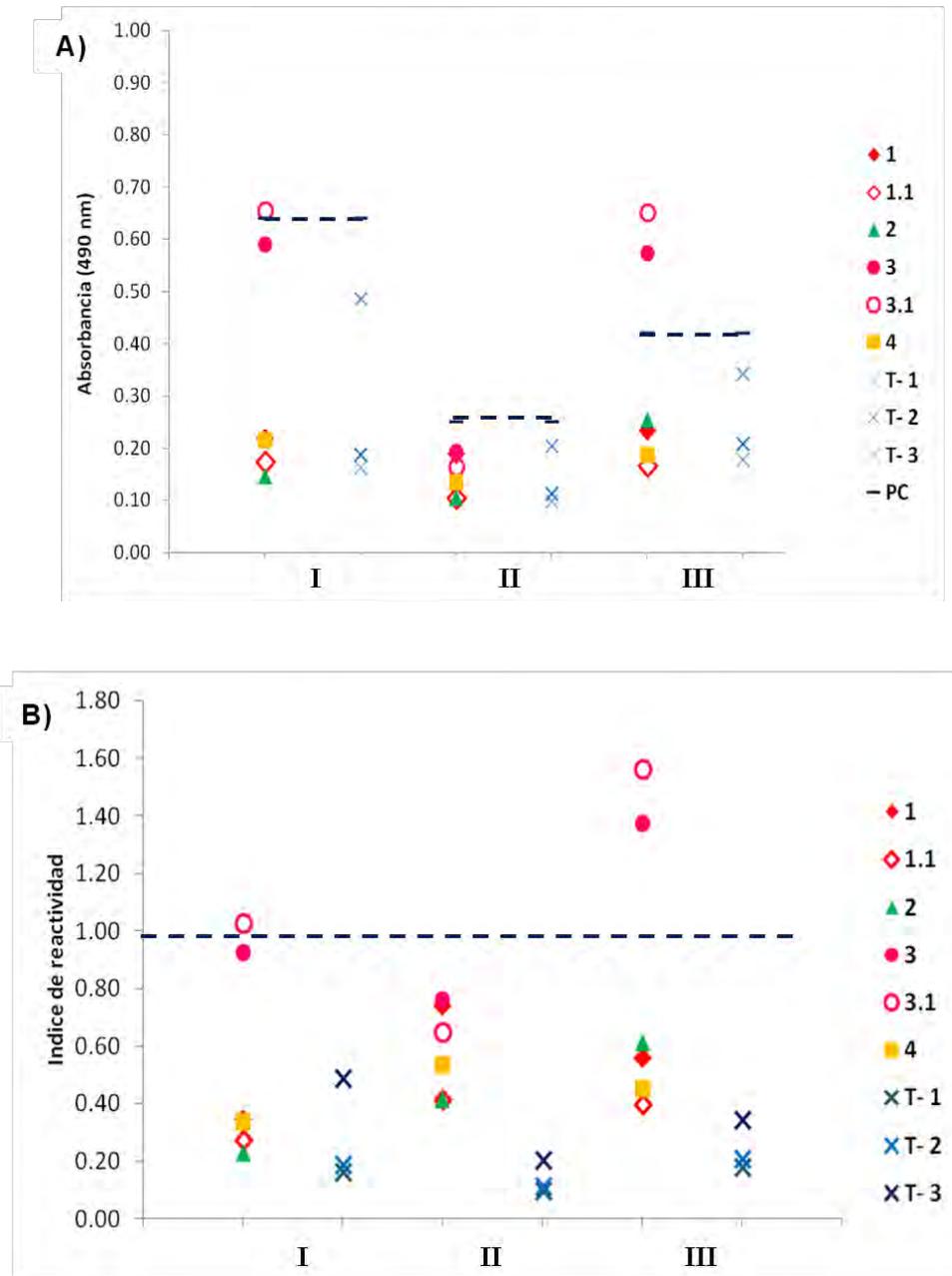


Figura 33. Discriminación serológica de cepas clásicas de *T. gondii* en sueros de seres humanos con péptidos sintéticos de GRA6 (5 µg/ml). Los binomios madre/hijo fueron identificados con la misma figura pero con diferencia de relleno de color, la madre y el neonato están marcadas con el triángulo verde y cuadrado amarillo respectivamente. Los testigos negativos corresponden a las cruces en diferentes tonos de azul. En el gráfico A se muestra el punto de corte (PC) mediante el cálculo de la media con 2SD y en el B la línea punteada indica el índice de reactividad (IR) a partir del cual se considera una muestra positiva (1.0).

GRA7

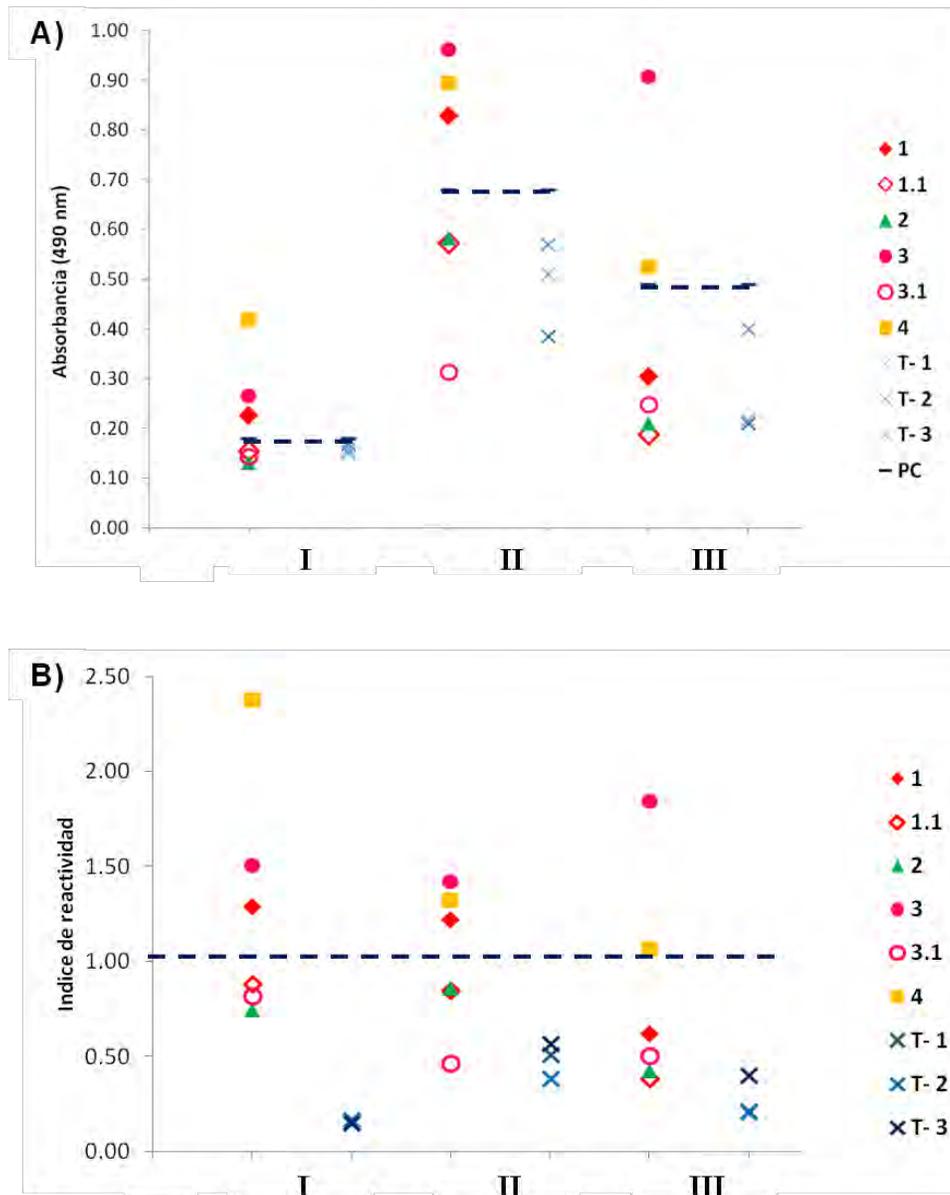


Figura 34. Discriminación serológica de cepas clásicas de *T. gondii* en sueros de seres humanos con péptidos sintéticos de GRA7. Los binomios madre/hijo fueron identificados con la misma figura pero con diferencia de relleno de color, la madre y el neonato están marcadas con el triángulo verde y cuadrado amarillo respectivamente. Los testigos negativos corresponden a las cruces en diferentes tonos de azul. En el gráfico A se muestra el punto de corte (PC) mediante el cálculo de la media con 2SD y en el B la línea punteada indica el índice de reactividad (IR) a partir del cual se considera una muestra positiva (1.0).

En la **Figura 34** se aprecia la respuesta serológica de las muestras con los péptidos sintéticos tipo I, II y III de GRA7. En la gráfica A, se aprecia respuesta heterogénea con los tres péptidos de las muestras 1,3 y 4, con mayor absorbancia de fondo con el péptido tipo II, en el gráfico B la reacción inespecífica de fondo se normaliza, y los resultados que aparentemente eran mayores con el péptido tipo II disminuyen, haciendo que haya una mejor visualización, la muestra 1 es positiva muy cercana al 1.0 IR con GRA7 I y II, la madre del segundo binomio (3) reacciona para los tres péptidos, sin embargo se parecía mayor absorbancia y distancia con respecto a los negativos con el péptido tipo III y finalmente del neonato (4) es positiva al péptido II y al I en el cuál es apreciable su mayor respuesta. La muestra 1 reacciona con mayor intensidad con GRA7 II y posteriormente con GRA7 I y III, su binomio (1.1) y la muestra 2 solo reaccionó para GRA7 II; la muestra 3 reaccionó intensamente con el péptido GRA7 III posteriormente con GRA7 II y I, su binomio (3.1) solo reaccionó con el péptido GRA7 III; la muestra 4 presento reacción homogénea con el péptido GRA7 I y III, y con menor absorbancia para GRA7 II.

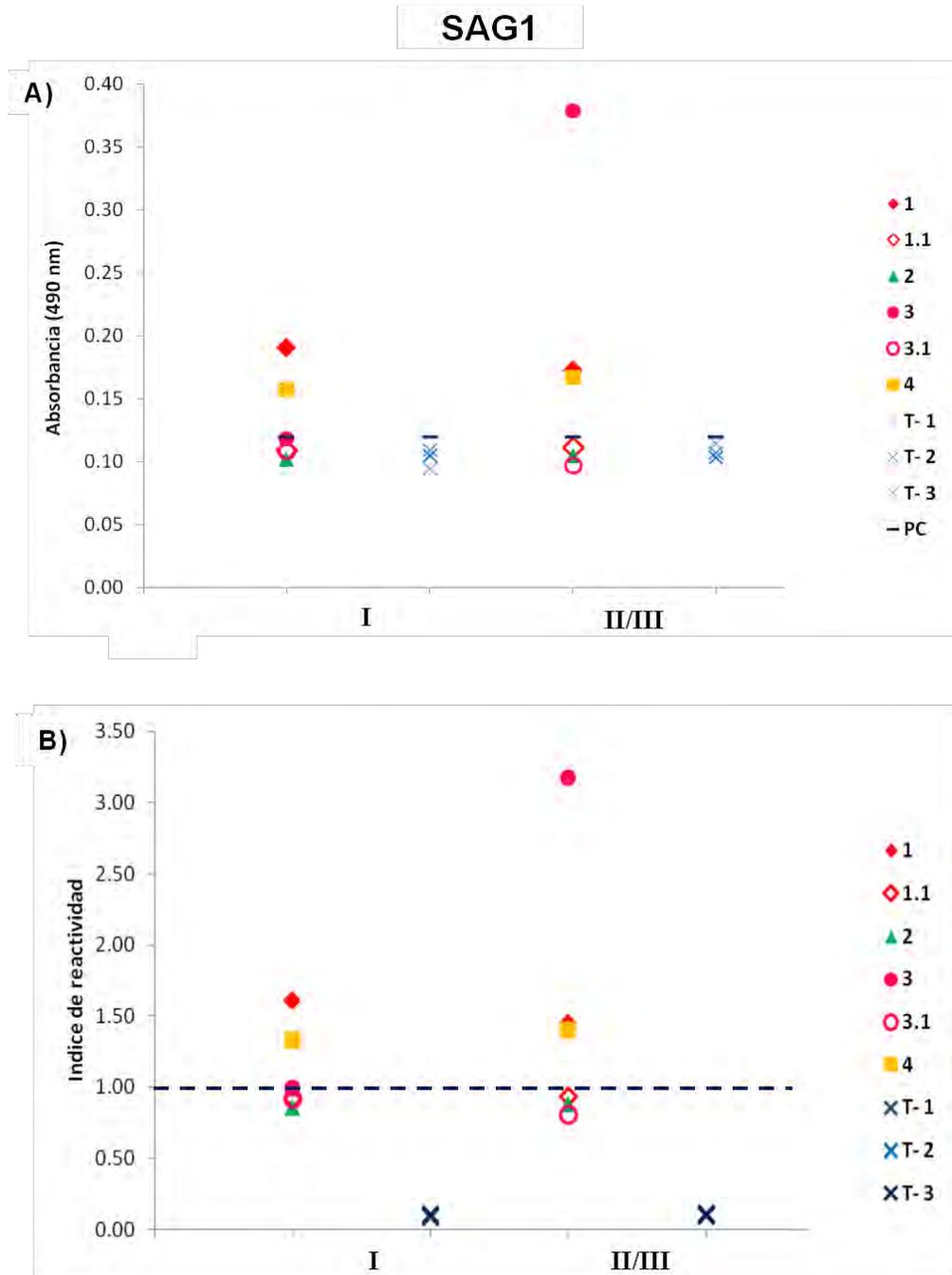


Figura 35. Discriminación serológica de cepas clásicas de *T. gondii* en sueros de seres humanos con péptidos sintéticos de SAG1. Los binomios madre/hijo fueron identificados con la misma figura pero con diferencia de relleno de color, la madre y el neonato están marcadas con el triángulo verde y cuadrado amarillo respectivamente. Los testigos negativos corresponden a las cruces en diferentes tonos de azul. En el gráfico A se muestra el punto de corte (PC) mediante el cálculo de la media más 2SD y en el B la línea punteada indica el índice de reactividad (IR) a partir del cual se considera una muestra positiva (1.0).

En la **Figura 35** se aprecia el patrón de reactividad serológica con los péptidos SAG1 tipo I y II/III. La muestra 1 y 4 presentan un patrón semejante reaccionando con ambos péptidos, sin embargo es mínima la distancia que hay entre los sueros negativos al respecto de ellos, a diferencia de la muestra 3 que es positiva al péptido tipo II/III, estos resultados son similares en el gráfico B, con estas observaciones se puede concluir que la única muestra positiva fue la tres.

7. Discusión

La mayoría de los estudios en los cuales se caracteriza genéticamente a *Toxoplasma gondii* se han basado en técnicas dependientes de DNA, proveniente de aislamientos o de muestras de tejido de pacientes, generalmente con signos clínicos, o de animales que deben ser eutanasiados para ello; la cantidad de DNA del parásito comúnmente es insuficiente, ya que viene mezclado con el del huésped. Por otro lado, el aislamiento en ratones de laboratorio podría favorecer el desarrollo de clonas específicas y disminuir la probabilidad de identificar infecciones mixtas. Por estas razones la serotipificación en la cual se emplean péptidos sintéticos específicos de tipo de *T. gondii*, es una técnica que podría funcionar adecuadamente para caracterizar los genotipos de este parásito, usando únicamente una muestra de suero Aunque ya se han realizado algunos estudios al respecto, no han sido concluyentes, por la presencia de reacciones cruzadas entre los péptidos utilizados. El objetivo de esta tesis fue desarrollar una prueba de serotipificación para la detección de linajes clásicos I, II y III de *T. gondii* en humanos, animales domésticos y silvestres, proponiendo nuevos diseños de péptidos sintéticos basándonos en las proteínas GRA6 y GRA7 utilizadas por otros grupos anteriormente, y añadir péptidos de SAG1, que es un antígeno inmunodominante.

Los resultados obtenidos con los péptidos provenientes de la proteína GRA6 son prometedores, pues usando el péptido tipo II con los sueros de ratones, se pueden diferenciar las infecciones con los parásitos tipo II de aquellas con los tipos I o III, aunque no se logró diferenciar entre éstas últimas. Los resultados obtenidos con los sueros de uno de los binomios madre/hijo (3) y el del perro, sustentan esta

diferenciación, pues reaccionaron con un patrón inverso, esto es, con los péptidos tipo I y III y no con el tipo II. Cabe resaltar que en el caso del gato se observó reacción con todos los péptidos, por lo que esta diferenciación quizá no sea aplicable a cualquier especie de huésped, o bien, se requiere afinar las condiciones de los reactivos en el ensayo, para favorecer reacciones de alta especificidad.

El genotipo de *T. gondii* que infectó al binomio madre/hijo 3 fue I con alelos extra (posiblemente atípico, pero ligado al genotipo I), lo cual concuerda con la reacción serológica a los péptidos I y III. En contraste, no se encontró concordancia entre el serotipo y el genotipo del gen *GRA6* en el caso del perro. Vale la pena resaltar que la genotipificación llevada a cabo tuvo como blanco un segmento inicial de la región codificante del gen, lo que podría explicar esta discrepancia. Es importante genotipificar la región correspondiente a las zonas polimórficas contempladas para los péptidos antes de sacar conclusiones al respecto.

Los resultados de este trabajo son similares a los de otros autores (Kong *et al* 2003; Vaudaux *et al*, 2011; Xiao *et al*, 2010). Es interesante destacar que los péptidos tienen en común el segmento de la región C-terminal, el cual es idéntico entre las cepas I y III ($_{220}$ LHP**ERVNV**FDY $_{230}$) y tiene tres SNPs con respecto a las tipo II ($_{214}$ LHP**G**SVNEFDY $_{224}$). En el diseño de los péptidos del presente trabajo, se emplearon estos segmentos y además otros cambios, que se pretendía que permitieran diferenciar entre cepas tipo I y III; en este sentido cabe resaltar que el suero de la madre del binomio 3 reaccionó con mayor absorbancia (en relación al punto de corte) con el péptido tipo III que con el tipo I, lo cual se puso en evidencia cuando se calculó el índice de reactividad, para normalizar el fondo de la reacción **(Figura 33)**.

Cuadro 6. Péptidos sintéticos de GRA6 de *T. gondii* reportados en la literatura

Tipo de cepa	Secuencia de aminoácidos de péptidos basados en GRA6 de <i>T. gondii</i>	Referencia
I	220-LHPERVNVFDY-230	Kong <i>et al</i> , 2003; Vaudaux <i>et al</i> , 2010
	207-GRGEGGAEDDRRPLHPERVNVFDY-230	
	220-LHPERVNVFDY-230	Sousa <i>et al</i> 2008; 2009;2010
	171-RRTGRRSPQEPSGDGGGND AGNNA GNGGNEGRGYGGRGEGGAEDDRRPLHPERVNVFDY-230	Peyron <i>et al</i> , 2006
	176-RSPQEPSGDGGGND gsgsgsgsgGNGGNEGRGYGGRGEGGAEDDRRPLHPERVNVFDY-230	En este estudio
II	214-LHPGSVNEFD-224	Kong <i>et al</i> , 2003; Vaudaux <i>et al</i> , 2010
	201-G EDDRRPLHPGSVNEFD-224	
	214-LHPGSVNEFD-224	Sousa <i>et al</i> 2008; 2009;2010
	171-RRTGRRSPQEPSGGGG ND AGNNA GNGGNEGRG---- GEGG-EDDRRPLHPGSVNEFD-224	Peyron <i>et al</i> , 2006
	176-RSPQEPSGGGG ND gsgsgsgsgGNGGNEGR----- GEGG-EDDRRPLHPGSVNEFD-224	En este estudio
III	220-LHPERVNVFDY-230	Kong <i>et al</i> , 2003; Vaudaux <i>et al</i> , 2010
	207-DRGEGGEDDARPLHPERVNVFDY-230	
	171-RRTGRRSPPEPSGDGGG ND AGNNA GNGGNEGRGYGDRGEGGAGDRRALHPERVNVFDY-230	Peyron <i>et al</i> , 2006
	176-RSPPEPSGDGGG ND gsgsgsgsgGNRGNEGRGYGGRGEGGEDDARALHPERVNVFDY-230	En este estudio

NOTA: Los residuos de aminoácidos en color verde indican el fragmento común en las secuencias de los péptidos, en color rosa los residuos que se encuentran en las cepas tipo I y III, ausentes en la tipo II, que se indican con guiones, en minúsculas y azul los residuos que corresponden a la secuencia de unión y por último en rojo se marcan los SNPs entre las tres cepas.

Los modelos tridimensionales hipotéticos de los tres péptidos de la proteína GRA6 son similares entre sí, aunque el tipo II tiene una delección de 5 aminoácidos conservados (₂₀₄Gly,Tyr,Gly,Gly, Arg₂₀₈) los cuales están presentes en las cepas tipo I y III. La segunda delección es de un aminoácido, que difiere entre las cepas tipo I (₂₁₃ Ala) y las tipo III (₂₁₃ Gly), si bien los aminoácidos son del mismo grupo químico (hidrofóbicos) por lo que no es un cambio significativo. El fragmento 204-208 podría ser un epítipo inmunogénico que esté provocando la reacción cruzada entre las cepas tipo I y III; su eliminación podría mejorar la discriminación entre infecciones ocasionadas por estos dos tipos de parásitos; lo anterior se sugiere porque los otros SNPs seleccionados para este estudio son significativos, es decir, codifican para aminoácidos de características físico-químicas distintas, las cepas tipo I tienen los residuos:

Gln₁₈₀, Gly₁₉₈, Ala₂₁₃, Pro₂₂₀, mientras que las tipo III tienen: Pro₁₈₀, Arg₁₉₈, Gly₂₁₃, Ala₂₂₀.

Los sueros de los ratones que fueron infectados con parásitos de las cepas tipo II y III, no tuvieron reacción ni siquiera con los péptidos homólogos de GRA7 y SAG1,

mientras que los ratones inmunizados con la cepa tipo I reaccionaron con los péptidos homólogos y no con los heterólogos II y III. Estos resultados llevan a plantear dos sugerencias: la presentación de estos antígenos cuando están solubilizados es más rápida o eficaz que cuando se encuentran en su conformación o localización natural en el protozoario. Cabe resaltar que SAG1 es una proteína que se encuentra en la superficie del taquizoito, no es intramembranal y es muy inmunodominante (Grimwood y Smith, 1992; Graille *et al*, 2005); además, los péptidos diseñados para esta proteína fueron localizados en uno de los dominios que la conforman y se encuentran expuestos en la superficie y teóricamente son antigénicos (**Figura 36**). Sin embargo, se encuentran de cara a la membrana plasmática del protozoario, por lo que quizá resulte estéricamente menos probable su detección por el Receptor del Linfocito B (BCR) que cuando está soluble, como en el extracto crudo; dado que la entrada del parásito a la célula blanco es en segundos, probablemente se requiera mucho más ciclos de invasión y replicación para que los ratones reaccionen a los epítomos seleccionados; en este sentido cabe resaltar que las infecciones eran de 45 días cuando se tomaron los sueros para los ensayos presentados aquí, y el nivel de anticuerpos seguía aumentando (**Figura 27**). Otras explicaciones incluyen que estos péptidos no sean lo suficientemente inmunogénicos en comparación con otras partes de la proteína o que al eliminar otras regiones de la proteína completa pierdan inmunogenicidad por cuestiones alostéricas.

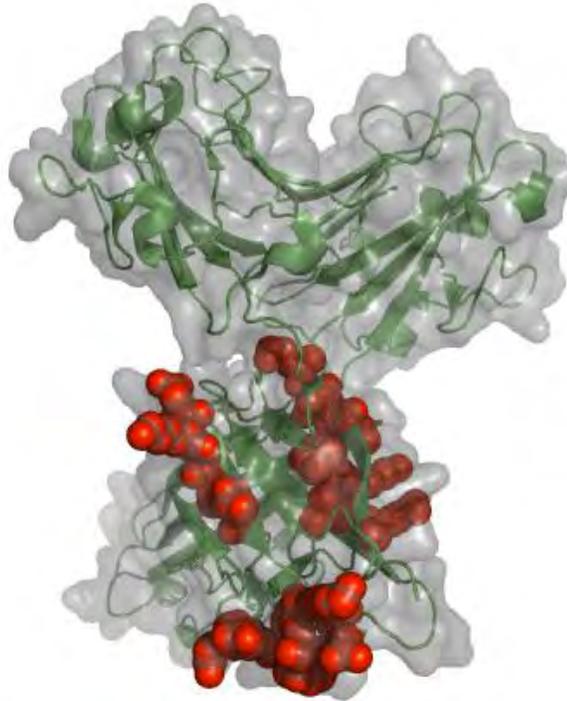


Figura 36. Estructura cristalográfica de SAG1 (código PDB 1KZQ). Se muestra la estructura de la proteína en forma de asas y listones en color verde, la superficie de la proteína en gris y los residuos de aminoácidos que corresponden al péptido sintético en rojo. Estructura modelada en Pymol.

Los resultados encontrados con GRA6 podría deberse a que los péptidos que se escogieron sean parte de la región más antigénica de la proteína nativa o bien que están más accesibles para los BCRs una vez que el parásito egresa. A pesar de que, como GRA7, se localiza dentro de la vacuola parasitófora, GRA6 está en la red fibrilar que sostiene al protozooario (más hidrofílica) y la primera parece tener una porción dentro de la membrana de la vacuola, por lo que estaría menos accesible. Quedan muchas preguntas que resolver en este sentido, pero probar los sueros con las proteínas puras y completas, así como usar muestras de infecciones crónicas en ratones son acciones a seguir.

A pesar de que el gato fue negativo para todos los péptidos de GRA7 y SAG1, el perro y algunos seres humanos fueron positivos, aunque con reacción cruzada entre los péptidos. En el caso de los seres humanos, se observó reacción de fondo variable, haciendo difícil la interpretación; con la finalidad de disminuir esto, se

calculó el índice de reactividad (IR) para cada muestra, lo cual mejoró la comparación.

Los resultados obtenidos con los péptidos de la proteína GRA7 han sido igualmente heterogéneos, de acuerdo a otros autores, Sousa *et al*, (2009 y 2010), quienes no obtuvieron reacción de los péptidos I y III de GRA7 con sueros de pacientes que se encontraban infectados con genotipos homólogos; sin embargo, observaron reacciones cruzadas con estos péptidos usando sueros de seres humanos infectados con parásitos de cepas atípicas. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo son similares a estos reportes, ya que la cepa infectante de la madre del segundo binomio (3) es genotipo I con alelos extra (Rico-Torres *et al*, 2012), y se obtuvo mayor respuesta para los tipo I y III, lo que sugiere que se podría tratar de una cepa atípica. El neonato 4 (**Figura 34**) reaccionó aparentemente con mayor absorbancia para el péptido tipo I de GRA7; esta muestra corresponde a un genotipo I “clásico” (**Figura 35**), lo que sugiere que con mayor refinamiento de la técnica se podría diferenciar entre cepas atípicas y clásicas. Hay que hacer notar que el reconocimiento preferencial de péptidos tipo III por sueros de humanos y animales infectados con cepas atípicas ya se ha reportado (Sousa *et al*, 2008, 2010; Marsimon *et al*, 2013). Los sueros de borregos, cerdos y pollos no reconocieron el péptido tipo III, lo que sugiere que hay diferencias importantes en el patrón de respuesta entre especies. En este trabajo mencionan que las reacciones cruzadas podrían deberse a infecciones mixtas o superinfecciones, lo cual ya ha sido demostrado a través de genotipificación (Pam Shuting *et al*, 2012).

Marksomov *et al*, (2013) refieren que la baja especificidad de los péptidos podría explicarse por una fuerte respuesta inmune contra los fragmentos conservados de las proteínas. Otros autores como Liu *et al*, (2012) creen que puede deberse a la presencia de más de un parásito Apicomplexa y por ello recomiendan incluir sueros positivos a otros parásitos del mismo Phylum dentro del panel de muestras a evaluar.

Xiao *et al*, (2009) lograron diferenciar cepas tipo I de III con péptidos de GRA7 en ratones y seres humanos, además de correlacionar el serotipo con el genotipo, e

incluso detectaron relación de cepas tipo I con desarrollo de secuelas, reflejadas en forma de esquizofrenia, en casos de infección congénita. Los péptidos que ellos usaron son similares en la región ²¹⁸-PALEQESGEDGED-²³³ a los de Sousa *et al*, 2009 y 2010, y a los de esta tesis, como se puede ver en el **Cuadro 8**, con la diferencia de que ellos incluyen una región conservada de 12 residuos de aminoácidos (²⁰⁶RHFSPRKNRSRQ²¹⁷).

Cuadro 7. Péptidos sintéticos de GRA7 de *T. gondii* reportados en la literatura

Tipo de cepa	Secuencia de aminoácidos de péptidos sintéticos basados en GRA7 de <i>T. gondii</i>	Referencia
I	201-LTRTYRHFSRPNRSRQPALEQVPESGEDGEDARQ-236	Xiao <i>et al</i> , 2009
	220-LEQVPESGEDGEDARQ-236	Sousa <i>et al</i> , 2009;2010
	157-DRLVEEQQRGDETTGQNggsgggsgsgGLTRTYggsgggsgsg PALEQE SGEDGED-233	En este estudio
II	201-LTRTYRHFSRPNRSRQPALEQVPESGKDGEDARQ-236	Xiao <i>et al</i> , 2009
	224-VPESGKDGEDARQ-236	Kong <i>et al</i> , 2003; Vaudaux <i>et al</i> , 2010
	157-DRILEEQQTGDETTGQNggsgggsgsgGLTRTYggsgggsgsg PALEQE SGKDGED-233	En este estudio
III	224-VPESGEDREDARQ-236	Kong <i>et al</i> , 2003; Vaudaux <i>et al</i> , 2010
	201-IKRTYRHFSRPNRSRQPAPEHEVPESGEDREDARQ-236	Xiao <i>et al</i> , 2009
	220-PEHEVPESGEDREDARQ-236	Sousa <i>et al</i> , 2009;2010
	157-DRILEEQQTGDESTGQNggsgggsgsg GIKRTY ggsgggsgsg PAPEHE SGEDRED-233	En este estudio

NOTA: Los residuos de aminoácidos en color verde indican el fragmento común en las secuencias de los péptidos, en minúsculas y azul los residuos que corresponden a la secuencia de unión y por último en rojo se marcan los SNPs entre las tres cepas.

Es interesante destacar que tanto los péptidos de GRA7 como los de GRA6 poseen la mayoría de los cambios significativos en su región C-terminal; esto se relaciona con los modelos tridimensionales hipotéticos, en los que se aprecian discretos cambios conformacionales en esta región, los tipo I y II presentan una α hélice, con uno y tres giros respectivamente, y el tipo III tiene una estructura desordenada; lo anterior podría ser debido a los cambios en la última sección de la secuencia de los péptidos, el tipo I sólo difieren en un SNP: ²²⁹Glu versus II (²²⁹Arg), mientras entre el tipo I y el III hay tres cambios: ²²³Leu,²²⁵Gln,³³¹Gly contra ²²³Pro,²²⁵His y ³³¹Arg; el péptido tipo III es el que más difiere de los otros tipos, y coincidentemente es el que tiene estructura desordenada. No obstante, estas deducciones son hipotéticas, ya que no se tiene la estructura cristalizable de alguna de estas proteínas, para la localización de los péptidos, como se hizo para SAG1.

GRA7 y SAG1 han sido menos utilizadas que GRA6 para la serotipificación, a pesar de que GRA7 presenta mayor número de SNPs entre las cepas clásicas y que SAG1 es uno de los antígenos inmunodominantes de mayor uso en el diagnóstico de esta parasitosis.

El uso de péptidos provenientes de varias proteínas reforzaría la especificidad por tipo de cepa; por ello, valdría la pena usar mezclas de péptidos del mismo tipo y determinar si esto favorece la serotipificación.

Las condiciones de los inmunoensayos deben optimizarse, realizando algunos cambios para disminuir el fondo y las reacciones cruzadas, probar nuevas diluciones de sueros y concentraciones de los péptidos y rescatar algunos detalles de otros trabajos, como la inclusión de muestras positivas a otros genotipos e inclusive a otros parásitos del Phylum Apicomplexa. También debe contemplarse incluir péptidos de otras proteínas polimórficas y antigénicas, como las de la roptrias (ROP5 o ROP18) (Behnke *et al*, 2012).

A pesar de lo que queda por hacerse, los resultados de esta tesis sugieren que es posible determinar el tipo de cepa que está infectando un ser humano o animal a través de la serotipificación.

10. Referencias

- Abbas AK y Lichtman AHH. Cellular and Molecular Immunology. 6nded.USA: Saunders Company, 2007.
- Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Sadak A, Fortier B, Leriche MA, Camus D, Dubremetz JF. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. Parasitology 1991; 103(3):321–29.
- Adjogble KD, Mercier C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-Delauw MF, Däubener W. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. International Journal for Parasitology 2004; 34(11):1255–64.
- Ahn HJ, Kim S, Kim HE, Nam HW. Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. The Korean Journal of Parasitology 2006; 44(4): 303–12.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology 2004; 34(10):1185–96.
- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathogens 2005; 1(2):e17.
- Altschul S, Gish W, Miller W. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 1990;215(3):403–10.
- Alvarado-Esquivel C, Alanis-Quiñones OP, Arreola-Valenzuela MA, Rodríguez-Briones A, Piedra-Nevarez LJ, Duran-Morales E, Estrada-Martínez-García SA, Liesenfeld O. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric inpatients in a northern Mexican city. BMC Infectious Diseases 2006; 6:178.
- Alvarado-Esquivel C, Estrada-Martínez S, Pizarro-Villalobos H, Arce-Quñones M, Liesenfeld O, Dubey JP. Seroepidemiology of *Toxoplasma*

gondii infection in general population in a northern Mexican city. The Journal of Parasitology 2011 97(1):40–3.

- Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Márquez-Conde JA, Estrada-Martínez S, Dubey JP. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in workers occupationally exposed to water, sewage, and soil in Durango, Mexico. The Journal of Parasitology 2010;96(5):847–50.
- Alvarado-Esquivel C, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OCH, Choudhary S, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Villena I, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. The Journal of Parasitology 2011; 97(5): 809–12.
- Alvarado-Esquivel C, Sánchez-Okrucky R, Dubey JP. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. Veterinary Parasitology 2012;184(2-4): 321–4.
- Arantes TP, Lopes WD, Ferreira RM, Pieroni JS, Pinto VM, Sakamoto CA, Costa AJ. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. Experimental Parasitology 2009;123(2):190–4.
- Araújo P, Ferreira A. Diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 2010; 52(2):63–68.
- Barragan A y Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. The Journal of Experimental Medicine 2002; 195(12):1625-33.
- Beghetto E, Spadoni A, Bruno L, Buffolano W, Gargano N. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. Journal of Clinical Microbiology 2006; 44(6): 2133–40.
- Behnke MS, Fentress SJ, Mashayekhi M, Li LX, Taylor GA, Sibley LD. The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in *Toxoplasma gondii* by regulating the active kinase ROP18. PLoS Pathogens. 2012; 8(11):e1002992.

- Belfort-Neto R, Nussenblatt V, Rizzo L, Muccioli C, Silveira C, Nussenblatt R, Khan A, Sibley LD, Belfort R Jr. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 2007; 79(1):111–14.
- Besne-Merida A, Figueroa-Castillo JA, Martinez-Maya JJ, Luna-Pasten H, Calderon-Segura E, Correa D. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Veterinary Parasitology* 2008; 157(3-4): 310–13.
- Bhattacharya A, Tejero R, Montelione GT. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins* 2007; 66(4):778-95.
- Bonhomme A, Maine GT, Beorchia A, Burlet H, Aubert D, Villena I, Hunt J, Chovan L, Howard L, Bronjanac S, Sheu M, Tyner J, Pluot M, Pinon JM. Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 1998; 46(12):1411-22.
- Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Collier S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(40): 34245–58.
- Braun L, Travier L, Kieffer S, Musset K, Garin J, Mercier C, Cesbron-Delauw MF. Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2008; 157(1):13–21.
- Buffolano W y Beghetto E. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(12): 5916–24.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27(8):1787-92.

- Caballero-Ortega H, Palma JM, García-Márquez LJ, Gildo-Cárdenas A, Correa D. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology* 2008a; 135(12):1385–1389.
- Caballero-Ortega H, Quiroz-Romero H, Olazarán-Jenkins S, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology* 2008b; 135(8):897-902.
- Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Correa D. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2012; 106(11):653–9.
- Camossi LG, Greca-Júnior H, Corrêa PFL, Richini-Pereira VB, Silva RC, Da Silva V, Langoni H. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Veterinary parasitology*.2011; 177(3-4):256–61.
- Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez M de L, Luna-Pastén H, Rodríguez Pérez LR, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Figueroa-Damián R, Correa D. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2008; 27(5):469-74.
- Carey KL, Donahue CG y Ward GE. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000;105(1):25–37.
- Carmona SJ, Sartor PA, Leguizamón MS, Campetella OE, Agüero F. Diagnostic peptide discovery: prioritization of pathogen diagnostic markers using multiple features. *PloSone* 2012;7(12): e50748.

- Carruthers VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International* 1999; 48(1):1-10.
- Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Rangel-Rodríguez IC, Espinosa D, Salas-garrido CG, López O. Diagnóstico anatomopatológico y molecular de toxoplasmosis en marsupiales australianos en cautiverio en México. *Biomédica* 2011; 31(3):192.
- Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Salas-Garrido CG, Correa D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Veterinary Parasitology* 2011; 180(3-4): 368–71.
- Cedillo-Peláez, C. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México (tesis de maestría). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009.
- Cesbron-Delauw MF, Gendrin C, Travier L, Ruffiot P, Mercier C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 2008; 9(5):657–64.
- Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitology today* (Personal ed.)1994; 10(8):293–6.
- Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazet J, Dabritz H, Jessup DA, Gulland F, Grigg ME. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology* 2005; 35(11-12):1155–68.
- Coppens I, Andries M, Liu JL, Cesbron-Delauw MF. Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. *European Journal of Cell Biology* 1999; 78(7):463-72.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 2006; 125(2):261–74.

- Correa D, Coballase UE, Cañedo SI, Rico TC. Toxoplasmosis. En: Flisser A, Pérez TR, editores. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de textos mexicanos. México, D.F., 2006:355-367.
- Da Silva AV, de Moraes Gimenes Bosco S, Langoni H, Bagagli E. Study of Toxoplasma infection in Brazilian wild mammals: serological evidence in *Dasytus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Veterinary Parasitology* 2006;135(1):81–3.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(4):569-88.
- Dubey JP y Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *The Journal of Protozoology* 1972; 19(1):155–77.
- Dubey JP, Lindsay DS y Speer CA . Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(2): 267–99.
- Dubey JP, Morales ES, Lehmann T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *The Journal of Parasitology* 2004; 90(2):411–3.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Peña S, Martínez-García S, González-Herrera A, Ferreira LR, Kwok OC, Su C. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology* 2009; 95(2): 319–322.
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 1998; 28(7): 1019–24.
- Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd ed. CRC Press. 2013.
- DubeyJP, Applewhaite L, Sundar N, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC H, Hill R, Su C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology* 2007; 134(11):1559–65.

- Dunn D, Wallon M; Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother to child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999; 353:1829-33.
- Ellrott K, Guo JT, Olman V, Xu Y. Improving the performance of protein threading using insertion/deletion frequency arrays. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 2008; 6:585–602.
- Elyasi H, Babaie J, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Zare M, Sadeghiani G, Assmar M, Pelloux H, Golkar M. Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 2010; 17(9):1349–55.
- Fazaeli A, Carter PE, Dardé ML, Pennington TH. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *International Journal for Parasitology* 2000; 30(5): 637–42.
- Ferguson DJP. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International Journal for Parasitology* 2004; 34(3): 347–60.
- Fraczkiewicz R y Braun W. Exact and Efficient Analytical Calculation of the Accessible Surface Areas and Their Gradients for Macromolecules. *Journal of Computational Chemistry* 1998;19:319-333.
- Fraczkiewicz R y Braun W. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *Journal of Computational Chemistry* 1998; 19:319–333.
- Frenkel JK. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitology today (Personal ed.)* 1988; 4(10):273–8.
- Galvan-Ramirez Mde L, Troyo R, Roman S, Calvillo-Sanchez C, Bernal-Redondo R. A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. *Parasites y Vectors* 2012;5:271.
- Gendrin C, Mercier C, Braun L, Musset K, Dubremetz JF, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii* uses unusual sorting mechanisms to deliver

transmembrane proteins into the host-cell vacuole. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 2008; 9(10): 1665–80.

- Graille M, Stura EA, Bossus M, Muller BH, Letourneur O, Battail-Poirot N, Sibai G, Gauthier M, Rolland D, le Du MH, Ducancel F. Crystal structure of the complex between the monomeric form of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. *Journal of Molecular Biology* 2005; 354(2):447–58
- Grimwood J y Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Experimental parasitology* 1992; 74(1):106–111.
- He M, Taussig MJ. Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Research* 1997; 25(24):5132-4.

- Hegab SM y Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clinical and Experimental Medicine* 2003;3(2):84-105.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2002; 8(10): 634–40.
- Hill DE, Chirukandoth S y Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews* 2005; 6(1):41-61.
- Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*.1997;35(6):1411–4.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infection Diseases*1995; 172(6):1561-6.
- Jacobs D, Dubremetz JF, Loyens A, Bosman F, Saman E. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from

Toxoplasma gondii. Molecular and Biochemical Parasitology 1998;91(2):237–249.

- Jung C, Lee CYF y Grigg ME. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. International Journal for Parasitology 2004.34(3): 285–96.
- Kafsack B, Carruthers V, Pineda F. Kinetic modeling of *Toxoplasma gondii* invasion. Journal of Theoretical Biology 2007; 249(4): 817–25.
- Khan A, Böhme U, Kelly KA, Adlem E, Brooks K, Simmonds M, Mungall K, Quail MA, Arrowsmith C, Chillingworth T, *et al*. Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. Genome Research 2006; 16(9):1119–25.
- Khan A, Dubey J y Su C. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. International Journal for Parasitology 2012. 41(6):645–655.
- Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R, Glover D, Tang K, Paulsen IT, Berriman M, *et al*. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Research 2005; 33(9): 2980–92.
- Kim SK, Fouts AE y Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* dys regulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) 2007; 178(8):5154–65.
- Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. The Journal of Infection Diseases 2003; 187(9):1484–95.
- Labruyere E, Lingnau M, Mercier C, Sibley LD. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. Molecular and Biochemical Parasitology 1999; 102 (2): 311–24.
- Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B, Morlon-Guyot J, Dubremetz JF, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW, *et al*. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent

- invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathogens* 2011;7(2):p. e1001276.
- Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E. EsyPred 3D: Prediction of proteins 3D structures 2002; 18(9):1250-56.
 - Lecordier L. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1995; 70(1-2):85-94.
 - Lindsay DS, Blagburn BL y Dubey JP. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Veterinary Parasitology* 2002; 103: 309–313.
 - Liu L, Liu T, Yu L, Cai Y, Zhang A, Xu X, Luo Q, Hu Y, Song W, Lun Z, Lu F, Wang Y, Shen J. rROP2₍₁₈₆₋₅₃₃₎: a novel antigen for detection of IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. *Foodborne Pathogens and Diseases* 2012; 9(1):7-12.
 - Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Groß U, et al. Analysis of Clonal Type-Specific Antibody Reactions in *Toxoplasma gondii* Seropositive Humans from Germany by Peptide-Microarray. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e34212.
 - Maréchal E y Cesbron-Delauw MF. The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends in Plant Science* 2001; 6(5):200–5.
 - Martí-Renom M, Stuart A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 2000;29:291–325.
 - Mercier C y Dubremetz J. Biogenesis of Nanotubular Network in *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole Induced by Parasite Proteins. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13(7):2397-409. 2397–2409.
 - Mercier C, Adjogble KD Z, Däubener W, Delauw MFC. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites. *International Journal for Parasitology* 2005; 35(8): 829–49.

- Michelin A, Bittame A, Bordat Y, Travier L, Mercier C, Dubremetz JF, Lebrun M. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *International Journal for Parasitology* 2009; 39(3): 299–306.
- Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR, Jessup DA, Boothroy JC, Brownstein D, Conrad PA. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *International Journal for Parasitology* 2004; 34(3):275–84.
- Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely K H, et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950).1993; 150(9): 3951–3964.
- Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185:73–82.
- Mordue D y Desai N. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 190(12):1783-92.
- Morisset S, Peyron F, Lobry JR, Garweg J, Ferrandiz J, Musset K, Gomez-Marín JE, de la Torre A, Demar M, Carme B, Mercier C, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 2008;10(7): 742–7.
- Muñoz-Hernández S, Carmen MG, Mondragón M, Mercier C, Cesbron MF, Mongragón-González S, Mondragón R. Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:473983. doi: 10.1155/2011/473983.

- Nordahl PT, Brunak S, Heijne VG, Nielsen H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 2011;8:785-786.
- Ortiz Alegría LB. Validación de técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas (tesis de licenciatura). México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
- Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, Correa D. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immunology* 2010; 11(5):363-73.
- Ossorio PN, Dubremetz JF, Joiner KA. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(21):15350–7.
- Pan S, Thompson RCA, Grigg ME, Sundar N, Smith A, Lymbery AJ. Western Australian Marsupials Are Multiply Infected with Genetically Diverse Strains of *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* 2012;7(9): e45147.
- Petersen E, Edvinsson B, Lundgren B, Benfield T, Evengard B. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases: Official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2006; 25: 401–404.
- Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, Petersen E, Meroni V, Rausher B, Mercier C, Picot S, Cesbron-delauw MF. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 2006; 8(9-10):2333–40.
- Pfrepper K, Enders G, Gohl M. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2005; 12 (8):977–982.

- Pillardy J, Czaplewski C, Liwo A, Lee J, Ripoll DR, Kaźmierkiewicz R, Oldziej S, Wedemeyer WJ, Gibson KD, Arnautova YA, *et al.* Recent improvements in prediction of protein structure by global optimization of a potential energy function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(5):2329–33.
- Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani C, Macías-Avilés HA, Cedillo-Peláez C, Cañedo-Solares I, Luna-Pastén H, Tecuatl-Herrada BL, Correa D. Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2012; 31(4): 411–3.
- Rico-Torres CP. Estandarización y validación a nivel de laboratorio de una prueba de PCR para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas (tesis de licenciatura). México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 2005.
- Robinson SA, Smith JE y Millner PA. *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): in vitro analysis of host cell binding. *Parasitology* 2004; 128(4):391-6.
- Roch E, Varela G. Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en México. Resultados de 29 883 reacciones de Sabin y Feldman efectuados de 1953 a 1965. *Salud Pública México* 1966; 26: 31-49.
- Rome ME, Beck JR, Turetzky JM, Webster P, Bradley PJ. Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 2008; 76(11): 4865–75.
- Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering* 1999; 12:85–94.

DeLano WL. The PyMOL molecular graphics system. Palo Alto, CA: DeLano Scientific 2002. Available at: <http://www.pymol.org>.

- Saha S, Bhasin M, Raghava GPS Bcipep: a database of B-cell epitopes. *BMC genomics* 2005; 6:79.

- Schieffer H, Slenczka W, Weber A, Krauss HZH. Zoonosis. American Society for Microbiology 2003.
- Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. International Journal for Parasitology 1997; 27(10):1135-45.
- Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, da Costa J C, Dardé ML. Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. Clinical and Vaccine Immunology : CVI.2009; 16(8):1158–69.
- Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Dardé ML. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. Clinical and Vaccine Immunology : CVI. 2008; 15(9):1380–6.
- Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America 2012; 109(15):5844-9.
- Swinger RL, Schmidt KA, Dubielzig RR. Keratoconjunctivitis associated with *Toxoplasma gondii* in a dog. Veterinary Ophthalmology 2013;12(1):56–60.
- Tenter A M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2009; 104(2):364-9.
- Tilley M, Fichera ME, Jerome ME, Roos DS, White MW. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. Infection and Immunity 1997;65: 4598–4605.
- Tizard IR. Veterinary Immunology. 9nd ed.EUA: Saunders Elsevier, 2012:145-153.
- Torrey EF, Yolken RH. Schizophrenia and toxoplasmosis. Schizophrenia bulletin. 2007; 33(3):727–8.

- Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez Mde L, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, *et al.* Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005;72:142–144.
- Velasco-Castrejón O, Salvatierra- Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C, Llausás A, Tapia-Conyer R, Gutiérrez G, Sepúlveda J. Toxoplasmosis seroepidemiology in Mexico. *Salud Pública México* 1992; 34:222–9.
- Webb JA, Keller SL, Southorn EP, Armstrong J, Allen DG, Peregrine AS, Dubey JP. Cutaneous manifestations of disseminated toxoplasmosis in an immunosuppressed dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2005; 41(3):198–202.
- Wu K, Chen XG, Li H, Yan H, Yang PL, Lun ZR, Zhu XQ. Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009; 64(3):261–6.
- Xiao J, Buka SL, Cannon TD, Suzuki Y, Viscidi RP, TorreyEF, Yolken RH. Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009; 11(13):1011–8.
- Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, Sugimoto C, Xuenan X, Fujisaki K. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science* 2006; 68(10):1105–7.
- Zhang, Y. Progress and challenges in protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology* 2008; 18(3):342–348.