



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”

**DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE UN ANTÍGENO MULTI-EPÍTOPE PARA LA
DETECCIÓN DE LA FASE AGUDA DE *TOXOPLASMA GONDII* UTILIZANDO
GRA7 Y GRA8**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE BACHILLER EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTORES:

SEBASTIAN RODRIGUEZ GONZALES

VALERIA SHANTALL VELASQUEZ HUMALA

ASESORA:

PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

LIMA, PERÚ

2024

DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE UN ANTÍGENO MULTI-EPITOPE PARA LA DETECCIÓN DE LA FASE AGUDA DE TOXOPLASMA GONDII UTILIZANDO GRA7 Y GRA8

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%	5%	2%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Pontificia Universidad Católica de Chile	1%
	Trabajo del estudiante	
2	pesquisa.bvsalud.org	1%
	Fuente de Internet	
3	vidas-toxo.biomerieux.com	1%
	Fuente de Internet	
4	pt.scribd.com	<1%
	Fuente de Internet	
5	hdl.handle.net	<1%
	Fuente de Internet	
6	idoc.pub	<1%
	Fuente de Internet	
7	ri.uaemex.mx	<1%
	Fuente de Internet	
8	piojos.com.mx	<1%
	Fuente de Internet	

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. ESTADO DEL ARTE.....	3
1.1. Infección aguda por <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.2. Evidencias de la detección de toxoplasmosis aguda con proteínas de los gránulos densos (GRA).....	4
1.3. GRA7	6
1.4. GRA8	7
1.5. La inmunoinformática como herramienta para la construcción del antígeno multiepitope	8
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	10
3. ESTRATEGIA DE ABORDAJE.....	12
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	14
ANEXOS	18

RESUMEN

Toxoplasma gondii, un parásito intracelular oportunista, puede provocar enfermedades graves e incluso letales en pacientes inmunosuprimidos o mujeres embarazadas durante la fase aguda de la infección. En consecuencia, se necesitan técnicas diagnósticas rápidas, sensibles y específicas para un tratamiento oportuno de toxoplasmosis aguda.

Los métodos de diagnóstico utilizan antígenos naturales en la detección indirecta del parásito, con baja especificidad y sin capacidad de discriminar las fases aguda y crónica. Para mejorar la detección, se propone el uso de proteínas con epítopes múltiples que reconocen sitios de unión de anticuerpos específicos.

Las proteínas de los gránulos densos (GRAs) desempeñan un papel importante en la modificación y perfeccionamiento de la vacuola parasitófora. Entre estas, se ha reportado que GRA7 es altamente inmunogénica, y se puede utilizar para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* en infecciones agudas y crónicas, con mayor sensibilidad a la primera. GRA8 se ha utilizado también para la detección de la fase aguda, y la mezcla de ambas ha permitido una detección en animales más eficaz que su uso individual. Sin embargo, en un estudio donde se evaluó un kit de diagnóstico, se encontró que ambos antígenos podrían reaccionar de manera cruzada con anticuerpos dirigidos a otros parásitos y originar falsos positivos. Ello implica que estas proteínas deben estudiarse más a fondo.

El potencial de la combinación de las regiones antigénicas de GRA7 y GRA8 como antígeno recombinante multi-epítope para diagnóstico de la fase aguda de la toxoplasmosis no ha sido explorado. Por lo tanto, es esencial un estudio bioinformático para la predicción de regiones inmunodominantes, así como el diseño y modelación del antígeno recombinante. El objetivo del presente estudio es el diseño de una proteína multi-epítope basada en GRA7 y GRA8 mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Esta estrategia ofrece una perspectiva novedosa en el diagnóstico de toxoplasmosis aguda.

Palabra clave: Multiepítope, diagnóstico, Toxoplasmosis aguda, inmuninformática, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, an opportunistic intracellular parasite, can cause severe and even lethal diseases in immunosuppressed patients or pregnant women during the acute phase of the infection. Consequently, rapid, sensitive, and specific diagnostic techniques are needed for timely treatment of acute toxoplasmosis.

Diagnostic methods currently rely on natural antigens in the indirect detection of the parasite, with low specificity and without the ability to discriminate between acute and chronic phases. To improve detection, the use of proteins with multiple epitopes that recognize specific antibody binding sites is proposed.

Proteins from dense granules (GRAs) play an important role in modifying and perfecting the parasitophorous vacuole. Among these, GRA7 has been reported to be highly immunogenic and can be used to detect anti-*T. gondii* antibodies in acute and chronic infections, with greater sensitivity to the former. GRA8 has also been used for the detection of the acute phase, and the combination of both has allowed for more effective detection in animals than their individual use. However, in a study evaluating a diagnostic kit, it was found that both antigens could cross-react with antibodies directed against other parasites and lead to false positives. This implies that these proteins need to be further studied.

The potential of combining the antigenic regions of GRA7 and GRA8 as a multi-epitope recombinant antigen for diagnosing the acute phase of toxoplasmosis has not been explored. Therefore, a bioinformatics study is essential for predicting immunodominant regions, as well as designing and modeling the recombinant antigen. The objective of this study is to design a multi-epitope protein based on GRA7 and GRA8 using bioinformatics tools. This strategy offers a novel perspective in the diagnosis of acute toxoplasmosis.

Keywords: Multiepitope, diagnosis, acute toxoplasmosis, immunoinformatics, *Toxoplasma gondii*.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Infección aguda por *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmosis es causada por el parásito protozoario intracelular *Toxoplasma gondii*, y afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial [1, 2]. En los seres humanos, las principales vías de transmisión son mediante la ingesta de alimentos, agua o suelo contaminados por ooquistes o quistes tisulares de los huéspedes definitivos, los gatos. Además, se transmite verticalmente a través de la placenta y horizontalmente a través de transfusión de sangre y contacto sexual [3]. Aunque los felinos son el único huésped definitivo, *T. gondii* puede infectar y replicarse dentro de cualquier célula nucleada de vertebrados. Su ciclo de vida se divide en una fase asexual, dentro de las células nucleadas; y una fase sexual dentro del tracto gastrointestinal de los gatos. Los gametos fertilizados se generan a partir de la replicación sexual dentro del intestino delgado del felino, y los ooquistes excretados pueden permanecer en el medio ambiente durante 18 meses [4]. Tras la ingesta, los ooquistes y/o quistes tisulares se rompen e invaden las células del revestimiento intestinal, y los esporozoitos (de los ooquistes) o bradizoitos (de los quistes tisulares), se diferencian en taquizoitos, los cuales son de rápida replicación [4] y están presentes durante la infección aguda. Estos últimos se replican cada 6 a 8 horas dentro de un compartimento denominado vacuola parasitófora, que evita la fusión con la vía endolisosomal de la célula huésped y es esencial para el crecimiento intracelular del parásito [1].

La enfermedad aguda en el adulto inmunocompetente generalmente no causa síntomas. Sin embargo, en mujeres embarazadas, puede infectar al feto por transmisión transplacentaria, lo que puede causar una enfermedad potencialmente mortal, con una importante morbilidad y mortalidad en fetos y recién nacidos. Los síntomas más graves de la transmisión congénita incluyen calcificación cerebral, hidrocefalia o microcefalia, convulsiones, retrasos en el desarrollo, coriorretinitis, estrabismo, pérdida de visión, pérdida de audición, hepatoesplenomegalia, ictericia, petequias, trombocitopenia, anemia y/o transaminitis. [5, 6]. Durante la fase de parasitemia, *T. gondii* puede atravesar la placenta y entrar en la circulación fetal con un riesgo de infección que aumenta con la edad gestacional; mientras que la gravedad de la infección disminuye con el aumento de la edad gestacional. Durante el primer y segundo trimestre, la infección puede provocar un aborto espontáneo (alrededor del 3% de todos los casos) o nacimiento muerto. Los lactantes infectados suelen presentar síntomas graves con trastornos neurológicos y lesiones oculares, mientras que en la última fase del embarazo la enfermedad neonatal puede ser menos grave o asintomática. Se estima que la tasa de incidencia

mundial de infección congénita es de 1.5 casos/1.000 nacidos vivos, siendo más alta en Sudamérica y algunos países del Medio Oriente. [6].

Otro grupo de riesgo es el de pacientes con un sistema inmune suprimido, siendo el más común aquellos con VIH. En estas personas, la infección por *T. gondii* es potencialmente mortal. Su principal manifestación clínica es la encefalitis por toxoplasmosis cerebral. Si bien la infección primaria por *T. gondii* es grave en pacientes VIH+, la toxoplasmosis cerebral suele ocurrir cuando la deficiencia de células T CD8 permite la reactivación de una infección latente. Esta enfermedad es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con SIDA. Una característica común es la observación de abscesos cerebrales [4]. Otros síntomas asociados son cefaleas, somnolencia, desorientación, hemiparesia, demencia, ataxia, letargo, convulsiones y/o epilepsias [4, 7].

Wang et al calcularon aproximadamente 13 138 600 casos de coinfección por *T. gondii* en pacientes con VIH. Determinaron una prevalencia a nivel global de 35.8%. Las regiones con mayor prevalencia fueron América Latina y el Caribe (49.1%) y Norte de África y Medio Oriente (60.7%); lo cual es indicativo de que la coinfección es común en países en vías de desarrollo [8]. Por otro lado, Rostami et al estimaron el número de personas VIH+ con toxoplasmosis aguda y crónica; y establecieron una seroprevalencia global de toxoplasmosis aguda del 1.3%, equivalente a aproximadamente 0.5 millones de personas infectadas con VIH. Las regiones con las mayores seroprevalencias de infección aguda por *T. gondii* fueron América del Sur (2%) y la Región del Mediterráneo Oriental (1.8%) [7].

1.2. Evidencias de la detección de toxoplasmosis aguda con proteínas de los gránulos densos (GRA)

El empleo de métodos de diagnóstico altamente sensibles y específicos es fundamental en la prevención y tratamiento de esta enfermedad, debido a que los síntomas clínicos no ofrecen un diagnóstico definitivo. *T. gondii* desencadena una respuesta inmunitaria intensa, lo cual resalta la importancia de las pruebas serológicas para la detección precisa de anticuerpos específicos (IgM, IgG, IgA e IgE), independientemente de las manifestaciones clínicas. Entre estos, IgM es considerado un marcador sensible de toxoplasmosis aguda; pero se deben tener precauciones al interpretar sus resultados de detección, debido a que puede permanecer en el cuerpo por mucho tiempo [9]. Otras formas de identificar la infección reciente son a través de la detección de la seroconversión de IgM o IgG, el incremento significativo de IgG y/o IgG de baja avidéz (baja fuerza de afinidad anticuerpo-antígeno) [9, 10].

Según el Ministerio de Salud del Perú, no hay una normativa que exija realizar pruebas serológicas para la toxoplasmosis durante el embarazo, se puede optar por solicitarlas o ser referido para obtener ayuda diagnóstica en el primer trimestre. [11]. Esto proporciona resultados que permiten evaluar el riesgo y el pronóstico de una posible infección en el feto. Entre las pruebas serológicas comunes, la prueba de tinción de Sabin-Feldman es considerada el “gold standard” debido a que es altamente sensible y específica. Se basa en la complementación de la incubación de taquizoítos vivos con sueros de pacientes. Si bien detecta títulos de IgM e IgG, no puede distinguir entre infección aguda y crónica [9]. Adicionalmente, utiliza parásitos vivos, lo que implica un riesgo biológico, un costo muy elevado y gran dificultad de estandarización [9, 10]. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tiene una alta sensibilidad y especificidad para la detección cuantitativa de anticuerpos. Es relativamente barato y capaz de medir tanto IgG como IgM; por lo que suele utilizarse en el screening rutinario de *T. gondii*. También se usa para determinar la eficacia de proteínas recombinantes como antígenos con fines de diagnóstico. A pesar de ello, la estandarización de los antígenos utilizados para ELISA es complicada. Además, se han reportado que algunas pruebas ELISA basadas en IgM pueden producir falsos positivos, posiblemente por factores reumatoides en el suero; mientras que en ELISA IgG se encontraron falsos negativos posiblemente por la inhibición competitiva específica de este anticuerpo [9]. En las Tablas 1 y 2 se evidencian los resultados de sensibilidad y especificidad de ELISA IgG utilizando diferentes antígenos recombinantes, lo que resalta la heterogeneidad de resultados dependiente del antígeno escogido para la prueba [10]. Por otro lado, la prueba inmunocromatográfica consiste en una prueba rápida de flujo lateral que emplea un antígeno específico marcado con oro coloidal y una tira de nitrocelulosa. Los complejos anticuerpo-antígeno que se formen en la tira mostrarán una reacción de color producto del marcador. Su aplicación es fácil, ofrece resultados rápidos y tiene una alta concordancia con ELISA en términos de sensibilidad y especificidad [9].

La mayoría de los kits serológicos comerciales utilizan antígenos preparados a partir de cultivos de taquizoítos en ratones o en tejidos. No obstante, existe un riesgo inherente de contaminación con materiales no parasitarios en los antígenos extraídos, tanto en el medio de cultivo como en las propias células hospedadoras. [9, 10]. La aplicación de un antígeno crudo de taquizoítos de *T. gondii* en un ELISA indirecto demostró tener una capacidad de detección del 95.75% de casos verdaderos positivos y una especificidad del 85.11%. Sin embargo, se observa una notable variación en el proceso de producción del antígeno nativo entre diferentes laboratorios.

[12]. Además, son incapaces de distinguir correctamente entre infección aguda y crónica. Una alternativa para mejorar estas pruebas es sustituir los antígenos nativos por proteínas recombinantes, debido a que se posee información precisa sobre su composición, ofrece la posibilidad de utilizar varios antígenos y su proceso de estandarización es más fácil [10]. Así, se pueden seleccionar proteínas que son característica del estadio de taquizoito o bradizoito para identificar la fase de la infección por *T. gondii* –aguda o crónica– en sueros [9]. Hay diversas pruebas comerciales que utilizan antígenos recombinantes, como la prueba de Architect® Toxo IgG (Abbott Laboratories) (sensibilidad del 99.7%; especificidad del 99.6%) [13]. Se ha investigado el potencial de múltiples proteínas de *T. gondii* como antígenos recombinantes. Se destacan las proteínas de los gránulos densos (GRAs), componentes esenciales tanto de la vacuola parasitófora de los taquizoitos, así como de la pared del quiste que contiene a los bradizoitos [14]. Desempeñan un rol importante en la invasión, mantenimiento de la vacuola y supervivencia del parásito. Tras la infección reciente, son secretadas en abundancia en el torrente sanguíneo y ocasionan una fuerte respuesta de células T y B en las células del hospedero [9,14].

1.3. GRA7

Entre las GRAs estudiadas, GRA7 produce una intensa respuesta inmune en la fase aguda de toxoplasmosis [14, 15]. Está compuesta por 236 aminoácidos y dos dominios hidrofóbicos en el extremo C-terminal [15]. Múltiples estudios respaldan su potencial para detectar la infección reciente por *T. gondii*. Selseleh et al produjeron una GRA7 recombinante y la evaluaron en sueros de humanos divididos en los siguientes grupos: (a) 74 muestras positivas para *T. gondii* IgG, (b) 70 muestras positivas para *T. gondii* IgM (36 sueros fueron positivos para IgG e IgM) y (c) 30 sueros que no tenían evidencia serológica de toxoplasmosis. Se les realizó pruebas de ELISA IgM e IgG. La primera (ELISA IgM) se utilizó para detectar la fase aguda y se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 96% y 90%, respectivamente. La sensibilidad obtenida fue mayor a la de ELISA IgG (sensibilidad del 89%; especificidad del 90%), por lo que algunos epítopes de GRA7 producen una respuesta de anticuerpos del hospedero durante la fase aguda [14]. Kotresha et al utilizaron un fragmento de GRA7 (aminoácidos 14-236) recombinante. Se omitieron los primeros aminoácidos en base al uso de herramientas informáticas que les permitió identificar regiones altamente antigénicas. Se realizó Western blot en tres grupos de 20 sueros humanos cada uno: grupo I - fase aguda (IgM+; IgG+; 50% baja avidéz IgG), grupo II - fase crónica (IgM-; IgG+, alta avidéz IgG) y grupo III - sueros negativos (IgM-; IgG-). En el grupo I se obtuvo una sensibilidad del 100% y con el grupo III se obtuvo una especificidad

del 100%, es decir que no reaccionó con ninguno de los sueros negativos. Si bien se resalta el potencial de GRA7 para detectar la fase aguda de *T. gondii*, en el grupo II (sueros en fase crónica) se obtuvo una sensibilidad del 40%. Esto significa que hubo reactividad con algunos sueros de pacientes en fase crónica (8 de 20), lo que concuerda con estudios previos. [15, 16]. Teimouri et al desarrollaron una ELISA para detectar anticuerpos IgM, IgG y avidéz de IgG utilizando GRA7 recombinante, SAG1 recombinante y su combinación para discriminar entre las fases aguda y crónica. El estudio se diseñó utilizando 138 sueros humanos de varios laboratorios clínicos, desde mayo de 2017 hasta marzo de 2018. Para la detección de Toxo IgM, la mayor sensibilidad (100%) se demostró para GRA7 individual (sin SAG1); y la especificidad fue de 96.3% [17].

1.4. GRA8

Otro de los antígenos más prometedores para el diagnóstico específico de fase aguda es GRA8. [18]. Su secuencia está compuesta por 267 aminoácidos de los cuales 64 son prolina hidrófoba (24% en total). Contiene un péptido señal amino terminal, tres repeticiones degeneradas ricas en prolina en la región central y un dominio transmembrana cerca del extremo carboxilo. [19]. Su eficacia en la detección de casos agudos de toxoplasmosis se ha demostrado en estudios previos. En su investigación, Babaie et al. utilizaron una forma truncada de GRA8 debido a que contiene regiones transmembrana. Realizaron ELISA IgM para la detección de infecciones agudas con un nivel de sensibilidad del 60,6% y especificidad del 97,1%. [20]. La importancia destacada por Costa et al. consiste en seleccionar secuencias proteicas que reaccionen exclusivamente durante la fase aguda, sin mostrar reactividad cruzada con proteínas de diferentes parásitos. Por ello, un minucioso análisis se llevó a cabo utilizando GRA8 y mostró que existen secuencias inexpresables por su posición en la región transmembrana del polipéptido. Se obtuvieron muestras de suero (n = 242) de tres centros de salud argentinos. Las muestras de suero fueron recolectadas de adultos atendidos en estos centros de salud entre los años 2009 y 2011. El ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG contra una fracción de GRA8 –la cual contenía las dos regiones antigénicas identificadas– tuvo una sensibilidad del 79,7% y una especificidad del 84,1% en la diferenciación entre las fases aguda y crónica. [19]. Estas mismas secuencias fueron evaluadas en un estudio posterior mediante un Dot Blot semicuantitativo, donde los valores fueron similares a los reportados previamente. [18].

También se han utilizado antígenos recombinantes en combinación para la detección de anticuerpos específicos de la fase aguda de *T. gondii*, tanto en humanos como en animales. En

este contexto, Koethe et al desarrollaron un ELISA cinético basado en GRA7 y GRA8 combinados para la detección de anticuerpos IgG específicos de *T. gondii* en 1913 sueros recolectados de pavos criados en granjas alemanas. El ELISA obtuvo una sensibilidad del 94.7% y especificidad del 96.6%, por lo que GRA7 y GRA8 en conjunto sirvieron de manera eficaz para la detección de toxoplasmosis. [21]. Si bien este estudio se realizó en pavos, el uso de estas proteínas también ha sido reportado en kits de diagnóstico, en conjunto con otras proteínas expresadas por *T. gondii*. El kit *recomLine* detecta anticuerpos IgG contra *T. gondii* en suero humano, mediante el uso de los antígenos recombinantes ROP1c, GRA7, GRA8, SAG1, MAG1, GRA1 y rSAG1. El kit ha sido reconocido por su capacidad para detectar niveles bajos de IgG temprano después de la infección primaria. El estudio realizado refuerza los hallazgos al mostrar que la mayoría de las veces, GRA7 y GRA8 fueron las bandas que aparecieron primero después de una seroconversión temprana, por lo que estas proteínas permitirían una detección más temprana de anticuerpos IgG recién sintetizados. [22].

Las herramientas serológicas no están en riesgo de volverse obsoletas y no pueden ser sustituidas por técnicas basadas en biología molecular. Es crucial mejorarlas mediante la aplicación de nuevas tecnologías, ya que ninguna prueba serológica actual es completamente satisfactoria. [23]

1.5. La inmunoinformática como herramienta para la construcción del antígeno multiepítotope

Un método novedoso es la construcción de un antígeno recombinante a partir de múltiples epítotope de determinadas proteínas de *T. gondii* que pueda distinguir adecuadamente entre las infecciones aguda y crónica. Los epítotope –partes de una proteína que tienen afinidad con sitios de unión de anticuerpos– suelen encontrarse generalmente sobre la superficie de las proteínas [9]. Un antígeno multiepítotope recombinante presenta numerosas ventajas: es más inmunodominante que los antígenos originales, es un producto más estandarizado a comparación de pruebas basadas en una combinación de antígenos recombinantes y mejora la probabilidad de detectar anticuerpos; lo que conduce a una mayor especificidad y sensibilidad [9, 10]. Se ha documentado el papel de algunas proteínas multiepítotope en el serodiagnóstico de toxoplasmosis aguda en sueros humanos. Javadi Mamaghani et al diseñaron un antígeno recombinante basado en epítotope lineales y conformacionales de células B de GRA7, SAG1 y ROP1, las cuales inducen una fuerte respuesta inmune en la fase aguda. Los criterios de diseño se determinaron por múltiples análisis bioinformáticos. Se estudió su inmunorreactividad por Western blot IgG en 10 sueros de pacientes infectados y observaron que los anticuerpos de los

sueros reaccionaron con el antígeno multiepitope. No obstante, se necesitaría de un número mayor de sueros de pacientes para evaluar la sensibilidad y especificidad [24]. Alibakhshi et al utilizaron a SAG1, SAG2 y SAG3 para construir un antígeno multiepitope identificando las regiones con más epítopes de cada proteína. Utilizaron ELISA IgG indirecto para 95 sueros humanos con anti-*T. gondii* IgG y 25 sueros humanos sin IgG anti-*T. gondii*; y obtuvieron una sensibilidad del 72.6% y una especificidad del 90.3%. Estos valores son inferiores a los de pruebas que utilizan todo el cuerpo del parásito, por lo que se necesita de una evaluación inmunoinformática más profunda para la selección de epítopes y el diseño de la proteína [25].

La inmunoinformática es una herramienta muy útil en el diseño de antígenos multiepitopes. Se basa en el estudio de varios componentes del sistema inmunológico, como las inmunoglobulinas, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), receptores para células T y B, antígenos y otras moléculas que participan en la producción de la respuesta inmune. Esto facilita la rapidez, pero, sobre todo, el bajo costo del avance de técnicas potenciales de diagnóstico para enfermedades infecciosas [26]. Dentro de las herramientas inmunoinformáticas disponibles, lo primero que se realiza es la predicción de epítopes de células B. En el sistema inmunológico, el epítope de las células B ayuda a detectar infecciones y actividades virales. Estas células proporcionan inmunidad humoral al secretar inmunoglobulinas que pueden neutralizar el antígeno al unirse. Un receptor de superficie de células B reconoce epítopes de células B, lo que da como resultado la generación de inmunoglobulinas específicas de antígeno. Los epítopes son de dos tipos: lineales (continuos) y conformacionales (discontinuos). [27]. Un epítope lineal es la región o secuencia contigua de aminoácidos en una proteína mientras que un epítope conformacional consiste en un grupo de aminoácidos no adyacentes que se agrupan por el plegamiento de las regiones peptídicas donde están ubicados. [26]. Por ello, se debe analizar la antigenicidad, homología y conservación de los epítopes previstos y se eligen de acuerdo con diferentes criterios de selección. [27, 28].

La construcción de la proteína multiepitope consiste en la unión de los epítopes seleccionados mediante péptidos de unión o espaciadores que otorgan flexibilidad a la estructura y, a su vez, evitan la formación accidental de nuevas secuencias antigénicas no correspondientes al patógeno en estudio. [26]. Luego, se evalúa la antigenicidad, solubilidad y propiedades fisicoquímicas. Como su construcción es una combinación de diferentes epítopes, se evalúa la estructura secundaria y terciaria 3D [27, 28]. Se realiza un refinamiento y validación de la construcción del antígeno multiepitope, para lo cual se utiliza un enfoque de simulación. Se

refina la estructura tridimensional predicha y se verifica la calidad de este refinamiento por gráficos de Ramachandran seguido de un análisis de validación estructural. Los puntajes de calidad fuera del rango normal de las proteínas naturales durante el proceso de validación de la estructura revelan defectos potenciales en el modelo de estructura de la proteína. Finalmente, se evalúan las estadísticas de interacciones no vinculadas en el constructo, además de la flexibilidad y estabilidad de la proteína de consulta mediante la simulación de sus residuos. [28].

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La toxoplasmosis afecta a aproximadamente un tercio de la población mundial y es considerada una infección parasitaria desatendida que representa un problema de salud pública. Su incidencia es mayor en países en vías de desarrollo –como los de las regiones de Latinoamérica, Oriente Medio y África [1]. Ciertos grupos de riesgo pueden desarrollar complicaciones severas [1, 3]. Por ejemplo, en mujeres embarazadas la infección aguda puede resultar en toxoplasmosis congénita; y si no se diagnostica ni trata oportunamente, los fetos e infantes pueden padecer aberraciones cerebrales mortales [3, 4]. Por otro lado, la encefalitis toxoplásmica es muy grave en pacientes con VIH debido a que la eficacia de la infección aumenta en presencia del virus; lo cual la hace mortal en pacientes con SIDA que no reciben un tratamiento oportuno [7, 8]. Para ambos grupos, uno de los continentes donde se observa mayor incidencia es América del Sur [6, 7], lo cual resalta en esta región la urgencia de un diagnóstico temprano de toxoplasmosis para poder llevar a cabo el tratamiento pertinente y prevenir complicaciones graves.

Se han planteado múltiples estrategias para el diagnóstico serológico de toxoplasmosis. El “gold standard” es la prueba de Sabin-Feldmann; sin embargo, esta implica un riesgo biológico, es altamente costosa, su estandarización es compleja y no distingue entre infección reciente y crónica [9]. Una opción relevante es la detección de anticuerpos mediante antígenos recombinantes, ya sea individualmente [14, 15, 18, 19, 20] o combinados [16, 17, 21, 22]. Si bien estos métodos han ofrecido una variedad de resultados con eficacia heterogénea, aún es un reto establecer enfoques específicos y fiables para el diagnóstico de toxoplasmosis, especialmente para diferenciar entre sus fases [9]. En adición, se ha reportado que algunos kits de diagnóstico basados en antígenos recombinantes han mostrado resultados falsos positivos [22, 29]. En uno de estos estudios, se determinó si los sueros positivos por la prueba Architect[®] Toxo IgG eran verdaderos o falsos positivos utilizando el kit LDBio Toxo II IgG[®] immunoblot (LDBio Diagnostics) como prueba confirmatoria. De 81 muestras analizadas, 23 (28.4%)

resultaron positivas y las 58 restantes (71.6%) fueron negativas, por lo que se consideraron resultados de Architect® falsos positivos [29].

En respuesta a este panorama, surge un enfoque novedoso: el uso de antígenos recombinantes multiepitopes. La capacidad de seleccionar las regiones inmunodominantes de marcadores (proteínas de *T. gondii*) específicos que reconozcan anticuerpos anti-*T. gondii* característicos de cada fase es una ventaja distintiva de este método [9, 10]. Si bien se han construido algunas proteínas multiepitope para el serodiagnóstico de toxoplasmosis, han presentado algunas limitaciones. Algunos diseños detectaron con precisión la infección, pero no distinguen entre sus fases [30, 31], fueron evaluados en un número de sueros muy reducido [24] o presentaron bajos valores de sensibilidad y especificidad debido a un análisis bioinformático insuficiente [25].

En cuanto a la selección de los antígenos para nuestro diseño, existe el consenso de que GRA7 [14, 15] y GRA8 [18, 19, 20] son especialmente útiles para el diagnóstico de la fase aguda de toxoplasmosis en sueros humanos. A pesar de ello, no se ha explorado el potencial de un diseño multiepitope recombinante basado en secuencias de estas proteínas. Asimismo, en el estudio de falsos positivos de la prueba Architect®, se utilizó adicionalmente la prueba recomLine Toxoplasma IgG® immunoblot (Mikrogen Diagnostik) para establecer patrones de reactividad de los antígenos en los sueros. La prueba reconoce anticuerpos contra las proteínas recombinantes ROP1, GRA1, GRA7, GRA8, SAG1, MAG1, y MIC3. De 189 sueros, se determinó que las bandas de GRA8 y/o GRA7 fueron positivas en 148 muestras (78,3%), siendo la más frecuente GRA8 (presente en 133 muestras, 70,4%), mientras que GRA7 estuvo presente en 49 muestras (25,9%). Estas proteínas poseen gran similitud con otras presentes en *Hammondia hammondi* y *Neospora caninum*, por lo que los autores plantean que los falsos positivos podrían deberse a reacciones cruzadas con antígenos de estos parásitos [29]. En consecuencia, GRA7 y GRA8 deben estudiarse a profundidad para explotar al máximo sus potenciales como marcadores de detección de toxoplasmosis; y la manera óptima de hacerlo es a través de un exhaustivo análisis bioinformático. Este enfoque abre una nueva ventana para el diseño de antígenos multiepitopes, ya que permite la selección cuidadosa de epítopes en base a softwares predictivos que ofrecen información acerca de la antigenicidad, hidrofiliidad, flexibilidad y afinidad con receptores. De este modo, se pueden remover regiones inespecíficas del antígeno que tienen baja afinidad con los anticuerpos o generan reacciones cruzadas con otros parásitos cercanos. Por lo tanto, el análisis *in silico* y las técnicas de predicción basadas en software son de gran importancia para el uso de una proteína multiepitópica en kits de

diagnóstico [24, 25]; ya que permiten abordar problemas como la detección de falsos positivos por reacciones cruzadas.

En este contexto, nuestra pregunta de investigación es la siguiente: ¿La proteína multiepitope basada en secuencias de GRA7 y GRA8 diseñada con softwares inmuno-informáticos será capaz de diferenciar la infección aguda de la crónica por *Toxoplasma gondii*? El objetivo del presente estudio es producir un antígeno recombinante a partir de epítopes de las proteínas GRA7 y GRA8 que sea capaz de detectar con alta sensibilidad y especificidad la fase aguda de toxoplasmosis; para lo cual se realizará un estudio bioinformático completo, que contempla la predicción de epítopes que induzcan una elevada respuesta de anticuerpos; así como el diseño y la evaluación de la estructura de la proteína [24, 25].

3. ESTRATEGIA DE ABORDAJE

El abordaje experimental comenzará con predicciones de epítopes B lineales que coincidan con los servidores ABCpred, BCpred y Discotope 2.0. Luego pasarán por los siguientes criterios de selección: contar con un péptido señal, encontrarse fuera de los dominios transmembrana, alta antigenicidad (>0.5), baja conservación (<30% de homología) en parásitos relacionados y que no se encuentren conservados en humanos. Para ello, se usarán las herramientas SignalP 5.0 (predicción de péptidos señal), TMHMM (predicción de regiones transmembrana), NCBI BLASTp (análisis de homología) y VaxiJen 2.0 (predicción de antigenicidad). Luego de la selección de epítopes, se construirá la proteína con un conector flexible GSGSG para maximizar la estabilidad y reconocimiento de los epítopes [27]. Se procederá a evaluar su antigenicidad, utilizando VaxiJen 2.0 y Protein-Sol para determinar la solubilidad. Para comprender la estabilidad, actividad y naturaleza del constructo; se utilizará la herramienta ProtParam, la cual evalúa diferentes propiedades fisicoquímicas. [32]

Con el objetivo de revisar la estructura de la proteína construida, se utilizará el servidor RaptorX para modelar estructura secundaria y terciaria. Sus ventajas son que no utiliza ninguna información de plantilla y supera a otros servidores; especialmente para proteínas sin homólogos cercanos en PDB o con un perfil de secuencia limitado. [33]. Con el fin de revelar defectos potenciales en el modelo estructural, se realizará un refinamiento con Galaxy Refine que será evaluado mediante gráficos de Ramachandran, seguido de un análisis de validación estructural utilizando el servidor web ProSA. [28].

Para sintetizar la proteína, su gen será insertado en el plásmido pET-28a, expresada en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y purificada por IMAC usando columnas HisTrap. La eficacia del antígeno

multiepitope se comprobará mediante una evaluación serológica. Las muestras serán recolectadas del Hospital de Iquitos “Cesar Garayar García”. Se tendrán dos grupos de estudio: inmunocompetentes e inmunosuprimidos (VIH+) y se clasificarán en infección aguda, crónica y negativos para *T. gondii*. Para ello se utilizarán como pruebas confirmatorias los kits VIDAS® TOXO IgM, VIDAS® TOXO IgG II y VIDAS® TOXO IgG avidity. Los sueros agudos serán aquellos positivos para IgM e IgG (VIDAS® TOXO IgM y VIDAS® TOXO IgG II), y baja avidez IgG (VIDAS® TOXO IgG avidity); mientras que los sueros crónicos serán aquellos IgM negativos, IgG positivos (VIDAS® TOXO IgM y VIDAS® TOXO IgG II) y IgG de alta avidez (VIDAS® TOXO IgG avidity). Una vez producido el antígeno multiepitope, se determinará la sensibilidad y especificidad para cada grupo de sueros mediante un ELISA de IgG, IgM e IgG de avidez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013;114:125-45. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.
2. Hajj RE, Tawk L, Itani S, Hamie M, Ezzeddine J, El Sabban M, El Hajj H. Toxoplasmosis: Current and Emerging Parasite Druggable Targets. *Microorganisms*. 2021; 9(12):2531. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122531>
3. Molan A, Nosaka K, Hunter M, Wang W. Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. *Trop Biomed*. 2019;36(4):898-925.
4. Furtado JM, Smith JR, Belfort R Jr, Gattey D, Winthrop KL. Toxoplasmosis: a global threat. *J Glob Infect Dis*. 2011;3(3):281-4. doi: 10.4103/0974-777X.83536.
5. Rostami A, Riahi SM, Contopoulos-Ioannidis DG, Gamble HR, Fakhri Y, Shiadeh MN, Foroutan M, Behniafar H, Taghipour A, Maldonado YA, Mokdad AH, Gasser RB. Acute *Toxoplasma* infection in pregnant women worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(10):e0007807. doi: 10.1371/journal.pntd.0007807.
6. Bollani L, Auriti C, Achille C, Garofoli F, De Rose DU, Meroni V, Salvatori G, Tzialla C. Congenital Toxoplasmosis: The State of the Art. *Front Pediatr*. 2022;10:894573. doi: 10.3389/fped.2022.894573
7. Rostami A, Riahi SM, Abdollahzadeh Sagha S, Taghipour A, Sepidarkish M, Mohammadnia-Afrouzi M, Ebrahimpour S, Hotez PJ, Gamble R, Gasser RB. Seroprevalence Estimates of Latent and Acute *Toxoplasma* Infections in HIV+ People- Call for Action in Underprivileged Communities. *Microorganisms*. 2021 Sep 26;9(10):2034. doi: 10.3390/microorganisms9102034.
8. Wang ZD, Wang SC, Liu HH, Ma HY, Li ZY, Wei F, Zhu XQ, Liu Q. Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV*. 2017 Apr;4(4):e177-e188. doi: 10.1016/S2352-3018(17)30005-X.
9. Ybañez RHD, Ybañez AP, Nishikawa Y. Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 May 8;10:204. doi: 10.3389/fcimb.2020.00204.

10. Holec-Gasior L. Toxoplasma gondii recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20(9):1343-51. doi: 10.1128/CVI.00117-13.
11. MINSA. Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento de Toxoplasmosis Congénita. Ministerio de Salud. Perú. Versión 3. 2023.
12. Mohamed Z, Hajissa K. Effective Diagnostic Marker for Serodiagnosis of Toxoplasma gondii Infection: New Developments and Perspectives [Internet]. *Toxoplasmosis. InTech*; 2017.
13. ARCHITECT Toxo IgG [prospecto]. Abbott Laboratories. 2009. Disponible en: https://www.ilexmedical.com/files/PDF/ToxoIgG_ARC.pdf
14. Selseleh M, Keshavarz H, Mohebbali M, Shojaee S, Selseleh M, Eshragian MR, Mansouri F, Modarressi MH. Production and evaluation of Toxoplasma gondii recombinant GRA7 for serodiagnosis of human infections. *Korean J Parasitol.* 2012;50(3):233-8. doi: 10.3347/kjp.2012.50.3.233.
15. Sadeghiani G, Zare M, Babaie J, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Fard-Esfahani P, Golkar M. Heterologous production of dense granule GRA7 antigen of Toxoplasma gondii in Escherichia coli. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009 Jul;40(4):692-700.
16. Kotresha D, Poonam D, Muhammad Hafiznur Y, Saadatnia G, Nurulhasanah O, Sabariah O, Tan SY, Izzati Zahidah AK, Rahmah N. Recombinant proteins from new constructs of SAG1 and GRA7 sequences and their usefulness to detect acute toxoplasmosis. *Trop Biomed.* 2012 Mar;29(1):129-37. PMID: 22543613.
17. Teimouri A, Abbaszadeh Afshar MJ, Mohtasebi S, Jafarpour Azami S, Alimi R, Keshavarz H. Assessment of an In-House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and IgG Avidity Test Based on SAG1 and GRA7 Proteins for Discriminating between Acute and Chronic Toxoplasmosis in Humans. *J Clin Microbiol.* 2021 19;59(8):e0041621. doi: 10.1128/JCM.00416-21.
18. Costa JG, Vilariño MJ. Semiquantitative Dot Blot with the GRA8 antigen to differentiate the stages of toxoplasmosis infection. *J Microbiol Methods.* 2018;149:9-13. doi: 10.1016/j.mimet.2018.04.015.
19. Costa JG, Duré AB. Immunochemical evaluation of two Toxoplasma gondii GRA8 sequences to detect acute toxoplasmosis infection. *Microb Pathog.* 2016;100:229-236. doi: 10.1016/j.micpath.2016.09.021

20. Babaie J, Miri M, Sadeghiani G, Zare M, Khalili G, Golkar M. Expression and Single-step Purification of GRA8 Antigen of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2011; 3(2):67-77.
21. Koethe M, Pott S, Ludewig M, Bangoura B, Zöller B, Dauschies A, Tenter AM, Spekker K, Bittame A, Mercier C, Fehlhaber K, Straubinger RK. Prevalence of specific IgG-antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic turkeys determined by kinetic ELISA based on recombinant GRA7 and GRA8. *Vet Parasitol*. 2011; 180(3-4):179-90. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.036.
22. Jean-Pierre V, Miozzo J, Fricker-Hidalgo H, Garnaud C, Robert MG, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP. Serological diagnosis of toxoplasmosis: evaluation of the commercial test recomLine *Toxoplasma* IgG immunoblot (Mikrogen) based on recombinant antigens. *Parasite*. 2022;29:52. doi: 10.1051/parasite/2022050.
23. Dard C, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends Parasitol*. 2016 Jun;32(6):492-506. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.001.
24. Javadi Mamaghani A, Seyyed Tabaei SJ, Ranjbar MM, Haghighi A, Spotin A, Ataee Dizaji P, et al. Designing diagnostic kit for *Toxoplasma gondii* based on GRA7, SAG1, and ROP1 antigens: An in silico strategy. *Int J Pept Res Ther*. 2020; 26(4):2269–83. doi:10.1007/s10989-020-10021-x.
25. Alibakhshi A, Bandehpour M, Sharifnia Z, Kazemi B. The development and evaluation of a multi-epitope antigen as a serodiagnostic marker of *Toxoplasma gondii* infection. *Adv Clin Exp Med*. 2020 Jun;29(6):669-675. doi: 10.17219/acem/104554.
26. Almerco J. Desarrollo de una Proteína Multiepitópica mediante Análisis Inmunoinformático para el Inmunodiagnóstico de Norovirus Gii.4. [Tesis para optar por el Grado de Maestro en Bioquímica y Biología Molecular]. Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017. Recuperado de: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/12220/Desarrollo_AlmercoFranco_Juan.pdf?isAllowed=y&sequence=1
27. Yengo BN, Shintouo CM, Hotterbeekx A, Yaah NE, Shey RA, Quánico J, Baggerman G, Ayong L, Vanhamme L, Njemini R, et al. Immunoinformatics Design and Assessment of a Multiepitope Antigen (OvMCBL02) for Onchocerciasis Diagnosis and Monitoring. 2022; 12(6):1440. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061440>
28. Tahir Ul Qamar M, Rehman A, Tusleem K, Ashfaq UA, Qasim M, Zhu X, Fatima I, Shahid F, Chen LL. Designing of a next generation multiepitope based vaccine (MEV)

- against SARS-COV-2: Immunoinformatics and in silico approaches. PLoS One. 2020;15(12):e0244176. doi: 10.1371/journal.pone.0244176.
29. Simon L, Fillaux J, Guigon A, Lavergne RA, Villard O, Villena I, Marty P, Pomares C; Toxoplasma p35 Study Group. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii*: analysis of false-positive IgG results and implications. Parasite. 2020;27:7. doi: 10.1051/parasite/2020006.
 30. Holec-Gasior L, Ferra B, Drapala D. MIC1-MAG1-SAG1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. Clin Vaccine Immunol. 2012 Dec;19(12):1977-9. doi: 10.1128/CVI.00452-12.
 31. Hajissa K, Zakaria R, Suppian R, Mohamed Z. An evaluation of a recombinant multiepitope based antigen for detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies. BMC Infect Dis. 2017 Dec 29;17(1):807. doi: 10.1186/s12879-017-2920-9.
 32. Garg VK, Avashthi H, Tiwari A, Jain PA, Ramkete PW, Kayastha AM, Singh VK. MFPPI - Multi FASTA ProtParam Interface. Bioinformation. 2016 Apr 10;12(2):74-77. doi: 10.6026/97320630012074.
 33. Wang S, Li W, Liu S, Xu J. RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. Nucleic Acids Res. 2016 Jul 8;44(W1):W430-5. doi: 10.1093/nar/gkw306.

ANEXOS

Tabla 1. Evaluación serológica en ELISA IgG de antígenos recombinantes

Antígeno recombinante	Nro. de muestra y fase de toxoplasmosis	Resultados
GRA4	36 total, 12 agudos, 22 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 58.3% Sensibilidad fase crónica: 18.2%
GRA6	90 total, 33 agudos, 57 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 95.8% Sensibilidad fase crónica: 44.1%
GRA7	117 total, 45 agudos, 72 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 95.9% Sensibilidad fase crónica: 68.9%
GRA8	91 total de 80 mujeres embarazadas, 41 agudos, 50 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 85.3% Sensibilidad fase crónica: 8%
MAG1	117 total, 37 agudos, 80 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 97.3% Sensibilidad fase crónica: 7.5%
SAG2A	60 total, 30 agudos, 30 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 90% Sensibilidad fase crónica: 67%

Fuente: Holec-Gasior L. 2013. [10].

Tabla 2. Evaluación serológica en ELISA IgG de antígenos recombinantes en combinación

Antígenos recombinantes	Nro. de muestras y fase de toxoplasmosis	Resultados
GRA7, GRA8, SAG1	247 total, 88 agudos, 92 crónicos y 53 seroconvertidos	Sensibilidad: 98.4% Especificidad: 95.7%
GRA7, GRA8, SAG2, P25	90 total, 20 agudos, 70 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 90% Especificidad fase aguda: 97% Sensibilidad fase crónica: 1.4%
GRA1, GRA7, SAG1	241 total, 117 agudos, 124 crónicos	Sensibilidad fase aguda: 100% Sensibilidad fase crónica: 91.1%
GRA6, GRA8, SAG2	72 crónicos	Sensibilidad: 88.9% Especificidad: 100%
MAG1, SAG1, GRA5	189 total, 27 agudo, 18 post agudo, 144 crónico	Sensibilidad: 92.6% Especificidad: 100%

Fuente: Holec-Gasior L. 2013. [10].