



**Implementación de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) modificado con nanopartículas para la detección de *Toxoplasma gondii***

Paredes Cedeño, Wilson Fernando

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

Torres Arias, Marbel PhD.

4 de marzo del 2024



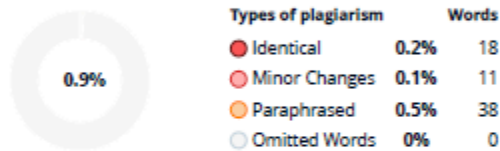
## Plagiarism and AI Content Detection Report

WILSON PAREDES .pdf

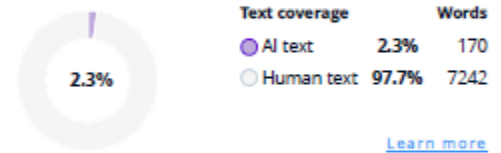
### Scan details

Scan time: March 5th, 2024 at 12:19 UTC      Total Pages: 30      Total Words: 7412

### Plagiarism Detection



### AI Content Detection



### 🔍 Plagiarism Results: (3)

🌐 RI007248.pdf 0.4%  
<https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/7923/1/ri007248.pdf>  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO Facultad de Ingeniería Estructuras híbridas que contienen nanopartículas de oro para biosensado media...

🌐 T574.292 074.pdf?sequence=1&isAllowed=y 0.3%  
<https://repositorio.unisucree.edu.co/bitstream/handle/001/577/t574.292%20o74.pdf?sequence=1&isallowed=y>  
EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES SAG1, GRA7 Y ROP1 EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE ...

🌐 Figure: Ciclo de vida de Toxoplasma gondii - Manuale Merck versión para ... 0.2%  
<https://www.merckmanuals.com/es-us/hogar/multimedia/figure/ciclo-de-vida-de-toxoplasma-gondii>



Firmado electrónicamente por:  
MARBEL TORRES ARTIAS

Torres Arias, Marbel PhD

C. C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Implementación de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) modificado con nanopartículas para la detección de *Toxoplasma gondii***” fue realizado por el señor **Paredes Cedeño, Wilson Fernando**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 4 de marzo del 2024



Firmado electrónicamente por  
MARBEL TORRES ARIAS

.....  
**Torres Arias, Marbel PhD**

C. C: 1802949154



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Paredes Cedeño Wilson Fernando**, con cédula de ciudadanía n° 1725152472, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Implementación de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) modificado con nanopartículas para la detección de *Toxoplasma gondii*** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 4 de marzo del 2024

.....  
**Paredes Cedeño Wilson Fernando**

**C.C.: 1725152472**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo Paredes Cedeño Wilson Fernando, con cédula de ciudadanía n° 1725152472, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Implementación de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) modificado con nanopartículas para la detección de *Toxoplasma gondii*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 4 de marzo del 2024

.....

**Paredes Cedeño Wilson Fernando**

**C.C.: 1725152472**

**Dedicatoria**

A mi madre Miriam, padre Wilson, hija Diana, hermanos Erick, Jenifer, Lupita y tía Jenny. Que cada logro sirva para recordarnos que, con esfuerzo, dedicación y amor, no hay sueño que no podamos alcanzar.

**Wilson Fernando Paredes Cedeño**

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a Dios, por darme la vida, la fortaleza y sabiduría para completar este trabajo. A mis padres, a Miriam por su amor incondicional, su apoyo constante y por enseñarme que, con trabajo arduo, esfuerzo y dedicación los objetivos se pueden conseguir y Wilson quien me enseñó que con la preparación previa siempre es bueno estar en el tiempo y el lugar correctos.

A mi hija Diana, quien es la luz de mis días, que con su inocencia y sonrisa me motiva salir adelante, eres mi mayor inspiración.

A mis hermanos Erick, Lupita y Jenifer, por siempre estar presentes, darme una palabra de aliento en los momentos que resultaron ser difíciles y por compartir conmigo en cada una de las etapas de mi formación, aquellos familiares que, con una llamada, un saludo, me ha hecho sentir que están presentes.

A Marbel Torres, por la apertura que tuvo desde que empecé mi proceso de pasantías en el Laboratorio de Inmunología y Virología, gracias por ser la guía y tutora en todo este tiempo, además de inspirarnos para siempre conseguir mucho más. Andrea y Fernanda, por crear ese ambiente acogedor dentro del laboratorio, lleno de conocimiento, charlas motivadoras y mucho apoyo. A Cristina, por solventar las dudas que se presentaron en ciertos momentos.

Mis compañeros del laboratorio, Paul y Luis, que con sus ocurrencias hicieron de este tiempo más ameno. También a las personas que fui conociendo en este tiempo, Yharome, Keren y Nicole. A mis amigos Oswaldo, Kevin, Carlos, Nathaly, Marol, Katy y Maxi quienes supieron estar cuando más lo necesité gracias por el apoyo.

**Wilson Fernando Paredes Cedeño**

## Índice de contenidos

Resumen .....	12
Listado de abreviaturas .....	14
Capítulo I: Introducción.....	15
Formulación del problema .....	15
Justificación.....	16
Objetivos .....	17
Hipótesis .....	17
Capítulo II: Fundamentación teórica y referencial .....	18
<i>Toxoplasma gondii</i> importancia de estudio .....	18
Morfología y formas infecciosas .....	18
Patogénesis y mecanismo de entrada.....	20
Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
Toxoplasmosis.....	21
SAG 1.....	22
Proceso de invasión de <i>Toxoplasma gondii</i> con SAG 1.....	23
Expresión de proteínas recombinantes.....	24
Espectroscopía Raman .....	26
Aplicación de nanopartículas en ensayos de diagnóstico.....	28
Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para la detección de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29
Nanopartículas de oro en pruebas ELISA .....	30



Capítulo III: Metodología .....	31
Expresión de SAG 1 .....	31
Lisis celular .....	32
Purificación .....	32
Caracterización de proteína recombinante SAG 1 .....	33
Confocal Raman .....	34
Ensayo ELISA .....	34
Síntesis de nanopartículas de oro .....	35
Conjugación de nanopartículas de oro (AuNPs) con la proteína recombinante SAG 1 .....	35
Ensayo ELISA modificado con el uso de nanopartículas de oro.....	35
Capítulo IV: Resultados .....	36
Purificación de SAG 1 .....	36
Síntesis de nanopartículas.....	37
Caracterización de proteína SAG 1 mediante espectroscopia RAMAN .....	39
Comparación de ELISA con el uso nanopartículas de oro.....	40
Capítulo V: Discusión .....	41
Capítulo VI: Conclusiones.....	44
Capítulo VII: Recomendaciones.....	45
Bibliografía .....	46

**Índice de tablas**

Tabla 1 <i>Formas de contraer la infección por T.gondii en humanos</i> .....	22
Tabla 2 <i>Proceso para la producción de una proteína recombinante</i> .....	25
Tabla 3 <i>Técnicas de caracterización de nanopartículas</i> .....	28
Tabla 4 <i>Valores referenciales para los picos del espectro Raman obtenido</i> .....	40

## Índice de figuras

Figura 1 <i>Micrografía de un taquizoíto (a), bradizoíto (b) y esporozoíto (c) de T. gondii. Mediante microscopía electrónica de transmisión</i> .....	19
Figura 2 <i>Ciclo de vida de Toxoplasma gondii</i> .....	21
Figura 3 <i>Mecanismo para que SAG1 regule la invasión de T. gondii y la inmunidad del huésped.</i>	24
Figura 4 <i>Ejemplo de espectro Raman</i> .....	27
Figura 5 <i>Descripción de ELISA con el uso de nanopartículas.</i> .....	30
Figura 6 <i>Purificación de la proteína recombinante SAG 1</i> .....	36
Figura 7 <i>Transferencia Western</i> .....	37
Figura 8 <i>Cambio de coloración a morado característico de la síntesis química por el método de Turkevich</i> .....	38
Figura 9 <i>Lectura de UV - vis, síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) y conjugación de nanopartículas con SAG 1</i> .....	38
Figura 10 <i>Espectro Raman - Caracterización De SAG 1</i> .....	39
Figura 11 <i>Comparación de ELISA utilizando proteína recombinante SAG 1 y conjugado SAG 1 - AuNP</i> .....	41

## Resumen

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Toxoplasma gondii*, este parásito puede infectar tanto animales como humanos. Las mujeres en gestación y personas inmunocomprometida son los más susceptibles a la enfermedad ya que puede provocar complicaciones durante el embarazo, inducir a un aborto o simplemente al transmitirse de manera vertical puede resultar en secuelas neurológicas, oculares y llegando a poner en riesgo la vida del feto. La detección de *T.gondii* puede darse a través de ensayos serológicos, las pruebas más comunes para su diagnóstico son las pruebas ELISA siendo esta una prueba estándar para la detección de *T.gondii*. El antígeno de superficie 1 (SAG 1) es considerado como el antígeno de mayor inmunogenicidad del parásito, se lo encuentra en la etapa de taquizoitos, además de su homología en las tres cepas existentes convierte a SAG 1 como una principal molécula de estudio. El presente proyecto tuvo como objetivo implementar un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) modificado con el uso de nanopartículas de oro para la detección de *Toxoplasma gondii*. Utilizando la proteína recombinante SAG1 como principal antígeno de reconocimiento, mediante espectroscopía Raman fue caracterizada dicha proteína. Mediante la síntesis y el uso de nanopartículas, incrementar la sensibilidad de la prueba para ser comparada con un ensayo sin nanopartículas. De tal manera, se obtuvieron nanopartículas con un pico característico de 526 nm. El espectro Raman presentó picos característicos que indican la presencia de la estructura secundaria de SAG 1. En el conjugado con nanopartículas, se evidenció un aumento en la señal a concentración de antígeno de 0.25 ug/pocillo.

*Palabras clave:* Espectroscopia Raman, Nanopartículas de Oro, Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), Proteína recombinante SAG 1.

### Abstract

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, which can infect both animals and humans. Pregnant women and immunocompromised individuals are most susceptible to the disease as it can cause complications during pregnancy, induce abortion, or simply when transmitted vertically, it can result in neurological and ocular sequelae, and even put the fetus's life at risk. Detection of *T. gondii* can be done through serological assays, with ELISA tests being the most common for its diagnosis, as this is a standard test for the detection of *T. gondii*. Surface antigen 1 (SAG 1) is considered the most immunogenic antigen of the parasite, found in the tachyzoite stage, and its homology in the three existing strains makes SAG 1 a principal molecule for study. This project aimed to implement an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) modified with the use of gold nanoparticles for the detection of *Toxoplasma gondii*. Using the recombinant SAG1 protein as the main recognition antigen, this protein was characterized by Raman spectroscopy. Through the synthesis and use of nanoparticles, the sensitivity of the test was increased to be compared with an assay without nanoparticles. In this way, nanoparticles with a characteristic peak of 526 nm were obtained. The Raman spectrum showed characteristic peaks indicating the presence of the secondary structure of SAG 1. In the conjugate with nanoparticles, an increase in the signal was evidenced at an antigen concentration of 0.25 ug/well.

*Key words:* Raman Spectroscopy, Gold Nanoparticles, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Recombinant SAG 1 Protein.

### Listado de Abreviaturas

**SAG 1:** Antígeno de superficie 1 de *Toxoplasma gondii*

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos

**kDa:** Kilodalton

**LB:** Medio Luria Bertani

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**IPTG:** Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido IMAC

**IMAC:** Immobilized Metal Affinity Chromatography

**ELISA:** Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzima

**PAGE:** Electroforesis en gel de Poliacrilamida (Polyacrylamide gel electrophoresis).

**Pb:** pares de bases

**PBS:** buffer fosfato salino

**PDB:** Protein Data bank

**RPM:** Revoluciones por minuto

**S100A6:** Proteína A6 de Unión a Calcio de la Familia S100

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**SAG1:** Antígeno de superficie 1

**TCD8:** Los linfocitos T CD8 o citotóxicos

**IL-2:** Interleucina 2

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

Los primeros informes de Toxoplasmosis congénita surgieron en la década de 1940, donde se genera la importancia en la salud humana para la infección por *Toxoplasma gondii* (Zhao & Ewald, 2020). Para 1973 luego de conocerse el ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), la toxoplasmosis empezó a ser un problema, afectando a las personas con enfermedades neoplásicas, siendo de mayor reconocimiento y potencialmente mortal (de Barros et al., 2022). Los principales síntomas de la infección grave son: fiebre, encefalitis o absceso cerebral y en ocasiones neumonía, a diferencia de los síntomas en los individuos sanos, que en ocasiones suele ser asintomática (Hakes & Armstrong, 1983).

*T. gondii* afecta a casi un tercio de la población mundial, teniendo porcentajes de prevalencia dentro de cada uno de los continentes, esto genera una importancia de estudio, ya que este parásito al ser capaz de infectar a las células nucleadas de los animales homeotérmicos genera principalmente la afección denominada Toxoplasmosis (Pazoki et al., 2021). Está considerada como un problema y amenaza en la salud pública, generando importantes pérdidas económicas tanto para la industria ganadera en el caso de darse un brote y generar problemas importantes en la salud humana (Yu et al., 2023).

## Justificación

Es común el uso de proteínas recombinantes, para ser utilizada como una molécula de detección y reconocimiento en inmunoensayos presentándose como ensayos mucho más seguros y específicos (Spencer et al., 2007). Su producción se ha establecido como una herramienta indispensable en los procesos dentro de ingeniería genética y se la hace a través de la tecnología de ADN recombinante (Rosano & Ceccarelli, 2014). Una clonación correcta de vectores garantiza su proceso de plegamiento, validando así su función biológica, permitiendo la obtención de proteínas puras, que son de uso en estudios estructurales permitiendo su caracterización hasta aplicaciones terapéuticas (Wingfield, 2015).

El uso de esta tecnología ha permitido avances en el área del desarrollo biotecnológico e investigación al momento de generar pruebas de diagnóstico, ensayos inmunoenzimáticos, tales como ELISA, Western Blot e inmunohistoquímica (Chen et al., 2021). La importancia de generar pruebas inmunoenzimáticas que tengan altos niveles de sensibilidad, al ser empleadas pequeñas cantidades de antígeno representa una alternativa de potencialización de estas pruebas (Park et al., 2009). Es por ello por lo que el uso de nanopartículas ha permitido generar pruebas con límites de detección bajos, debido a que existe una mayor cantidad de presentación del antígeno por ende la cantidad de reconocimiento será mayor (Billingsley et al., 2017). Las nanopartículas se muestran como una principal alternativa para aumentar los valores de sensibilidad además de ayudar a que sus análisis sean rápido, preciso y se pueda generar un diagnóstico adecuado para el reconocimiento de una molécula de interés y por ende la detección de una enfermedad (hamshary et al., 2020; Tabatabaei et al., 2021).



## Objetivos

### Objetivo General

- Implementar un ensayo de inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA) modificado con nanopartículas para la detección de *Toxoplasma gondii*.

### Objetivos específicos

- Determinar la estructura molecular de la proteína recombinante SAG 1 de *Toxoplasma gondii* a través espectroscopia Raman
- Desarrollar el uso de nanopartículas de oro (AuNP) para incrementar la sensibilidad del ELISA.
- Comparar las pruebas ELISA y el ELISA modificada con nanopartículas para la detección de *Toxoplasma gondii*.

### Hipótesis

El uso de nanopartículas de oro (AuNP) aumenta la sensibilidad del ensayo de inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA) para la detección de *Toxoplasma gondii*.

## Capítulo II: Fundamentación teórica y referencial

### ***Toxoplasma gondii* importancia de estudio**

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), es el principal agente parasitario causante de la toxoplasmosis, la cual es una de las zoonosis más comunes a nivel mundial (Tenter et al., 2000). Es un protozooario intracelular obligado que prevalece ampliamente en humanos y animales teniendo tasas de mortalidad y morbilidad significativas en pacientes inmunocomprometidos (Terkawi et al., 2013). Su transmisión puede ser de manera vertical, en forma de taquizoitos que pasan al feto a través de la placenta durante el embarazo o puede darse un proceso de transmisión horizontal, aquí implica tres etapas del ciclo de vida, la ingestión de ooquistes infecciosos del medio ambiente, la ingestión de quistes tisulares o taquizoitos que se encuentran en la carne visceral de muchos animales y la transmisión por taquizoitos ya sean por productos sanguíneos, trasplantes de tejidos o leche no pasteurizada (Tenter et al., 2000).

La especie hospedadora clave en el ciclo de vida de *T. gondii*, son los félidos, ya que son los únicos huéspedes que excretan el ooquiste en sus heces, siendo esta la etapa ambientalmente resistente del parásito, el parásito puede infectar a los humanos y todos los animales de sangre caliente incluyendo a las aves y mamíferos como huéspedes intermediarios (Jones & Dubey, 2012).

### **Morfología y formas infecciosas**

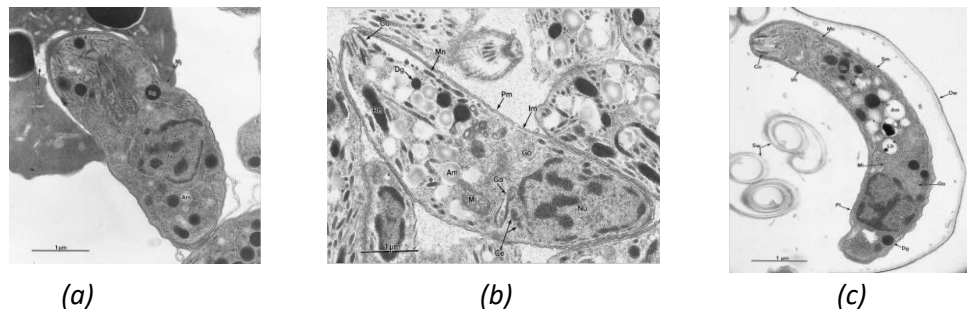
*T. gondii*, pertenece al phylum apicomplexa, se encuentra clasificado como un coccidio intestinal y presenta tres formas infecciosas; taquizoitos, bradizoitos y esporozoitos (Dubey et al., 1998).

- **Taquizoitos:** El nombre se genera a partir de la palabra griega, “tachos” cuyo significado es velocidad, haciendo referencia a la etapa rápida en la que se multiplica en cualquier célula huésped intermediaria y de manera definitiva en células epiteliales, su forma es de medialuna con un extremo superior puntiagudo (apical) e inferior redondeado (**Figura 1 a**)

(Dubey et al., 1998). Tienen la capacidad de invadir prácticamente todos los tipos de células de los vertebrados y se multiplican en una vacuola parasitófora (Gangneux & Dardé, 2012).

### Figura 1

*Micrografía de un taquizoíto (a), bradizoíto (b) y esporozoíto (c) de T. gondii. mediante microscopía electrónica de transmisión.*



*Nota:* Tomado de Wang, Y., & Yin, H. (2014). Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 7, 180. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>

- **Bradizoito:** Su estructura es ligeramente similar a la de los taquizoitos ya que estos poseen un núcleo situado hacia el extremo inferior mientras que en los taquizoitos se encuentra mucho más centrado (**Figura 1 b**) (Wang & Yin, 2014). Tienen un metabolismo latente, adaptado a la supervivencia a largo plazo y solo la muerte de la célula hospedadora puede provocar la ruptura del quiste y liberación de bradizoitos, además de su resistencia a la pepsina que permite su transmisión por ingestión (Gangneux & Dardé, 2012).
- **Esporozoito:** Finalmente, el esporozoito es similar al taquizoíto, con la diferencia que en el primero hay abundancia de micronemas (MIC), roptrias y gránulos de amilopectina (Dubey et al., 1998). Los esporozoitos presentan su forma de medialuna, su forma más alargada y con un núcleo subterminal (**Figura 1 c**). Estos se encuentran en los ooquistes maduros, que

tienen una estructura robusta para proteger al parásito de daños mecánicos y químicos y permite que el parásito sobreviva durante largos periodos en ambientes húmedos (Gangneux & Dardé, 2012).

### **Patogénesis y mecanismo de entrada**

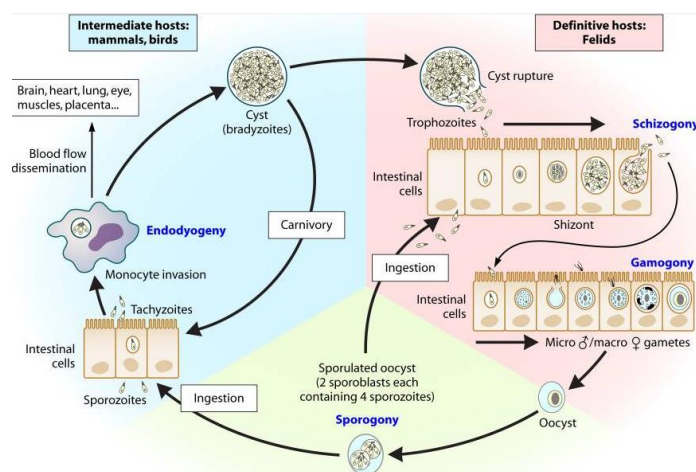
La transmisión de la enfermedad puede darse a través del agua, alimentos contaminados y la ingestión de carne contaminada con quistes tisulares, las principales zonas donde se albergan son, el cerebro y los músculos de los huéspedes intermediarios (S. Al-Malki, 2021). El quiste tisular al ser ingerido es digerido a través de diversas actividades enzimáticas propias del estómago del huésped, liberando al parásito en la forma de bradizoito (Dubey et al., 1998). Una vez liberado, este, debido a su resistencia a proteasas puede sobrevivir en el intestino delgado del huésped, en gatos, en posteriores semanas pueden ser liberados más de 10 millones de quistes a través de la materia fecal, para que luego de cinco días se esporulen y permanezcan vivos en los suelos por un año aproximadamente (S. Al-Malki, 2021).

### **Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii***

*T. gondii*, tiene un ciclo de vida heteroxeno facultativo, donde el tipo de reproducción varía, ya que en huéspedes definitivos se da de manera sexual, mientras que en huéspedes intermediarios se da de manera asexual (Delgado et al., 2022). De esta manera, la actividad de *T. gondii* en los hospedadores definitivos, en este caso de la familia Felidae de sostener la fase sexual se relaciona con la ausencia de la actividad intestinal delta-6-desaturasa, lo cual resulta en grandes concentraciones ácido linoleico en los enterocitos (Genova et al., 2019).

Figura 2

Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*



*Nota:* Explicación acerca del ciclo de vida de *T. gondii*, en los hospederos definitivos y los hospederos intermedios. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346298/>

## Toxoplasmosis

Es una enfermedad zoonótica, causada por *T. gondii*, las causas pueden darse de manera directa e indirecta al tener contacto con las heces de los gatos contaminados, por su consumo ya sea en alimentos mal cocinados y agua contaminada (**Tabla 1**) (Gangneux & Dardé, 2012). Es una enfermedad poco común y se la considera como desatendida, la mayoría de las infecciones en humanos son asintomáticas (Madireddy et al., 2024). Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos los principales síntomas dependen del lugar de localización del parásito, además de la fase en la que se encuentre el parásito al momento de ingresar en el huésped, sea esta en una infección aguda, una posible reactivación y de manera congénita (Jones & Dubey, 2012).

En el caso de haber sido obtenida la enfermedad de manera congénita, se pueden tener síntomas a nivel ocular, ya sea dolor de ojo, visión borrosa o procesos de ceguera, para los casos en los que la enfermedad es aguda, se pueden presentar síntomas como fiebre, fatiga, dolores musculares, ganglios

linfáticos inflamados, dolor de garganta y hepatoesplenomegalia (Madireddy et al., 2024). En cualquiera de los casos la toxoplasmosis puede ser tratada en combinación con medicamentos antiparasitarios y antibióticos. Se utiliza pirimetamina, sulfadiazina, autovacuna, la espiramicina y la clindamicina (Mashayekhi et al., 2011).

**Tabla 1**

*Formas de contraer la infección por T.gondii en humanos*

	<b>Tipo de Transmisión</b>	<b>Proceso de contaminación</b>
1	Transmisión Alimentaria	Ingestión de quistes tisulares mediante el consumo de carne cruda o poco cocida
2	Transmisión zoonótica	Ingestión de ooquistes mediante el consumo de alimentos y agua contaminados con heces felinas
3	Transmisión vertical	La madre infectada provoca una infección congénita a través de la placenta
4	Trasplantes	Transmisión mediante trasplante de órganos o transfusión sanguínea

Nota: Diferentes tipos de formas de contraer la infección por *T.gondii*. Tomada de: Madireddy, S., Rivas

Chacon, E. D., & Mangat, R. (2024). Toxoplasmosis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563286/>

### **SAG 1**

Es el antígeno de superficie 1 (SAG 1), es una proteína de superficie, altamente inmunogénica y abundante en taquizoitos, es la principal que estimula al huésped para la generación de la inmunidad humoral y celular (Pagheh et al., 2020). SAG 1 se encuentra en abundancia en la superficie de los taquizoitos, siendo este el ligando crucial de *T. gondii* en promover la invasión y permitir la unión de los taquizoitos a los receptores del huésped (Wang & Yin, 2014). Además, que desempeña un papel crucial como blanco inmunogénico, estimulando una respuesta inmunitaria potente (Black & Boothroyd, 2000).

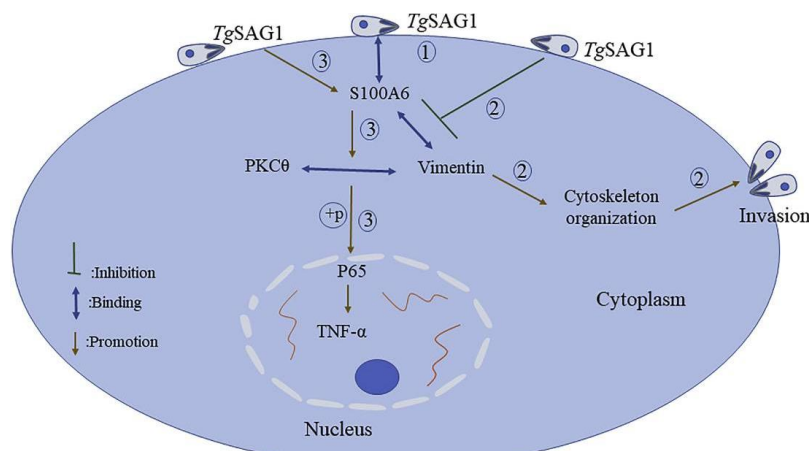
Algunos taquizoitos pueden evadir esta respuesta inmune y, persisten en el organismo al transformarse en bradizoitos. (Madireddy et al., 2024). Los bradizoitos se desarrollan principalmente en los tejidos nerviosos y musculares humanos, donde adoptan una forma latente, al tener esta capacidad de permanecer inactivos en el huésped a lo largo de su vida representa un aspecto intrigante de la biología del parásito, contribuyendo a la complejidad de la infección por el mismo (Wang & Yin, 2014). La adherencia de *Toxoplasma* a las células huésped puede verse influenciada por los cambios conformacionales de SAG 1, además que su invasión puede deberse a varios factores, tales como SAG 2 y SAG 3 que al encontrarse cerca de SAG 1 en la membrana, pueden facilitar la rápida invasión por parte del parásito (Zinecker et al., 2001). Al ser una principal molécula diana, se la ha estudiado de tal manera que se la pueda utilizar en los procesos de detección, tanto en pruebas serológicas, como en el uso para la generación de vacunas contra *T. gondii* (Pagheh et al., 2020).

### **Proceso de invasión de *Toxoplasma gondii* con SAG 1**

Las principales células que actúan contra la infección de *Toxoplasma* al momento de ingresar son las TCD8, siendo este proceso coordinado por citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$  (Wang & Yin, 2014). *T. gondii* se une a la célula huésped, donde SAG 1 está directamente relacionada con la proteína S100A6, inhibiendo en una invasión con el parásito, por lo cual SAG1 podría regular la unión con vimentina y S100A6, luego la organización del citoesqueleto durante la infección por *T. gondii* (**Figura 3**) (Lai & Lau, 2018). Finalmente, SAG1 puede regular la expresión de TNF- $\alpha$  a través de la vía de señalización S100A6-vimentina/PKC $\theta$ -NF- $\kappa$ B (Zhou et al., 2021).

### Figura 3

Mecanismo para que SAG1 regule la invasión de *T. gondii* y la inmunidad del huésped.



Nota: Tomado de: Zhou, L.-J., Peng, J., Chen, M., Yao, L.-J., Zou, W. H., He, C. Y., & Peng, H.-J. (2021).

Toxoplasma gondii SAG1 targeting host cell S100A6 for parasite invasion and host immunity. *iScience*, 24(12), 103514. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103514>

### Expresión de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes son aquellas que se producen a través de la tecnología del ADN recombinante, la cual es una tecnología fundamental en biotecnología (Gupta et al., 2016). Permite la manipulación genética de organismos para producir moléculas de ADN que contienen secuencias de genes de diferentes fuentes (Brondyk, 2009). Esta técnica ha transformado la investigación biológica, la medicina y la agricultura, proporcionando herramientas poderosas para estudiar genes, producir proteínas específicas y modificar características genéticas (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Esta tecnología resulta importante y tiene varias aplicaciones tanto en medicina, agricultura e industria, siendo de manera general un proceso que incluye la toma de un gen de interés, la clonación



del vector de expresión, la transformación del sistema de interés, la inducción y finalmente la purificación y caracterización de la proteína (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Este proceso se los indica de manera esquemática en la (**Tabla 2**):

**Tabla 2**

*Proceso para la producción de una proteína recombinante*

<b>Proceso</b>	<b>Descripción</b>
Diseño y Síntesis del Gen	Inicialmente se realiza un estudio de la proteína que necesito, se de tal manera que se pueda diseñar y sintetizar el gen que codifica la proteína de interés. Este se inserta en un vector de clonación, la misma que es una molécula de ADN que puede replicarse dentro de una célula huésped (Kamionka, 2011).
Transformación	El vector de clonación se introduce en una célula huésped, como una bacteria o una levadura. Este proceso se conoce como transformación (Ferrer-Miralles et al., 2009).
Cultivo y Expresión	Estas células transformadas se cultivan. Durante durante un tiempo determinado y se induce donde el gen recombinante se expresa y la proteína de interés se produce (Wurm, 2004).
Purificación	La proteína recombinante se purificó a partir del medio de cultivo o del interior de las células huésped (Wurm, 2004).
Caracterización	Finalmente, la proteína recombinante se caracteriza para confirmar su identidad y evaluar su actividad (Wurm, 2004).

## **Cromatografía de afinidad**

Una de las técnicas que se utiliza es la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), este es un método utilizado para la purificación de proteínas recombinantes después de un proceso de expresión y lisado en *Escherichia coli* (Wurm, 2004). Su funcionamiento se debe a que en la secuencia con la que es diseñado el gen de interés a expresar que luego será introducido en el huésped, se introduce la secuencia de una etiqueta de Hexa histidina (Samuelson, 2016). De tal manera que se ofrece una alta afinidad hacia metales inmovilizados como níquel y cobalto por lo que permite una fácil purificación y detección de la proteína de interés (Bornhorst & Falke, 2000). *E. coli* y otros organismos de expresión dependen de muchas proteínas esenciales con cofactores metálicos, y estas proteínas endógenas que se unen a metales pueden también unirse a resinas IMAC y complicar el aislamiento (Wingfield, 2015). Las proteínas solubles se pueden recuperar con buenos rendimientos y las proteínas insolubles, que deben sufrir un ciclo de desnaturalización y plegamiento, se pueden recuperar con rendimientos mucho menores (McPherson & Gavira, 2013). Por lo que se debe usar biorreactores a pequeña escala y equipos de procesamiento a escala de laboratorio, las proteínas generalmente se pueden producir en cantidades suficientes para iniciar la mayoría de los estudios que incluyen determinaciones estructurales detalladas de la proteína objetivo (Petty, 1996).

## **Espectroscopía Raman**

La espectroscopia Raman es una técnica analítica utilizada para obtener información sobre la estructura molecular, fase, polimorfismos, cristalinidad, interacciones y la composición química de una muestra (Kuhar et al., 2021). Esta se basa en el principio de dispersión inelástica de la luz, en el que los fotones interactúan con las moléculas y cambian su energía (Adar, 2022).

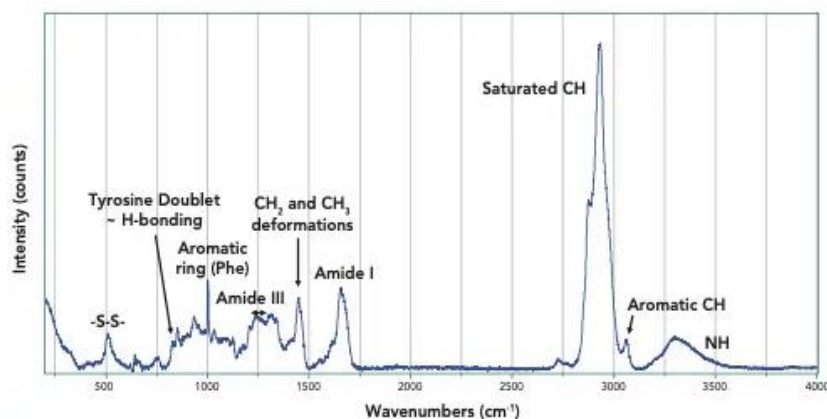
Existen equipos que utilizan el principio de la espectroscopia Raman, ayudando a la caracterización química y estructural de diversos materiales entre ellas las proteínas.

Cuando la luz incidente interactúa con una muestra, una pequeña fracción de los fotones se dispersa de manera inelástica, estos fotones dispersados tienen una energía diferente a la de la luz incidente y contienen información sobre las vibraciones moleculares y los modos de excitación de la muestra (Adar, 2022). La espectroscopia Raman se utiliza en una amplia gama de campos, como la química, la física, la biología y la ciencia de materiales. Es especialmente útil en la identificación de compuestos orgánicos e inorgánicos, la caracterización de materiales, el análisis de muestras biológicas y la monitorización de reacciones químicas (Ojeda-Galván et al., 2023).

Los espectros Raman resultantes muestran picos que corresponden a las vibraciones moleculares de la muestra, lo que permite su identificación y análisis (**Figura 4**).

#### Figura 4

*Ejemplo de espectro Raman*



*Nota:* Tomado de: Ojeda-Galván, H. J., et al. Application of Raman spectroscopy for the determination of proteins denaturation and amino acids decomposition temperature. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 285, 121941. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121941>

### Aplicación de nanopartículas en ensayos de diagnóstico.

Las nanopartículas son partículas con dimensiones medidas en nanómetros (nm), tienen un tamaño mucho menor que la mayoría de las células biológicas y tienen propiedades únicas debido a su tamaño (Ramos et al., 2013). Las nanopartículas pueden ser de varios tipos, incluyendo nanopartículas de metal, nanopartículas de óxido metálico, nanopartículas de carbono, siendo las de oro las más usadas en aplicaciones en el área biomédica (Ramos et al., 2013; Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020).

Las nanopartículas tienen características que las distinguen de cualquier otro tipo de molécula, tanto en forma y tamaño, superficie de contacto y propiedades ópticas (Gill et al., 2007; Ramos et al., 2013). Las nanopartículas muy pequeñas, menores a 100 nm en tamaño, pueden tener varias formas, de manera esféricas, tubulares, y planas (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020). Propiedades Ópticas, Magnéticas, y Electrónicas, pueden tener propiedades ópticas, magnéticas, y electrónicas únicas que no se observan en materiales de mayor tamaño.

Existen formas de identificar y caracterizar cuando una nanopartícula se ha formado, las mismas que se presentan en (**Tabla 3**).

**Tabla 3**

#### *Técnicas de caracterización de nanopartículas*

<b>Técnica</b>	<b>Descripción</b>
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	Esta técnica proporciona imágenes de alta resolución de la superficie de las nanopartículas, permitiendo la determinación de su tamaño y forma (Vladár & Hodoroba, 2020).
Espectroscopia de Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	Esta técnica mide el tamaño de las nanopartículas en solución, basándose en las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada (Titus et al., 2019)

Análisis de Superficie Química

Las técnicas como la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) y la espectroscopia infrarroja (FTIR) pueden utilizarse para analizar la composición química de la superficie de las nanopartículas (Singh, 2016).

Técnicas de Análisis Térmico

Estas técnicas, como la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis termogravimétrico (TGA), pueden proporcionar información sobre la estabilidad térmica de las nanopartículas (Aldana et al., 2005.).

---

### **Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para la detección de *Toxoplasma gondii***

La prueba de ELISA es una técnica ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra patógenos (Balsari et al., 1980). Se pueden dividir en cuatro tipos principales: directo, indirecto, sándwich y competitivo, sin embargo, todos los tipos utilizan una técnica colorimétrica para cuantificar el analito de interés en una muestra líquida basada en una reacción antígeno-anticuerpo, con el complejo antígeno/anticuerpo en una fase inmovilizada (Liyanage et al., 2021).

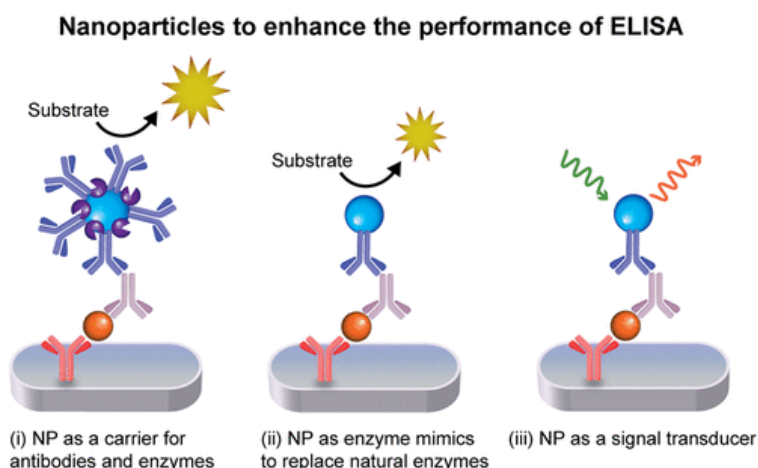
El proceso de desarrollo que se da en este tipo de ensayos se puede cuantificar, a través de la interacción entre anticuerpos específicos al unirse a un antígeno de interés y finalmente la unión de un anticuerpo marcado con una enzima que generará una coloración y podrá generarse una cuantificación (Alhadj et al., 2024). Para el diagnóstico de toxoplasmosis, se han desarrollado varios sistemas de ELISA para el diagnóstico de la toxoplasmosis en humanos, incluyendo la detección de anticuerpos IgM e IgA y la evaluación de la afinidad de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno de *Toxoplasma* (Kauter et al., 2023).

## Nanopartículas de oro en pruebas ELISA

La implementación de una prueba de ELISA modificada con nanopartículas para mejorar la sensibilidad y especificidad de la detección de *Toxoplasma* (Jelen et al., 2023). Esta técnica utiliza nanopartículas como plataformas para la inmovilización de antígenos de *Toxoplasma* y la detección de anticuerpos específicos además de incrementar su sensibilidad del diagnóstico (Tsurusawa et al., 2021). Es necesario contar con métodos de funcionalización de proteínas a las nanopartículas, con la finalidad de aplicarlos dentro de las pruebas ELISA (Sun et al., 2023). Existen 4 métodos, los cuales son de adsorción directa de la proteína mediante interacciones electrostáticas e hidrófobas, la conjugación direccional donde se utiliza un conector heterobifuncional, la conjugación covalente utilizando polietilenglicol y un método de carbodiimida (Gao et al., 2020). Dependiendo del tipo de conjugación elegida se podrán utilizar técnicas de caracterización de materiales para detectar el pico de la nanopartícula en contraste con el conjugado observado por UV – vis (Amle et al., 2023).

### Figura 5

*Descripción de ELISA con el uso de nanopartículas.*



*Nota:* Ilustración esquemática de las funciones de las nanopartículas (NP) en la mejora del rendimiento del ELISA tradicional. Tomado de Gao, Y., Zhou, Y., & Chandrawati, R. (2020). Metal and Metal Oxide Nanoparticles to Enhance the Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *ACS Applied Nano Materials*, 3(1), 1-21. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b02003>

### Capítulo III: Metodología

Los estudios realizados fueron llevados a cabo en los laboratorios de Inmunología y Virología, y en el Centro de nanociencia y nanotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). En conjunto con los laboratorios de caracterización de materiales en la universidad YACHAY.

#### Expresión de SAG 1

Se inoculó la colonia BL21 recombinante (SAG 1) a medio sólido Agar LB suplementado con ampicilina (100 mg/mL). Seguido, se tomó la colonia de BL21 recombinante, se colocó en 2 mL de medio líquido LB dejando en incubación a 37°C durante toda la noche.

Para la preparación del pre-inóculo, se seleccionó una colonia aislada del medio sólido y sembró en 2mL de medio líquido LB suplementado con ampicilina para posteriormente dejar en incubación a 37°C y 210 rpm durante toda la noche.

Al día siguiente, en un matraz Erlenmeyer de 500 mL fueron colocados 50 ml de medio LB y Ampicilina 100 ug/mL, garantizando la proporción de Oxígeno 1:10. Se colocaron los 2 mL de BL21 del pre-inóculo. Se dejó incubar por 1h y 30 min a 37°C a 227 rpm y medir la absorbancia OD600 entre 0.6 - 0.7.

Una vez obtenida la absorbancia adecuada se procedió a inducir con IPTG 1 mM y se incubó durante 3 horas 37°C a 227 rpm. Se recuperó el cultivo en 1 tubo de 50 mL fue centrifugado a 3000 rpm por 20 min a 4°C.

### **Lisis Celular**

Se utilizó un Buffer de Lisis (Tris HCl 50mM pH 7.5; NaCl 100 mM; Beta Mercaptoetanol 0.05mM; glicerol 5%), fue resuspendido el pellet colocando en relación 750 uL por cada 25 mL de cultivo. Con la ayuda del Ultraturrax se sometió a la muestra a lisis mecánica, por tiempos de 10 segundos por 5 veces. La muestra se mantuvo en hielo, se centrifugó el producto de lisis a 10000 rpm por 15 minutos.

### **Purificación**

En un tubo de 5 mL estéril, se tomó 1 mL de resina de Níquel HisPur Ni-NTA Resin (thermo scientific). Inmediatamente se centrifugó a 2500 rpm por 2 min, estas condiciones se mantuvieron por todo el protocolo. Se retiró el etanol que se encontraba como sobrenadante. Posteriormente se equilibró la columna con buffer de equilibrio, pH = 7.3, se homogeneizó por inversión por un tiempo de 2 min para ser centrifugadas. La muestra fue tratada de tal manera que tenga una concentración de imidazol de 5 mL, seguidamente se unió 1.5 mL lisis de proteína SAG 1 y la resina antes equilibrada en agitación por 1h. Para cada uno de los procesos mencionados a continuación se realizó la homogenización por 2 minutos y centrifugación a 2500 rpm por 2 minutos.

Se recolectó el sobrenadante de la fracción negativa y fue guardado en un vial de 1.5 mL. Fue colocado 1.5 mL de buffer de lavado pH=7.3, fue homogenizado y se centrifugó para luego ser recolectado el sobrenadante, de igual manera se lo hizo con el buffer de lavado pH=6 , pH = 5.3 y pH = 4, siendo el último el buffer de elución.



## Caracterización de proteína recombinante SAG 1

### SDS PAGE

Se elaboró un gel de poliacrilamida al 4% para el gel de concentración y al 10% el gel de separación, se prepararon las muestras en condiciones reductoras colocando buffer de carga 4X a una relación con SAG1 de 3:1. La corrida electroforética se hizo a 110 voltios por 90 minutos.

Luego de la corrida electroforética, se realizó la transferencia en semi seco, en el equipo TransBlot turbo (Bio - Rad). Previo a la transferencia se equilibró en buffer de transferencia la membrana de nitrocelulosa, el papel Whatman y el gel de electroforesis. Para luego armar el sándwich de transferencia de tal manera que encima del polo positivo se coloque el siguiente esquema: papel Whatman, membrana, gel de poliacrilamida, papel Whatman. Con la ayuda de un rodillo se removieron las burbujas y se cerró el sistema. El casete fue colocado en el equipo y se programaron 3 ciclos de 2.5 A y 25 V durante 7 minutos. Para verificar la transferencia, fue teñida la membrana con rojo Ponceau y fue lavada con agua destilada. El marcador de peso molecular fue separado para un tratamiento diferente. La membrana fue colocada en solución de bloqueo (BSA 5% en buffer TBS + Tween 20 0.1%), la misma que fue incubada por 1h. Luego del tiempo de bloqueo, fue lavada con buffer TTBS (TBS + Tween 20 0.1%). La membrana fue incubada con el anticuerpo primario (suero positivo) el mismo que fue preparado en buffer TTBS con BSA al 3% a una dilución 1/1000 e incubado overnight. La membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (anti-human), el mismo que se preparó en TTBS a una dilución 1/8000 e incubado por 1h para finalmente lavarlo con TTBS por 6 veces.

Finalmente, se preparó el sustrato con el kit Clarty ECL western substrate en proporción 1:1 un volumen de 1mL, la membrana fue colocada en un protector de hojas, se incubó con el sustrato por 5 minutos y se realizó la lectura en el equipo ChemiDoc MP.

## **Confocal Raman**

Para el análisis Macro la muestra de proteína fue leída en el equipo confocal Raman Imaging & High Resolution Spectrometer RAMAN (Lab RAM Odyssey) ubicado en el laboratorio de caracterización de materiales de la universidad Yachay. Para ello se colocó 700 uL de muestra de proteína recombinante en estado líquido en una cubeta cuarzo de 1000 uL, de la misma manera se hizo con la muestra de la conjugación de proteína con nanopartículas de oro. Cada una de las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 633 con una intensidad del 50%. Inicialmente se realizó la lectura del PBS 1X, compuesto en el que se encuentra diluida la proteína, seguido del análisis de la muestra de proteína y finalmente la conjugación nanopartículas - proteínas. Para el análisis Micro, fueron colocados 3 uL de PBS, proteína SAG 1 y la conjugación SAG-AuNP en tres puntos distintos de la superficie de una placa de grafeno, inicialmente fue encontrado señal para luego hacer la lectura a la longitud de onda de 633 con una intensidad del 50%.

## **Ensayo ELISA**

Se sensibilizó la placa de 96 pocillos preparando buffer carbonato bicarbonato (0.1M pH 9.6). Luego se preparó SAG 1 a una concentración inicial de 0.5 ug/pocillo. La placa fue sensibilizada con 100 uL en cada pocillo. La placa fue incubada a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el lavado, donde fue llenado cada uno de los pocillos con 300 uL por 3 veces. Se preparó la solución de bloqueo (BSA 5% en PBS 1x), se dejó incubar por 1 hora, luego se realizó el respectivo lavado 3 veces. A continuación se preparó el anticuerpo primario (BSA 2.5%; 1/2000 Ac.primario), fueron colocadas las soluciones de acuerdo en el plan de placa e incubado por 1h30. A 37°C. Se realizaron los lavados correspondientes y se incubó el conjugado por 2 horas, finalmente se hizo el lavado, se colocó el sustrato TMB (3, 3', 5, 5' - Tetramethylbenzidine), se dejó incubar por 15 minutos, luego medir espectrofotometría 370 nm y detener la reacción con HCl al 2N a una absorbancia de 450 y 650 nm.

### **Síntesis de Nanopartículas de Oro**

El método fue el de Turkevich, tomado de un protocolo estandarizado en el laboratorio de inmunología y virología, se inició con la limpieza de un balón de 3 bocas, una solución de ácido nítrico y dejando por toda la noche. Posteriormente se preparó una solución de citrato de sodio 0.1% pH 8. A baño maría caliente con la solución de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ), a un volumen de 10 mL por 10 min a 250°C. Pasado el tiempo se agregó 1 mL de la solución de citrato y se colocó en agitación por 20 min. Luego estas nanopartículas fueron analizadas por Uv-vis.

### **Conjugación de Nanopartículas de oro (AuNPs) con la proteína recombinante SAG 1**

La proteína SAG1 a una concentración de 0.185mg/mL se conjugó con nanopartículas de oro a una lectura del OD inicial de 1. Se debe llegar a una cantidad de proteína de 300 ug, en 2 mL de nanopartículas OD 1. y dejó temperatura ambiente por 24 horas, para luego ser identificada su conjugación por UV - vis, esperando un pico en el rango de 520 - 550 nm en que corresponde a la sal de oro.

### **Ensayo ELISA modificado con el uso de nanopartículas de oro**

Se llevó a cabo la preparación de buffer carbonato bicarbonato (0.1M pH 9.6) para realizar la sensibilización de la placa con SAG 1 y AuNP-SAG1, se colocó la cantidad inicial de 0.5 ug/pocillo y fue sensibilizada con 100 uL por pocillo por duplicado hasta 0.25 ug/pocillo de acuerdo con el plan de placa. Fue incubada a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se procedió con los lavados con 300 uL por 3 veces. Se preparó la solución de bloqueo con leche descremada al 5%, la cual se dejó incubar por 1 hora, luego se realizó 3 lavados. A continuación, se preparó el anticuerpo primario a una dilución inicial de 1/50 con leche descremada al 2.5% y fue incubado por 1h30. A 37°C. Se realizaron los lavados correspondientes y se incubó el conjugado por 2 horas, finalmente se hizo el lavado, se colocó el

sustrato TMB, se dejó incubar por 15 minutos para luego ser medida a través de espectrofotometría 370 nm y detener la reacción con HCl al 2N a una absorbancia de 450 y 650 nm.

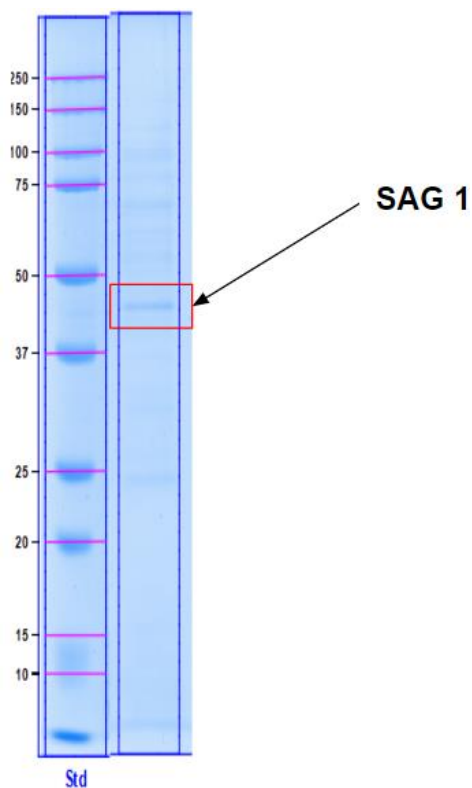
## Capítulo IV: Resultados

### Purificación de SAG 1

SDS PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% se obtuvo el siguiente patrón de bandas, dando como resultado en una proteína purificada de 40 KDa, indicando la presencia de la proteína recombinante SAG 1. La concentración de proteína a partir de un cultivo de bacteria transformada 50 mL que se obtuvo fue de 0.185mg/mL.

**Figura 6**

*Purificación de la proteína recombinante SAG 1*

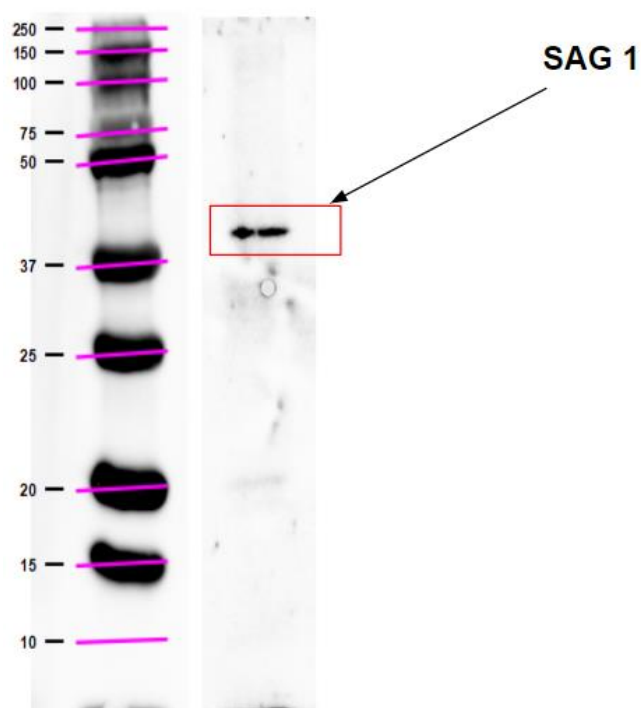


*Nota:* Gel de poliacrilamida, Carril 1, marcador de peso molecular (Dual color protein - BioRad), Carril 2, banda de proteína purificada de SAG 1 de 40 KDa.

Para la identificación de nuestra proteína de interés se llevó a cabo mediante una transferencia, la presencia de nuestra proteína de interés al haber reconocimiento con sueros positivos IgG para *Toxoplasma*.

### Figura 7

#### Transferencia Western



*Nota:* Existe interacción de los anticuerpos IgG positivo para la proteína purificada SAG1 de *T gondii*.

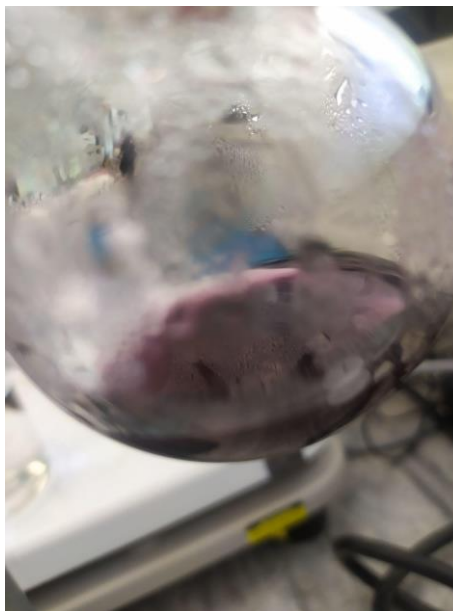
### Síntesis de nanopartículas

Mediante el método de Turkevich se logró identificar a través del cambio de coloración, indicativo característico de la síntesis de nanopartículas de oro (**Figura 8**). Adicional a eso se obtuvo el pico específico de síntesis de nanopartículas, luego de la medición a la dilución 1:1 con agua destilada

encontrando en 526 nm. El ensayo nos indica la reproducibilidad del protocolo estandarizado para la síntesis de nanopartículas de oro (**Figura 9**).

**Figura 8**

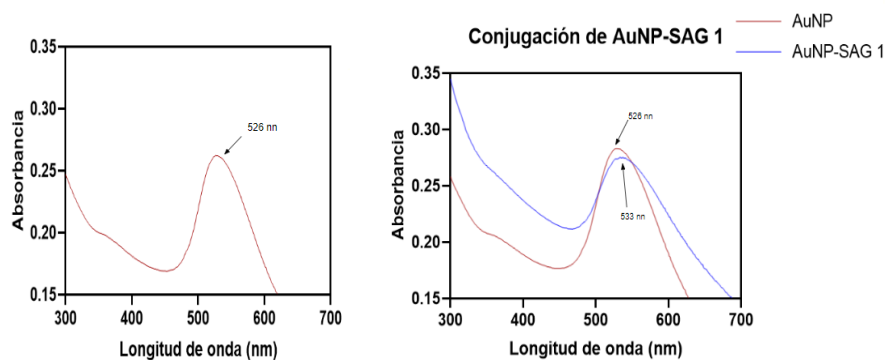
*Cambio de coloración a morado característico de la síntesis química por el método de Turkevich*



*Nota:* Cambio de coloración a morado, verificación de síntesis de nanopartículas de oro (AuNP).

**Figura 9**

*Lectura de UV - vis, síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) y síntesis de nanopartículas de oro (AuNP) - Conjugación de nanopartículas con SAG 1*



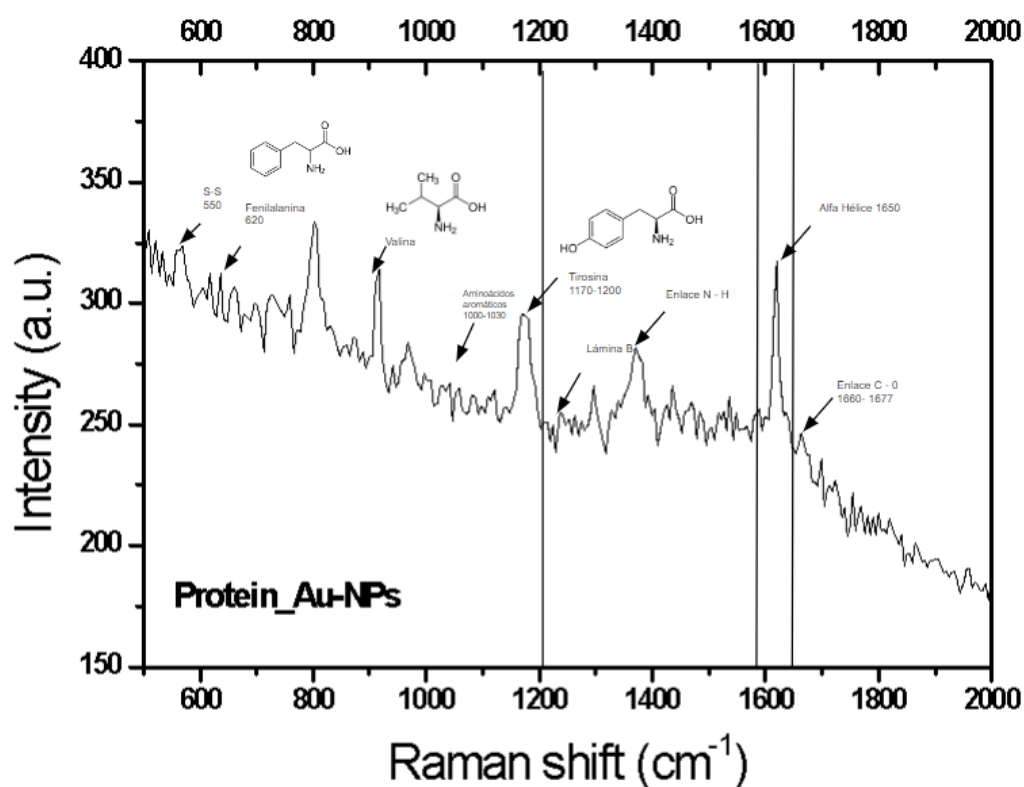
*Nota:* Luego de la lectura de UV - vis se obtuvo un pico de menor intensidad y con un desplazamiento hacia la derecha. El pico que se obtuvo luego de la conjugación es de 533 nm, se lo representa de color azul en el rango de 300 a 700 nm

## Caracterización de proteína SAG 1 mediante espectroscopia RAMAN

En la **(Figura 10)** se presenta el espectro Raman de la proteína SAG 1, la misma que presenta los picos referentes a las hélices alfa y láminas beta, al igual que aminoácidos y enlaces específicos que nos ayudarán en la caracterización de la proteína SAG 1. Estos picos se los identificó mediante la bibliografía presentada en **(Tabla 4)**. Cada uno se muestra en diferentes rangos de lectura raman e intensidades.

**Figura 10**

*Espectro Raman - Caracterización de SAG 1*



*Nota:* Lectura realizada a la proteína conjugada, donde la nanopartícula de oro, ayuda y mejora en la señal de lectura de los picos de la proteína SAG 1

**Tabla 4***Valores referenciales para los picos del espectro Raman obtenido*

<b>Valor obtenido</b>	<b>Valor referencial</b>	<b>Asignación tentativa</b>	<b>Referencia</b>
550	510 - 550	Estiramiento de enlaces S-S	(Kögler et al., 2020)
620	613 - 620	aminoácidos aromáticos/Fenilalanina	(Ma et al., 2019)
920	918 - 943	Valina	(Maiti et al., 2004)
1180	1170 - 1200	Aminoácidos aromáticos/Valina	(Han et al., 2008)
1230	1230 - 1252	grupos CH y NH correspondientes a la presencia de Lámina Beta	(Wen, 2007)
1300	1300 - 1345	Grupos CO y NH correspondientes a la presencia de Hélice alfa	(Han et al., 2008)
1630	1600 - 1647	Pico referencial a Hélice alfa	(Benevides et al., 2003)
1680	1650 - 1700	Grupos CO	(Han et al., 2008)

*Nota:* Picos asignados mediante bibliografía y la asignación de cada una de las estructuras que representa cada uno de los picos encontrados

#### **Comparación de ELISA con el uso nanopartículas de oro**

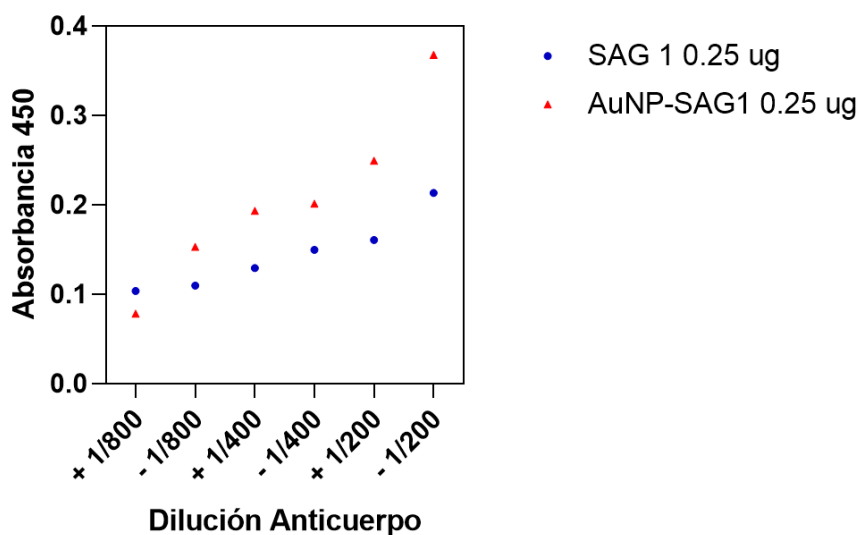
Se logra identificar un ligero aumento cuando la cantidad de antígeno es de 0.25ug/pocillo obteniendo lecturas a la absorbancia de 450 nm de 0.36 para los valores positivos con el uso de la proteína SAG 1 conjugada con nanopartículas de oro a diferencia de 0.21 que se obtiene de la lectura a 450 en el uso de proteína recombinante 0.25ug/pocillo (**Figura 11**).



Figura 11

Comparación de ELISA utilizando proteína recombinante SAG 1 y conjugado SAG 1 - AuNP

### Comparación SAG 1 - AuNP/SAG 1



*Nota:* Tendencia de aumento en intensidad de señal al utilizar nanopartículas conjugadas con proteína SAG

## Capítulo V: Discusión

El uso de proteínas recombinantes tiene alto nivel de pureza, resulta esencial al momento de realizar pruebas tanto para la detección como en la generación de una respuesta inmunogénica (Zhang et al., 2016). Dependiendo del estudio previo de la proteína de interés a ser sintetizada, sistema de expresión, se establecen procesos de expresión, lisis, purificación e identificación de la proteína (Brondyk, 2009). El uso de una proteína de superficie SAG 1 de *Toxoplasma gondii* expresado de manera heteróloga, permite la implementación de ensayos de detección (Qi et al., 2022). Además de que su presencia se conserva en todas las cepas de *T. gondii* convirtiéndola en una importante diana para la

detección, esta se encuentra en la superficie de los taquizoitos y es altamente antigénica (Jalallou et al., 2010). Existen técnicas de purificación con las cuales se puede obtener una proteína con mayor pureza, sin embargo. Es importancia del diseño de la secuencia de interés con una cola 6xhis o de 8 a 10 histidinas, con la finalidad de mejorar la capacidad de purificación de una proteína de interés (Velmurugan et al., 2008). Para nuestro estudio, se logró purificar la proteína recombinante SAG 1 mediante el uso de la resina de cromatografía de afinidad específicamente HisPur Ni-NTA Resin (thermo scientific), ya que dentro de su diseño consta de su cola de 6 histidinas. Una vez obtenida la proteína, se lograron realizar los ensayos de detección, la conjugación con nanopartículas de oro y caracterizarla por espectroscopia Raman. La concentración de proteína purificada obtenida a partir de 50 mL de un sistema de expresión procariota fue de 0.185mg/mL. Su identificación se confirmó mediante SDS PAGE y Western Blot la cual presentó una respuesta inmunológica positiva para toxoplasma.

En la toxoplasmosis se utiliza el reconocimiento serológico como prueba de rutina de la infección, *a través del uso de sueros de pacientes positivos* (Walle et al., 2013). Uno de los procedimientos estándar para la detección de anticuerpos contra *T.gondii* son las pruebas ELISA (Wang & Yin, 2014). Estas se basan en el reconocimiento de anticuerpos en sangre contra ciertos procesos infecciosos. Debido a los síntomas que pueden generar las infecciones por *T. gondii* se buscan técnicas simples que, mediante estos sueros, el diagnóstico sea rápido y confiable (Contreras et al., 2000). Estas pruebas y precisos se pueden ver potenciadas por sustancias que aumenten ya sea la señal de detección, la velocidad de reacción o la disminución de la cantidad de antígeno y anticuerpo que es utilizado para generar la reacción (Khodadadi et al., 2020). Es de necesario e importante, el reconocimiento de las propiedades que tienen las nanopartículas de oro una vez sintetizadas, para aumentar la sensibilidad en pruebas de detección, donde se pueden alcanzar límites de detección mucho más bajos a los de las pruebas convencionales (Tabatabaei et al., 2021). De esta manera fueron sintetizadas nanopartículas de oro, por el método de Turkevich, identificando su cambio de coloración y

obteniendo un pico característico mediante la lectura de UV-vis de 526 nm. Con ello aseguramos la reproducibilidad del ensayo de síntesis por otro lado Link & El-Sayed (1999), mencionan que en solución acuosa las nanopartículas de oro dependiendo del tamaño, pueden tener coloración morada y picos característicos de absorbancia entre 500 - 550 nm. Luego de la síntesis, la funcionalización de las nanopartículas es el paso principal para la potencialización de estas pruebas de diagnóstico, donde se busca obtener la interacción específica por parte la proteína y nanopartícula (Thalhauser & Breunig, 2020). Existen diferentes maneras con las que se puede conjugar una nanopartícula con una proteína de interés, sea esta por uniones electrostáticas, uniones covalentes a ligandos de la nanopartícula, la unión de un cofactor y el enlace directo de un aminoácido en el núcleo de la nanopartícula (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008). Dentro del proceso de conjugado, el pH juega un papel muy importante, por ello se debe identificar el punto isoeléctrico (pI) de la proteína y el pH de la solución producto de la síntesis de nanopartículas. En nuestro ensayo, las nanopartículas tienen una carga negativa mientras que la proteína al ser de carga positiva, debido a que su pI=7.5 es mayor que el pH=6.9, por esta razón fue utilizada la conjugación por interacciones electrostáticas, en la **(Figura 9)** se indican las diferencias de los picos máximos, siendo de 533 nm el pico representativo para la conjugación y el desplazamiento característico que indica que existió el proceso de conjugación. Amini y colaboradores (2020), señalan acerca de la importancia que tiene identificar el tamaño inicial de las nanopartículas y luego de la conjugación con la ayuda de dispersión dinámica de la luz (DLS), con la finalidad de determinar que efectivamente existe un cambio en el tamaño de la estructura de las nanopartículas por ende una conjugación exitosa.

Para los ensayos ELISA, se está dando importancia al uso de nanopartículas con la finalidad de aumentar su sensibilidad, especificidad además de los tiempos de interacción que se pueda tener en la reacción (Tabatabaei et al., 2021). Al tener un conjugado se podrá obtener una amplificación de la señal analítica, debido a las propiedades que tiene la nanopartícula en la relación superficie volumen por lo

que presentará más sitios de unión con un ligando específico (Ciurriz et al., 2017). A pesar de que no existe una diferencia significativa estadísticamente, se identifica que el incremento se da cuando se utilizan cantidades de 0.25 ug/pocillo de la proteína conjugada, esto genera una señal. La espectroscopia Raman, la misma que se presenta como una técnica confiable en los procesos de caracterización de proteínas, puede obtener información acerca de la estructura secundaria de una proteína (Kögler et al., 2020). Se muestra como una técnica con ventajas como no requerir una preparación de muestras compleja (Ma et al., 2023). Para nuestro proceso de caracterización, se usó concentración de 300 ug con Nps, se obtuvo un espectro Raman con picos característicos, los mismos que indican la presencia de moléculas de interés, en este caso, aquellas que van conformando la proteína. Los picos referenciales fueron en 1650 y 1250 que nos indican la presencia de hélices alfa y láminas beta, indicando así la presencia de una estructura secundaria (Rygula et al., 2013; Wen, 2007). además de aminoácidos como la fenilalanina en el pico de 620, grupos NH en 1400 y CO en 1660 - 1677 (Kögler et al., 2020). Siendo picos característicos, que nos indican la presencia de la proteína. La caracterización puede llegar mucho más lejos, ya que obtener los picos solamente es el paso inicial para el proceso de caracterización, se deben llevar a cabo estrategias de cifrado, hacer cálculos de la intensidad, derivados de polarizabilidad al realizar los cálculos de los electrones, todo esto con la finalidad de modelar la estructura de una manera rápida y detallada de la estructura en 3D de la proteína (Ma et al., 2023).

## **Capítulo VI: Conclusiones**

Se obtuvieron nanopartículas mediante la síntesis química de Turkevich, identificadas físicamente con una coloración característica morada y un pico característico en UV-vis de 526 nm además de su conjugación con la proteína recombinante SAG 1, con un desplazamiento del pico a 533 nm.

Y finalmente por espectro Raman se han detallado picos característicos que indican la presencia de la estructura secundaria de SAG 1, al haber reconocido los grupos CO (carbonilo) y NH (amino), donde se generan enlaces de hidrógeno, además de la presencia de los picos característicos para las hélices alfa y láminas beta, realizando comparación entre el uso de la proteína recombinante SAG 1 y su conjugación con nanopartículas, presenta un ligero aumento en la señal de los valores de lectura a concentraciones 0.25ug/pocillo, a partir de la dilución de 1/200 de anticuerpo primario.

### **Capítulo VII: Recomendaciones**

Es importante reconocer que existen procesos de escalabilidad, con la finalidad de obtener proteína en gran cantidad, además de mejorar la pureza. Estandarizar estos procesos ayuda a que la obtención sea mucho más sencilla y rápida.

Se pueden utilizar técnicas alternativas que complementen o exista un contraste con los resultados que con la técnica de difracción de rayos X para caracterizar proteínas, permite determinar la estructura de una manera mucho más precisa, adicionalmente del uso de técnicas de modelamiento para la caracterización mas precisa.

El uso de nanopartículas tiene diversas áreas de aplicación, es importante seguir investigando su uso en el diagnóstico de diferentes patologías, con la finalidad de generar un beneficio en común e innovar estos procesos de diagnóstico. Además, es necesario realizar más ensayos comparativos además de estandarizar la prueba para identificar los cambios que puede generar el uso de nanopartículas en los ensayos ELISA.

### Bibliografía

- Adar, F. (2022). *Interpretation of Raman Spectrum of Proteins*. 37, 9-13,25.
- Aldana, A. S., Sandoval, E. R., & Quintero, A. F. (2005). *APLICACIÓN DEL ANÁLISIS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL ALMIDÓN*.
- Alhajj, M., Zubair, M., & Farhana, A. (2024). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Amini, M., Pourmand, M., Faridi-Majidi, R., Heiat, M., Nezhady, M., Safari, M., Noorbakhsh, F., & Baharifar, H. (2020). Optimising effective parameters to improve performance quality in lateral flow immunoassay for detection of PBP2a in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Experimental Nanoscience*, 15, 266-279. <https://doi.org/10.1080/17458080.2020.1775197>
- Amle, S., Radford, S., Wang, Z., Bronsart, L., Mohanty, P., Renu, S., & Shank-Retzlaff, M. (2023). Use of capillary-mediated vitrification to produce thermostable, single-use antibody conjugates as immunoassay reagents. *Journal of Immunological Methods*, 516, 113460. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2023.113460>
- Aubin-Tam, M.-E., & Hamad-Schifferli, K. (2008). Structure and function of nanoparticle–protein conjugates. *Biomedical Materials*, 3(3), 034001. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034001>

- Balsari, A., Poli, G., Molina, V., Dovis, M., Petruzzelli, E., Boniolo, A., & Rolleri, E. (1980). ELISA for toxoplasma antibody detection: A comparison with other serodiagnostic tests. *Journal of Clinical Pathology*, 33(7), 640-643.
- Billingsley, M. M., Riley, R. S., & Day, E. S. (2017). Antibody-nanoparticle conjugates to enhance the sensitivity of ELISA-based detection methods. *PLOS ONE*, 12(5), e0177592.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177592>
- Black, M. W., & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(3), 607-623. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in enzymology*, 326, 245-254.
- Brondyk, W. H. (2009). Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. En R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 131-147). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1)
- Chen, X., Li, C., & Liu, H. (2021). Enhanced Recombinant Protein Production Under Special Environmental Stress. *Frontiers in Microbiology*, 12.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.630814>
- Ciaurriz, P., Fernández, F., Tellechea, E., Moran, J. F., & Asensio, A. C. (2017). Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8, 244-253.  
<https://doi.org/10.3762/bjnano.8.27>
- Contreras, M. del C., Sandoval, L., Salinas, P., Muñoz, P., & Vargas, S. (2000). Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y Elisa avidéz de IgG en toxoplasmosis reciente y crónica. *Boletín chileno de parasitología*, 55(1-2), 17-24. <https://doi.org/10.4067/S0365-94022000000100005>

- de Barros, R. A. M., Torrecilhas, A. C., Marciano, M. A. M., Mazuz, M. L., Pereira-Chioccola, V. L., & Fux, B. (2022). Toxoplasmosis in Human and Animals Around the World. Diagnosis and Perspectives in the One Health Approach. *Acta Tropica*, 231, 106432.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106432>
- Delgado, I., Zúquete, S., Santos, D., Basto, A., Leitão, A., & Nolasco, S. (2022). The Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Encyclopedia*, 2, 189-211. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010012>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267-299.
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8, 17.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-17>
- Gangneux, F., & Dardé, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264-296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Gao, Y., Zhou, Y., & Chandrawati, R. (2020). Metal and Metal Oxide Nanoparticles to Enhance the Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *ACS Applied Nano Materials*, 3(1), 1-21. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b02003>
- Genova, B. M. D., Wilson, S. K., Dubey, J. P., & Knoll, L. J. (2019). Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLOS Biology*, 17(8), e3000364.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364>
- Gill, S., Löbenberg, R., Ku, T., Roa, W., & Prenner, E. (2007). Nanoparticles: Characteristics, Mechanisms of Action, and Toxicity in Pulmonary Drug Delivery—A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 107-119. <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.015>



- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2016). Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 77-101. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_4)
- Hakes, T. B., & Armstrong, D. (1983). Toxoplasmosis. Problems in diagnosis and treatment. *Cancer*, 52(8), 1535-1540. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19831015\)52:8<1535::AID-CNCR2820520833>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19831015)52:8<1535::AID-CNCR2820520833>3.0.CO;2-I)
- hamshary, A. S., Bayoumi, I. R., Aly, N., Omar, R. E., Mohammed, D. A., Marei, Y. M., & Rashed, G. (2020). Evaluation of Nano-Based-ELISA for Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis. *Benha Journal of Applied Sciences*, 5, 1-7. <https://doi.org/10.21608/bjas.2020.135449>
- Jalallou, N., Bandepour, M., Khazan, H., Haghghi, A., Abdollahi, S., & Kazemi, B. (2010). Recombinant SAG1 Antigen to Detect Toxoplasma gondii Specific Immunoglobulin G in Human Sera by ELISA Test. *Iranian Journal of Parasitology*, 5(2), 1-9.
- Jelen, Ž., Kovač, J., & Rudolf, R. (2023). Study of Gold Nanoparticles Conjugated with SARS-CoV-2 S1 Spike Protein Fragments. *Nanomaterials*, 13(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/nano13152160>
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2012). Foodborne Toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases*, 55(6), 845-851. <https://doi.org/10.1093/cid/cis508>
- Kamionka, M. (2011). Engineering of therapeutic proteins production in Escherichia coli. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(2), 268-274. <https://doi.org/10.2174/138920111794295693>
- Kauter, J., Damek, F., Schares, G., Blaga, R., Schott, F., Deplazes, P., Sidler, X., & Basso, W. (2023). Detection of Toxoplasma gondii-specific antibodies in pigs using an oral fluid-based commercial ELISA: Advantages and limitations. *International Journal for Parasitology*, 53(9), 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.11.003>

- Khodadadi, A., Madani, R., Hoghooghi Rad, N., & Atyabi, N. (2020). Development of Nano-ELISA Method for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis in Mice. *Archives of Razi Institute*, 75(4), 419-426. <https://doi.org/10.22092/ari.2018.123028.1236>
- Kögler, M., Itkonen, J., Viitala, T., & Casteleijn, M. G. (2020). Assessment of recombinant protein production in *E. coli* with Time-Gated Surface Enhanced Raman Spectroscopy (TG-SERS). *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59091-3>
- Kuhar, N., Sil, S., & Umapathy, S. (2021). Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 258, 119712. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119712>
- Lai, M.-Y., & Lau, Y.-L. (2018). Measurement of binding strength between prey proteins interacting with *Toxoplasma gondii* SAG1 and SAG2 using isothermal titration calorimetry (ITC). *Acta Parasitologica*, 63(1), 106-113. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0012>
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(21), 4212-4217. <https://doi.org/10.1021/jp984796o>
- Liyanage, K. L. D. T. D., Wiethoelter, A., Hufschmid, J., & Jabbar, A. (2021). Descriptive Comparison of ELISAs for the Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Animals: A Systematic Review. *Pathogens*, 10(5), 605. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050605>
- Ma, H., Yan, S., Lu, X., Bao, Y.-F., Liu, J., Liao, L., Dai, K., Cao, M., Zhao, X., Yan, H., Wang, H.-L., Peng, X., Chen, N., Feng, H., Zhu, L., Yao, G., Fan, C., Wu, D.-Y., Wang, B., ... Ren, B. (2023). Rapidly determining the 3D structure of proteins by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Science Advances*, 9(47), eadh8362. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh8362>
- Madireddy, S., Rivas Chacon, E. D., & Mangat, R. (2024). Toxoplasmosis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563286/>

- Mashayekhi, M., Sandau, M. M., Dunay, I. R., Frickel, E. M., Khan, A., Goldszmid, R. S., Sher, A., Ploegh, H. L., Murphy, T. L., Sibley, L. D., & Murphy, K. M. (2011). CD8 $\alpha$ + dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity*, *35*(2), 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.008>
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2013). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, *70*(Pt 1), 2-20. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
- Ojeda-Galván, H. J., Hernández-Arteaga, A. C., Rodríguez-Aranda, M. C., Toro-Vazquez, J. F., Cruz-González, N., Ortiz-Chávez, S., Comas-García, M., Rodríguez, A. G., & Navarro-Contreras, H. R. (2023). Application of Raman spectroscopy for the determination of proteins denaturation and amino acids decomposition temperature. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *285*, 121941. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121941>
- Pagheh, A. S., Sarvi, S., Sharif, M., Rezaei, F., Ahmadpour, E., Dodangeh, S., Omidian, Z., Hassannia, H., Mehrzadi, S., & Daryani, A. (2020). *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) as a potential candidate to develop vaccine against toxoplasmosis: A systematic review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *69*, 101414. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101414>
- Park, J.-S., Cho, M. K., Lee, E. J., Ahn, K.-Y., Lee, K. E., Jung, J. H., Cho, Y., Han, S.-S., Kim, Y. K., & Lee, J. (2009). A highly sensitive and selective diagnostic assay based on virus nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, *4*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.38>
- Pazoki, H., Mohammad Rahimi, H., Mirjalali, H., Niyiyati, M., Mosaffa, N., Seyed Tabaei, S. J., Shahrokh, S., Asadzadeh Aghdaei, H., & Zali, M. R. (2021). Soluble total antigen derived from *Toxoplasma gondii* tachyzoites increased the expression levels of NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, and the release of mature form of IL1 $\beta$ , but downregulated the expression of IL1 $\beta$  and IL18 genes in

- THP-1cell line. *Microbial Pathogenesis*, 158, 105072.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105072>
- Petty, K. J. (1996). Metal-Chelate Affinity Chromatography. *Current Protocols in Protein Science*, 4(1), 9.4.1-9.4.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0904s04>
- Qi, T., Ai, J., Sun, Y., Ma, H., Kang, M., You, X., & Li, J. (2022). Application of *Toxoplasma gondii*-specific SAG1, GRA7 and BAG1 proteins in serodiagnosis of animal toxoplasmosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.1029768>
- Ramos, M., Ortiz-Jordan, L., Hurtado-Macias, A., Flores, S., Elizalde-Galindo, J. T., Rocha, C., Torres, B., Zarei-Chaleshtori, M., & Chianelli, R. R. (2013). Hardness and Elastic Modulus on Six-Fold Symmetry Gold Nanoparticles. *Materials (Basel, Switzerland)*, 6(1), 198-205.  
<https://doi.org/10.3390/ma6010198>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.  
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K. M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., & Baranska, M. (2013). Raman spectroscopy of proteins: A review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(8), 1061-1076.  
<https://doi.org/10.1002/jrs.4335>
- S. Al-Malki, E. (2021). Toxoplasmosis: Stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 962-969. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.007>
- Sajid, M., & Płotka-Wasyłka, J. (2020). Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchemical Journal*, 154, 104623.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>

- Samuelson, J. C. (2016). Purifying Recombinant His-Tagged Proteins: Improving the Process with Use of Genetically Tailored Expression Host NiCo21(DE3). *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 36(5), 26-27. <https://doi.org/10.1089/gen.36.05.15>
- Singh, A. (2016). *Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles* (pp. 125-170). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00004-2>
- Spencer, K.-A., Osorio, F. A., & Hiscox, J. A. (2007). Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection. *Vaccine*, 25(30), 5653-5659. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.053>
- Sun, T., Guo, M.-Y., Ma, X., Liang, J., Zeng, L., Shu, X., Gao, Y., Chen, X., & Ouyang, G. (2023). A dual-channel biomarker detection based on spatiotemporal upconversion-linked immunosorbent assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 382, 133557. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133557>
- Tabatabaei, M. S., Islam, R., & Ahmed, M. (2021). Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1143, 250-266. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.030>
- Tenter, A. M., Heckerth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1217-1258.
- Terkawi, M. A., Kameyama, K., Rasul, N. H., Xuan, X., & Nishikawa, Y. (2013). Development of an Immunochromatographic Assay Based on Dense Granule Protein 7 for Serological Detection of *Toxoplasma gondii* Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(4), 596-601. <https://doi.org/10.1128/CVI.00747-12>
- Thalhauser, S., & Breunig, M. (2020). Considerations for efficient surface functionalization of nanoparticles with a high molecular weight protein as targeting ligand. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 155, 105520. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105520>

- Titus, D., Samuel, J. J., & Roopan, S. (2019). *Nanoparticle characterization techniques* (pp. 303-319).  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>
- Tsurusawa, N., Chang, J., Namba, M., Makioka, D., Yamura, S., Iha, K., Kyosei, Y., Watabe, S., Yoshimura, T., & Ito, E. (2021). Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/jcm10215197>
- Velmurugan, G. V., Tewari, A. K., Rao, J. R., Baidya, S., Kumar, M. U., & Mishra, A. K. (2008). High-level expression of SAG1 and GRA7 gene of *Toxoplasma gondii* (Izatnagar isolate) and their application in serodiagnosis of goat toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 154(3-4), 185-192.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.032>
- Vladár, A. E., & Hodoroaba, V.-D. (2020). Chapter 2.1.1—Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. En V.-D. Hodoroaba, W. E. S. Unger, & A. G. Shard (Eds.), *Characterization of Nanoparticles* (pp. 7-27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00002-X>
- Walle, F., Kebede, N., Tsegaye, A., & Kassa, T. (2013). Seroprevalence and risk factors for Toxoplasmosis in HIV infected and non-infected individuals in Bahir Dar, Northwest Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-15>
- Wang, Y., & Yin, H. (2014). Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 180. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>
- Wen, Z.-Q. (2007). Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(11), 2861-2878. <https://doi.org/10.1002/jps.20895>
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, 80, 6.1.1-6.1.35.  
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393-1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>

- Yu, C.-P., Chen, B.-C., Chou, Y.-C., Hsieh, C.-J., & Lin, F.-H. (2023). The epidemiology of patients with toxoplasmosis and its associated risk factors in Taiwan during the 2007–2020 period. *PLOS ONE*, *18*(8), e0290769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290769>
- Zhang, R., Bellenberg, S., Neu, T. R., Sand, W., & Vera, M. (2016). The Biofilm Lifestyle of Acidophilic Metal/Sulfur-Oxidizing Microorganisms. En P. H. Rampelotto (Ed.), *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges* (pp. 177-213). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_6)
- Zhao, X.-Y., & Ewald, S. E. (2020). The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(7), 3370-3380. <https://doi.org/10.1172/JCI136226>
- Zhou, L.-J., Peng, J., Chen, M., Yao, L.-J., Zou, W. H., He, C. Y., & Peng, H.-J. (2021). *Toxoplasma gondii* SAG1 targeting host cell S100A6 for parasite invasion and host immunity. *iScience*, *24*(12), 103514. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103514>
- Zinecker, C., Striepen, B., Geyer, H., Geyer, R., Dubremetz, J.-F., & Schwarz, R. T. (2001). Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, *116*, 127-135. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00313-9)