



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“Identificación y caracterización de un posible receptor para
interferón gamma en el parásito *Toxoplasma gondii* involucrado
en el proceso de enquistamiento”**

TESIS

Que presenta

M. en C. ROSALBA CRUZ MIRÓN

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

Director de Tesis: Dr. Ricardo Mondragón Flores

Ciudad de México

Enero 2021

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada de Marzo de 2016 a Febrero de 2020, con número de registro 295997; número de beca 429402 y con número de CVU 556106.

Al Fondo de Investigación científica y Desarrollo Tecnológico del CINVESTAV para el proyecto 601410FIDSC2018/51,
Al Fondo FORDECYT-PRONACES de la Convocatoria Ciencia de Frontera 2019-CONACyT por su apoyo al proyecto # 51486, ambos otorgados al Dr. Ricardo Mondragón Flores.

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio No. 16 “**Bioquímica Celular de Patógenos Intracelulares**” del Departamento de Bioquímica, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Ricardo Mondragón Flores profesor del Departamento de Bioquímica de esta Institución.

Agradezco al **Dr. Ricardo Mondragón Flores**, por aceptarme para formar parte de su grupo de trabajo, por su asesoría, las observaciones e ideas que enriquecieron el proyecto. Y sobre todo por el apoyo y la confianza durante toda la estancia en su laboratorio.

Agradezco a mis asesores la **Doctora Patricia Talamás Rohana**, **Doctora María Magdalena Aguirre García**, **Doctor Edgar Morales Ríos** y al **Doctor Jesús Alberto Olivares Reyes**, por todas sus importantes aportaciones al proyecto, sus observaciones y comentarios y por la disposición que siempre mostraron para la asistencia a seminarios.

Agradezco al Colegio de Profesores del Departamento de Bioquímica, por las observaciones y contribuciones al proyecto de Doctorado durante los seminarios departamentales.

Al Departamento de Bioquímica, por el acceso a las instalaciones y equipos, así como por el material de apoyo proporcionado.

Al CINVESTAV-IPN Zacatenco, a las Unidades Administrativas, Académicas y Experimentales como Control Escolar, Departamento de Becas y Biblioteca de Genómica Proteómica y Metabolómica.

A la **Doctora Angélica Rueda** por el apoyo al proyecto durante la coordinación académica.

Al **Doctor Edgar Morales Rios** y a la **M. en C. Jessica Filisola Villaseñor** del departamento de Bioquímica, por la asistencia técnica y el material proporcionado para la síntesis del IFN- γ recombinante.

Al **Doctor Bulmaro Cisneros Vega** y al **Q.F.B. Jesús Pablo Gomez Islas** del departamento de Genética y Biología Molecular, por el apoyo técnico

Agradezco a la **Q.F.B. Mónica Edith Mondragón Castelán**, auxiliar de investigación, por su apoyo y asistencia técnica proporcionada durante la realización de este proyecto.

Agradezco al **Ing. José Claudio Jiménez Vargas** por brindarme el material necesario durante la realización del trabajo.

Agradezco a la **Q.F.B. Sirenia González Pozos**, del Laboratorio de Microscopía Electrónica de los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LANSE-CINVESTAV) del CINVESTAV-IPN por el apoyo proporcionado.

Agradezco al **M. en C. Emmanuel Ríos**, de la Unidad de Proteómica y Metabolómica de los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LANSE-CINVESTAV) del CINVESTAV-IPN por el apoyo proporcionado.

A la **Doctora Maria del Carmen Sanchez Torres** y al **Doctor Vianney Ortiz Navarrete** del departamento de Biomedicina Molecular, por la donación del ARN de células mononucleares de sangre periférica y la donación de células Jurkat respectivamente.

Al **Doctor Raúl Argüello García** del departamento de Genética y Biología Molecular, por el apoyo bioinformático.

Agradezco a los **Doctores: Carlos Jorge Ramírez Flores, Carmen T. Gómez de León, Rubén Darío Díaz Martín y Kitzia Nohemí Castro Elizalde**, y al **M. en C. Noé Lagunas Cortés** por el apoyo y enseñanza durante el desarrollo de diferentes técnicas. Por compartir el espacio y la buena convivencia en el laboratorio.

Agradezco a **Lic. Priscila González Ceja**, asistente secretarial, por todo su apoyo en la cotización y compra de reactivos y por su apoyo para el trámite y asesoría para la obtención de la beca.

Agradezco a la **Lic. Angélica González Ceja**, asistente secretarial, por todo su apoyo durante mi estancia en el CINVESTAV.

Agradezco a la **Lic. Leticia Gómez Sandoval**, por su asistencia durante los trámites de titulación como parte de la Coordinación Académica.

Agradezco a la **Lic. María del Rocío Arroyo Ruíz Velazco**, por la asistencia brindada como parte de la coordinación académica.

Agradezco a los **MVZ Jorge Fernández-Hernández** y **Antonieta López-López** de la Unidad de Experimentación y Producción de Animales de Laboratorio Laboratory Animals (LANSE, CINVESTAV-IPN, Mexico) por el suministro de los ratones.

Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco por el apoyo proporcionado.

En especial agradezco a:

Mi Mamá **Hermelinda Mirón Reyes** por siempre apoyarme y ser mi ejemplo de ser humano, a mi Papá **José Albino Cruz Pacheco** por su apoyo y comprensión y por ser un gran padre. Me enorgullece decir que este logro es gracias a su lucha, esfuerzo y dedicación por sacarnos adelante.

A mis hermanos: **Alma Luz Cruz Mirón, María Anayeli Cruz Mirón, Marcela Iveth Cruz Mirón** y **Alfonso Cruz Mirón**. Y al pequeño **Ulises González Cruz**, agradezco que siempre estuvieron conmigo, por ser mis compañeros de vida y por siempre apoyarme para seguir adelante y ser tan comprensivos conmigo.

A todo mi familia que estuvo ahí durante el trayecto: en especial a **Juan Carlos**, que lo extraño.

A **German Mendoza Temis** que me ha apoyado e impulsado para alcanzar mis metas, por tus consejos, comprensión y por estar conmigo en todo momento. Y a sus padres, hermanos y Tía que siempre me dieron ánimos

A mis amigos y compañeros de laboratorio y casa: **Carlos Jorge**, solo te puedo decir gracias por tu compañía y por el gran apoyo que siempre fuiste durante todos estos años. **Noé**, gracias por siempre comprenderme y apoyarme.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: **Mónica**, gracias por tu ayuda, compañía y sabios consejos. **Kitzia**, gracias por siempre estar dispuesta a ayudar y por hacer amena la estancia en el laboratorio. **Rubén, Carmen, Jessica, Sandra**, gracias por su compañía y por la disposición que siempre tuvieron para ayudar.

A mis amigos y compañeros: **Kari** y **Lupita** por sus enseñanzas y apoyo desde el curso de las materias. **Adrián** por siempre estar dispuesto a escucharme

A todas aquellas personas que formaron parte de esto, que me impulsaron para alcanzar este logro.

Y finalmente a Dios y a la vida.

Índice

Índice de tablas y figuras.....	XII
Resumen.....	XII
1.0 Introducción.....	3
2.0 Generalidades.....	5
2.1 Taxonomía.....	5
2.2 Ciclo de vida de <i>Toxoplasma</i>	6
2.3 Formas infectivas de <i>T. gondii</i>	8
2.3.1 Taquizoíto.....	9
2.3.2 Bradizoíto.....	11
2.3.3 Esporozoíto.....	14
2.4 Enquistamiento de <i>Toxoplasma</i>	14
2.5 Inducción del enquistamiento en <i>Toxoplasma</i>	20
2.6 Interferón gamma y su receptor.....	22
2.7 Receptores no inmunes para IFN- γ	26
3.0 Antecedentes directos.....	29
4.0 Justificación.....	35
5.0 Hipótesis.....	35
6.0 Objetivo general.....	35
7.0 Objetivos específicos.....	36
8.0 Estrategia experimental.....	37
9.0 Materiales y métodos.....	38
9.1 Cultivo celular.....	38
9.2 Anticuerpos y Ligandos.....	38
9.3 Cepa RH.....	39

9.4 Obtención y mantenimiento de <i>T. gondii</i> cepa RH	39
9.5 Infección de células con taquizoítos de <i>T. gondii</i>	39
9.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	40
9.7 Preparación de extractos totales (ET) de taquizoítos	40
9.8 Análisis de proteínas por SDS-PAGE.....	40
9.9 Tinción con azul de Coomassie.....	41
9.10 Tinción con nitrato de plata.....	41
9.11 Western blot (Wb).....	41
9.12 Inmunofluorescencia	42
9.13 Expresión de la glicoproteína CST1 inducida por la exposición de taquizoítos de <i>Toxoplasma</i> a IFN- γ y posterior invasión de células HEp-2.....	43
9.14 Expresión de las proteínas SAG1 y CST1 durante la diferenciación de taquizoítos ...	44
9.15 Aislamiento del películo de <i>Toxoplasma gondii</i>	44
9.16 Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	45
9.17 Acoplamiento de IFN- γ a biotina	45
9.18 Interacción de IFN- γ con una molécula en <i>Toxoplasma</i> por Far Western blot.....	46
9.19 Interacción de IFN- γ -biotina con <i>Toxoplasma</i> por fluorescencia	46
9.20 Purificación del RIFN- γ mediante cromatografía de afinidad	47
9.21 Espectrometría de masas	48
9.22 Inducción de la extrusión del conoide.....	49
9.23 Ensayos de invasión	49
9.24 Ensayos de proliferación	49
9.25 Síntesis de IFN- γ recombinante	50
9.26 Análisis bioinformáticos	52

9.27 Producción de anticuerpos contra ROP17.....	53
10.0 Resultados	54
10.1 La exposición de taquizoítos extrcelulares a IFN- γ induce la cistogénesis en células invadidas	54
10.2 Progresión de la diferenciación de los parásitos inducida por exposición a IFN- γ	56
10.3 Efecto de IFN- γ en la extrusión del conoide, invasión y proliferación de taquizoítos preincubados con la citocina.	63
10.4 IFN- γ se une a <i>Toxoplasma gondii</i> probablemente a través de un receptor en la membrana del parásito.	65
10.5 Acoplamiento de IFN- γ a biotina para la detección de la molécula de unión a la citocina	66
10.6 IFN- γ / biotina se une a la proteína de unión a IFN- γ en <i>Toxoplasma</i>	67
10.7 Aislamiento del películo de <i>Toxoplasma gondii</i> como estrategia para aislar la proteína de unión a IFN- γ	69
10.8 <i>T. gondii</i> posee una proteína que tiene identidad con un RIFN- γ soluble.....	77
10.9 La clonación de IFN- γ permitirá la purificación de la proteína de unión en <i>Toxoplasma</i>	80
10.10 Se detectó una proteína de unión a IFN- γ por Far Western Blot en extractos de <i>T. gondii</i>	85
10.11 La proteína ROP17 tiene similitud con un receptor soluble para IFN- γ y fue detectada por espectrometría de masas	86
10.12 Cromatografía de afinidad para aislar la molécula de unión a IFN- γ	87
10.13 El ensayo de Pull Down evidenció un patrón de purificación similar a la cromatografía de afinidad.....	89
10.14 ROP17 se detectó por espectrometría de masas en la fracción eluida por cromatografía de afinidad.....	90

10.15 ROP17 y el receptor soluble para IFN- γ del virus Vaccinia son proteínas que comparten el dominio del RIFN- γ en mamíferos.....	91
10.16 El modelaje bioinformático predice la interacción entre ROP17 e IFN- γ	96
10.17 IFN- γ interacciona con ROP17	97
10.18 Selección de un péptido inmunogénico de la proteína ROP17 para la generación de anticuerpos.	98
10.19 Los anticuerpos contra ROP17 marcan una banda similar a la encontrada con INF- γ /biotina	100
10.20 La detección con el anticuerpo ROP17 y con IFN- γ biotinilado muestran un patrón de spots similar en geles 2D.....	102
11. Discusión.....	104
12. Conclusiones	111
13. Perspectivas.....	112
14. Bibliografía	113
Anexos.....	129

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Proteínas halladas en el películo del parásito.	77
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .	8
Figura 2. Formas infectivas de <i>T. gondii</i> .	9
Figura 3. Taquizoíto y bradizoíto, principales estadios estudiados.	12
Figura 4. Quistes de <i>T. gondii</i> hallados en modelos murinos.	13
Figura 5. Reconocimiento de <i>T. gondii</i> por el sistema inmune.	16
Figura 6. Efectos de la señalización mediada por IFN- γ que conducen a la atenuación de la Toxoplasmosis.	18
Figura 7. Inducción de la cistogénesis <i>in vitro</i> .	21
Figura 8. Receptor para IFN- γ y estructura terciaria de las cadenas α uniendo IFN- γ .	23
Figura 9. Señalización por IFN- γ .	26
Figura 10. Receptor para IFN- γ en humanos y <i>Vaccinia</i> virus.	29
Figura 11. Células de la respuesta Th1 son responsables de la diferenciación de <i>Toxoplasma</i> .	30
Figura 12. Co-expresión de CST1 y BAG1 durante el curso temporal de la cistogénesis inducida por exposición a IFN- γ .	31
Figura 13. Formación de la pared quística, polarización de la red vesículo tubular, dispersión mitocondrial y desorden intravacuolar.	32
Figura 14. Evolución de quistes a los 6 días y 10 días de exposición a IFN- γ ,	33
Figura 15. Determinación de la expresión de la glicoproteína CST1, después de la preincubación de los taquizoítos con IFN- γ .	55
Figura 16. Expresión de CST1 a las 6 h, en VP de taquizoítos expuestos a 500 U/ml de IFN- γ .	57
Figura 17. Expresión de CST1 a las 12 (A) y 24 (B) h, en VP de taquizoítos expuestos a 500 U/ml de IFN- γ .	58
Figura 18. Expresión de CST1 a las 48 (A) y 72 (B) h, en VP de taquizoítos expuestos a 500 U/ml de IFN- γ .	59
Figura 19. Porcentaje de VPs positivas a CST1.	60

Figura 20. Expresión de CST1 y SAG1 de 6-72 h de proliferación de los taquizoítos de <i>Toxoplasma</i> con 500 U/ml de IFN- γ .	62
Figura 21. Efecto de IFN- γ en la extrusión del conoide, invasión y proliferación de <i>Toxoplasma</i> .	64
Figura 22. Molécula de unión a IFN- γ vista por inmunofluorescencia.	65
Figura 23. Validación del acoplamiento del IFN- γ a biotina.	67
Figura 24. Molécula de unión a IFN- γ evidenciada a través de la marca generada por la citosina unida a biotina y avidina-FITC.	69
Figura 25. Análisis de la película de <i>Toxoplasma gondii</i> .	71
Figura 26. Distribución de las proteínas halladas en el películo de <i>Toxoplasma</i> .	72
Figura 27. Cuantificación relativa de las proteínas propias del películo de <i>Toxoplasma</i> .	74
Figura 28. Distribución de las proteínas halladas en el películo de <i>Toxoplasma</i> digeridas con quimotripsina.	76
Figura 29. Blast del RIFN- γ de humano y del virus <i>Vaccinia</i> con el genoma de <i>Toxoplasma</i> .	79
Figura 30. Reacción de PCR para amplificación del gen para IFN- γ .	80
Figura 31. Amplificación de los genes pRSET e IFN- γ .	81
Figura 32. Perfiles de expresión de los plásmidos seleccionados.	82
Figura 33. Corte del IFN- γ /His con la enzima TEV.	83
Figura 34. Purificación y corte de IFN- γ / His.	84
Figura 35. Purificación del IFN- γ por exclusión molecular.	85
Figura 36. Far Western blot: Detección de proteína de unión a IFN- γ .	86
Figura 37. Proteínas halladas en la banda de 130 kDa.	87
Figura 38. Purificación de la proteína de unión a IFN- γ por columna de afinidad.	88
Figura 39. Pull-Down para determinar la interacción entre IFN- γ y una proteína de <i>Toxoplasma</i> .	90
Figura 40. Espectrometría de masas de la fracción eluida por cromatografía de afinidad.	91
Figura 41. Alineamiento de ROP17 y el RIFN- γ soluble del virus <i>Vaccinia</i> .	93

Figura 42. Alineamiento en Clustal de las secuencias de RIFN- γ en <i>Vaccinia</i> y ROP17 de <i>Toxoplasma</i> .	95
Figura 43. Modelamiento de la proteína ROP17.	96
Figura 44. Docking de IFN- γ y ROP17.	98
Figura 45. Selección de péptido para la generación de anticuerpos contra ROP17.	99
Figura 46. Titulación de anti-ROP17.	100
Figura 47. Localización de ROP17 en taquizoítos extracelulares.	101
Figura 48. Geles en doble dimensión para determinar la presencia de ROP17.	103

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado que causa enfermedades oportunistas principalmente en organismos inmunocomprometidos. Una vez que el parásito entra en el organismo, se activa la respuesta inmunitaria que induce una fuerte respuesta celular del tipo Th1 caracterizada por la secreción de interferón gamma (IFN- γ).

Se ha reportado que IFN- γ induce el enquistamiento de *T. gondii* cuando se une a su receptor en astrocitos murinos y macrófagos. Un punto discutible es que no todas las células del organismo infectado presentan receptores para IFN- γ , y sin embargo también en ellas se forman los quistes tisulares. En estudios en nuestro laboratorio, hemos encontrado que la exposición de taquizoítos extracelulares a IFN- γ y su posterior invasión celular, es una condición suficiente para inducir la diferenciación del taquizoíto a bradizoíto en ausencia de la citocina en el medio de cultivo, teniendo como consecuencia la disminución en la proliferación del parásito, y la expresión de CST1, una glicoproteína presente en la pared de los quistes tisulares. Por ensayos de fluorescencia hallamos que el INF- γ se une en pequeños parches en la membrana de *T. gondii* y por Far Western blot desnaturizante-reductor, evidenciamos la unión de IFN- γ a una proteína de ~130 kDa en el parásito. Por cromatografía de afinidad, usando distintas condiciones de elución, se aisló un extracto proteico. Tanto la banda de 130 kDa como el extracto aislado por cromatografía, fueron analizados por espectrometría de masas y bioinformática. Se encontró que ROP17 presente en ambos análisis, tiene un 26 % de similitud con un receptor para IFN- γ viral. Los reportes de esta proteína ROP17 indican que es activada por IFN- γ para modular la supervivencia de *Toxoplasma* ante la respuesta inmune del hospedero en conjunto con otras proteínas provenientes de las roptrias.

Mediante análisis bioinformáticos de anclaje (docking), se demostró que ROP17 puede unirse a IFN- γ , por lo que se generaron anticuerpos policlonales para ROP17 encontrando que marcan a una proteína de aproximadamente 130 kDa en geles de una y dos dimensiones. Por lo anterior, concluimos que ROP17 tiene un papel importante en los mecanismos de defensa del parásito que tienen como consecuencia su diferenciación; la unión de esta proteína a IFN- γ es un factor importante para el entendimiento del enquistamiento del parásito mediado por la respuesta inmune.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite that causes opportunistic diseases primarily in immunocompromised organisms. Once the parasite enters the body, it induces an immune response characterized by a strong Th1-type cellular response with the secretion of interferon-gamma (IFN- γ).

It has been reported that IFN- γ induce the cystic grow of *T. gondii* when it binds to its receptor in murine astrocytes and macrophages. An interesting point is that not all cells in the infected organism have IFN- γ receptors, and yet tissue cysts also form in them. In studies in our laboratory, we have found that the exposure of extracellular tachyzoites to IFN- γ and their subsequent cell invasion is a sufficient condition to induce the differentiation from tachyzoite to bradyzoite in the absence of the cytokine in the culture medium, resulting in the decrease in the proliferation of the parasite, and the expression of CST1, a glycoprotein present in tissue cyst wall. By fluorescence assays, we found that INF- γ binds as small patches on the *T. gondii* membrane while by denaturing-reducing Far Western blot, we evidenced the binding of IFN- γ to a \sim 130 kDa protein in the parasite. By chromatography, using different elution conditions, a protein extract was isolated. Both the 130 kDa band and the extract isolated by affinity chromatography were analyzed by mass spectrometry and bioinformatics. It was found that ROP17 present in both analyzes has a 26% similarity to a viral a receptor for IFN- γ ; previous reports of this ROP17 protein indicate that it is activated by IFN- γ to modulate the survival of *Toxoplasma* due to be the host's immune response in conjunction with other proteins from the rhoptries.

Through bioinformatic analysis of Docking, it was demonstrated that ROP17 can bind IFN- γ , therefore, polyclonal antibodies were generated against ROP17, finding that they recognize a protein of approximately 130 kDa in one- and two-dimensional gels. Therefore, we conclude that ROP17 has an important role in the defense mechanisms of the parasite that has as a consequence its differentiation; the binding of this protein to IFN- γ is an important factor for understanding the encystment of the parasite mediated by the immune response.

1.0 Introducción

Los parásitos apicomplexa que incluyen al *Toxoplasma*, son un antiguo grupo de protozoarios intracelulares obligados que se caracteriza por tener una serie de componentes celulares que conforman el llamado “complejo apical”, y que está involucrado en la entrada del parásito a la célula hospedero (Katris et al., 2014).

Toxoplasma gondii es un eucariota unicelular de aproximadamente 6 micras de longitud, que vive como parásito intracelular obligado en todos los animales, excepto reptiles y acuáticos, incluyendo al humano. Es capaz de infectar y proliferar en todas las células nucleadas de cualquier mamífero o ave, replicándose rápidamente de manera asexual dentro de una vacuola especializada conocida como vacuola parasitófora (VP) (Dubey, Lindsay, & Speer, 1998; Montoya & Liesenfeld, 2004). Cuando *Toxoplasma* invade todo el espacio intravacuolar; lisa la VP y a la célula hospedero quedando libre en el espacio extracelular para poder invadir a nuevas células.

En humanos, cuando ciertas funciones del sistema inmunológico están disminuidas como ocurre en pacientes con VIH, con tratamientos anticancerígenos, con trasplantes recientes *Toxoplasma* es capaz de causar la muerte por encefalitis o en mujeres embarazadas cuya infección congénita del feto puede producir aborto, (English & Striepen, 2019; Montoya & Liesenfeld, 2004). Cuando el sistema inmunológico del hospedero hace frente a la toxoplasmosis a través de la secreción de citocinas como Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina-12 (IL-12) y el Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNF- α) y mediante la activación de macrófagos y células dendríticas (CD), el parásito es capaz de evadir esta respuesta inmune diferenciándose del estadio de taquizoíto a bradizoíto alojándose dentro de la VP y transformando a la célula invadida en un quiste tisular en la mayoría de los tejidos del hospedero. Interesantemente, en células del sistema nervioso central y en el tejido muscular es en donde la distribución de quistes tisulares es mas frecuente (Wohlfert, Blader, & Wilson, 2017).

La inmunidad mediada por células a antígenos de *Toxoplasma* abarca desde respuestas inflamatorias agudas innatas hasta una inmunidad adaptativa hacia antígenos específicos. Cuando *Toxoplasma* invade a un organismo, su sistema inmune innato lo identifica a través de una serie de mecanismos que ha desarrollado para reconocer a ciertas moléculas específicas que están presentes en protozoarios (Yarovinsky, 2014). A la fecha, en

Toxoplasma se han identificado dos moléculas que desencadenan la respuesta inmune como son; las proteínas unidas a glicofosfatidil inositol (GPI) y la profilina, éstas pertenecen a un extenso grupo de proteínas con secuencias que se reconocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son esenciales en microorganismos. Los PAMPs, tienen alta afinidad por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), entre estos están los receptores Toll-Like (TLR), que se caracterizan por tener repeticiones ricas en leucina, las cuales están presentes en el dominio extracelular de la molécula, y poseen un dominio intracelular que es responsable de la transducción de señales. Estos comúnmente tienen ligandos peptídicos endógenos que los activan y tienen como finalidad la activación del Factor Nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas (NF- κ B)

En las células dendríticas, TLR11 y 12 son los principales receptores de la profilina y una vez que son activados, conducen al reclutamiento de MyD88 (Adaptador de transducción de señales inmunes innatas) que posteriormente activa a NF- κ B, el cual activa la transcripción de genes, entre los cuales está el gen para IL-12. La IL-12, que está presente en el espacio extracelular, reconoce a su receptor en las células Natural Killer (NK), que pertenecen al sistema inmune innato y forman parte de la primera línea de defensa frente a un amplio rango de patógenos, y ocurre la autofosforilación de la Janus Kinase 2 (JAK2). La JAK2 fosforilada, fosforila a la Janus Kinase 1 (JAK1), y esta a su vez fosforila al residuo Y800 del receptor, éste al fosforilarse, se convierte en un sitio de unión para el Transductor de Señal y Activador de la Transcripción (STAT), la cual al fosforilarse es translocada al núcleo para activar promotores o activadores de la transcripción génica, que tienen como principal finalidad la expresión de IFN- γ . Finalmente, el IFN- γ , va a funcionar como una molécula moduladora ante la infección por *Toxoplasma* (Butcher & Denkers, 2002; Sasai & Yamamoto, 2019; Yarovinsky, 2014).

Toxoplasma gondii en respuesta a IFN- γ , disminuye su proliferación en células, esto debido a la activación de la indoleamino 2,3 dioxigenasa (IDO) (Daubener et al., 2001). La enzima IDO se encarga de degradar triptófano, su degradación retrasa el crecimiento del parásito y desencadena la formación de quistes. Por otra parte, se ha demostrado que IFN- γ induce un estallido oxidativo a través de la degradación de arginina por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); la producción de Oxido Nítrico (NO) por un lado, destruye a los parásitos, pero éste y la degradación de arginina, desencadenan la diferenciación del parásito a

bradizoíto. El IFN- γ , también induce la activación de GTPasas relacionadas con la inmunidad, como las proteínas IGTP y LRG-47, que al activarse afectan la viabilidad de los parásitos. IRGa6 que participa en la alteración de la VP, es fosforilada e inactivada por la cinasa ROP18 para evadir la respuesta inmune de la célula hospedadora y promover la virulencia del parásito (Etheridge et al., 2014; Sullivan & Jeffers, 2012; G. A. Taylor, Feng, & Sher, 2007).

En conjunto, todos estos mecanismos participan en la defensa del organismo infectado para atenuar a *Toxoplasma*, sin embargo, el parásito cuenta con mecanismos que promueven su supervivencia dentro del organismo y estos mecanismos no solo le permiten proliferar, sino que, la respuesta inmune del hospedero en gran parte es aprovechada por *T. gondii* para prevalecer dentro del organismo alojado dentro de un quiste tisular y esta forma del parásito puede permanecer durante toda la vida del hospedero. Es por lo anterior que en este trabajo se estudió el mecanismo por el cual *Toxoplasma* podría ser capaz de censar la respuesta inmune mediada por IFN- γ , llegando a la conclusión de la existencia de un probable receptor en el parásito que sea capaz de censar la citocina y con ello desencadenar el proceso de enquistamiento.

2.0 Generalidades

2.1 Taxonomía

Toxoplasma gondii, descubierto por Nicolle y Manxéau en 1908, se llamó así al ser encontrado en el roedor *Ctenodactylus gundi*, es un protozoo unicelular perteneciente al phylum Apicomplexa y se clasifica dentro del superphylum Alveolata. Los miembros de Alveolata se caracterizan por tener microporos y alveolos corticales, estos alveolos son vesículas aplanadas ubicadas entre la membrana plasmática y una red de microtúbulos subpeliculares. Debido a la formación de esporas o quistes dentro de su ciclo de vida, éste se clasifica dentro de la clase esporozoa y subclase coccidia, en el orden Eucoccidiae y suborden Eimeria, la familia de la que provienen es la Sarcocystidae y el género *Toxoplasma* (Dubey, 2009; Francia, Dubremetz, & Morrissette, 2015; Levine et al., 1980)

2.2 Ciclo de vida de *Toxoplasma*

No obstante *Toxoplasma* infecta a una amplia gama de hospederos, el felino, es el único en donde se conoce que ocurre la reproducción sexual de los parásitos, por lo que se le considera como hospedero definitivo dentro del ciclo de vida; se ha sugerido que esto es porque los felinos carecen de la actividad de la enzima delta-6-desaturasa, la cual limita la velocidad de conversión de ácido linoleico en ácido araquidónico. Se ha observado que el ácido linoleico en alta concentración, promueve el desarrollo sexual de *T. gondii*, y se ha visto que, en el intestino de los felinos la concentración de ácido linoleico es 10 veces más alta que en ratones, por lo que, esta condición permite que en los gatos ocurra la diferenciación sexual del parásito (Martorelli Di Genova, Wilson, Dubey, & Knoll, 2019).

Cuando el *T. gondii* alojado en quistes tisulares es ingerido por los felinos, los parásitos liberados por acción digestiva penetran en las células epiteliales del intestino delgado e inician el desarrollo de numerosas generaciones de *T. gondii*, hasta llegar al estadio de esquizonte. *Toxoplasma* se desarrolla en el intestino en cinco tipos de parásitos morfológicamente distintos, clasificados de la A, a la E, antes de que comience la gametogonia. Los esquizontes de tipo E dan lugar a los merozoítos que se diferencian en gametos los cuales se pueden encontrar en todo el intestino delgado del felino después de 3 días de la infección. Los microgametos, que son la forma masculina con dos flagelos, fertilizan a los macrogametos, la forma femenina, para producir ooquistes; entre 2 y 20 millones de ooquistes son excretados por día y esporulan de 1 a 5 días después de ser eliminados en las heces de los gatos, dependiendo de las condiciones del ambiente. Cuando esporulan, los ooquistes son infecciosos durante un tiempo prolongado, estas estructuras alojan a los esporozoítos. La ingesta de estas estructuras parasitarias a través del consumo de agua y alimentos contaminados inicia la infección de los hospederos. Todos los animales, no felinos, que son infectados son hospederos intermediarios ya que en ellos no se presenta la reproducción sexual, incluido el humano (English & Striepen, 2019; Pittman & Knoll, 2015). En los hospederos intermediarios, *Toxoplasma* se diferencia al estadio de taquizoíto, el cual se replica rápidamente (en menos de 4 h) de manera asexual dentro de las células del organismo infectado, para posteriormente diseminarse por todos los tejidos. Una vez que se activa la respuesta inmune por la presencia del parásito, se inicia un proceso de diferenciación intracelular de *Toxoplasma* de la forma de taquizoíto a bradizoíto, el cual es una forma

parasitaria de lenta proliferación y que se aloja al interior de quistes tisulares. La ingesta de carne cruda o mal cocida contaminada con quistes tisulares presentes en todos los tejidos pero abundantes en tejido muscular y cerebro es una de las rutas de transmisión de la toxoplasmosis completándose así el ciclo (Esch & Petersen, 2013).

La transmisión del parásito también puede ser congénita; es decir, de la madre al feto. La capacidad de *Toxoplasma* de atravesar barreras epiteliales le confiere al parásito la facilidad para diseminarse incluso a través de barreras inmunoprivilegiadas como la placentaria, la hematoencefálica y la ocular. Cuando la infección congénita ocurre en el primer trimestre, generalmente se asocia con aborto, y cuando se da después de este periodo, el producto puede sobrevivir pero padecer ceguera, hidrocefalia y malformaciones (Khan & Khan, 2018). La transmisión por transplantes o transfusiones sanguíneas también ocurre aunque en baja frecuencia, así como la infección en personas en riesgo por sus ocupaciones como ocurre con los carniceros, personal de rastros, jardineros, etc. (Alvarado-Esquivel et al., 2018).

A diferencia de otros parásitos, *Toxoplasma* es el único que se trasmite siguiendo un proceso asexual y mediante una dieta omnívora-carnívora (Su et al., 2003), lo que puede aumentar la transmisión entre muchos hospederos vertebrados. Los seres humanos no transmiten el parásito; sin embargo, se infectan fácilmente al ingerir ooquistes esporulados que contaminan el agua y alimentos, o quistes contenidos en la carne mal cocida (de Moura et al., 2006; J. L. Jones & Dubey, 2012). Los signos clínicos en humanos varían desde síntomas leves parecidos a la gripe, hasta complicaciones graves en personas inmunocomprometidas o después de la transmisión placentaria al feto. Las infecciones humanas muestran un rango de gravedad clínica, probablemente a consecuencia de varios factores incluyendo el organismo hospedero y el genotipo del parásito, tales asociaciones se han observado en enfermedades oculares (Boothroyd & Grigg, 2002), infección congénita y en pacientes con VIH (Jamieson et al., 2008; McLeod et al., 2012; Suzuki et al., 1996). Aunque la infección no da lugar a complicaciones graves la toxoplasmosis es una importante causa de infección transmitida por alimentos, que requiere hospitalización (Mead et al., 1999).

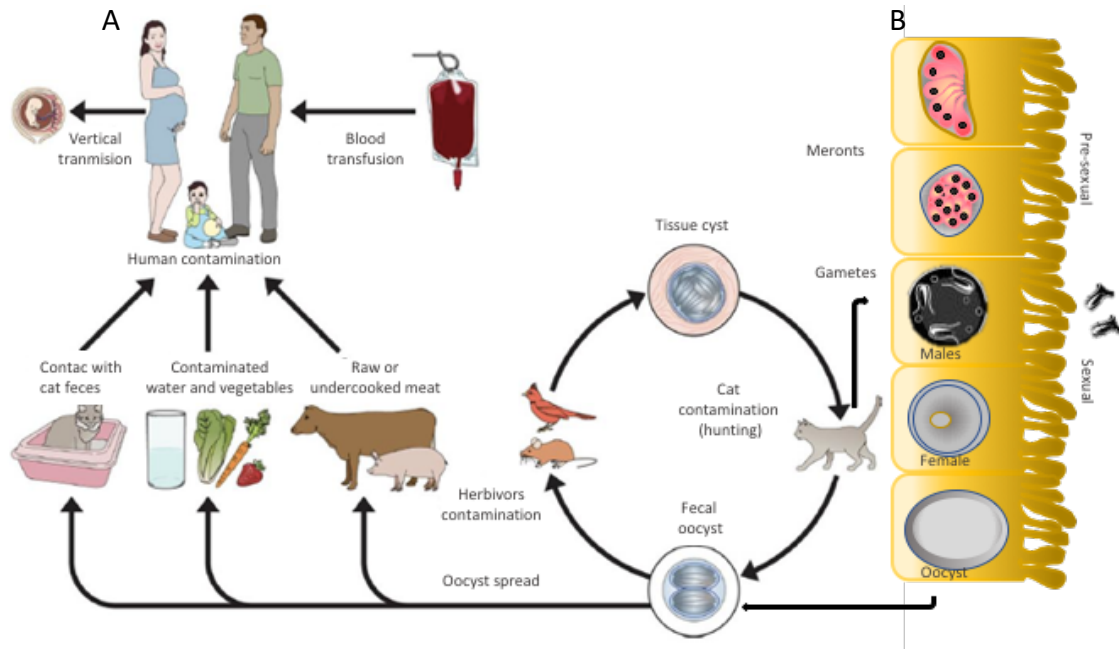


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. En el ciclo de vida de *Toxoplasma* prevalecen dos fases; una donde se encuentran los hospederos intermediarios (A), que son todos aquellos animales de sangre caliente incluidos el humano y que adquieren la infección mediante transmisión congénita, transfusión sanguínea o por la ingesta de quistes tisulares u ooquistes presentes en objetos o alimentos contaminados. En la segunda fase es donde se lleva a cabo el ciclo sexual y replicativo del parásito, ésta se lleva a cabo en todos los animales de la familia Felidae que fungen como los hospederos definitivos del parásito (B), en estos pueden encontrarse todos los estadios de *Toxoplasma* principalmente aquellos que pertenecen al ciclo sexual del parásito, dando como resultado la excreción de ooquistes que esporulan y maduran en el medio ambiente. Modificado de (Esch & Petersen, 2013)

2.3 Formas infectivas de *T. gondii*

Toxoplasma tiene un ciclo de vida complejo que consta de múltiples etapas que fluctúan entre las fases de proliferación y de latencia. Los tres estados infecciosos del parásito son: el taquizoíto, caracterizado por su rápida replicación, alta motilidad e infectividad, y que se aloja al interior de las células infectadas en una vacuola parasitófora (VP). El bradizoíto, de lenta proliferación y motilidad, se localiza al interior de los quistes tisulares de los organismos infectados, y el esporozoíto que está presente al interior de ooquistes maduros o esporulados (Dubey et al., 1998).

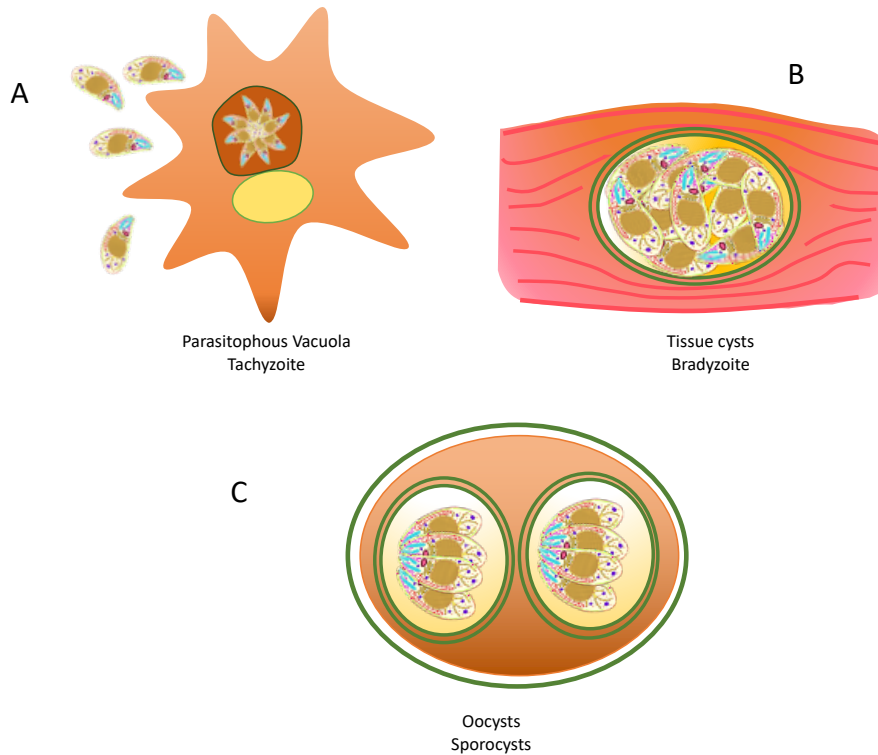


Figura 2. Formas infectivas de *T. gondii*. Los tres estadios infectivos de *Toxoplasma* incluyen: A) los taquizoítos alojados al interior de VP, aunque tienen una etapa extracelular cuando recién salen de células infectadas y están listos para invadir; B) los bradizoítos que se encuentran dentro de los quistes tisulares alojados en todos los tejidos del organismo principalmente en el músculo esquelético y en el cerebro, el proceso de división es asincrónico y su proliferación es lenta, C) los ooquistes que contienen 8 esporozoítos, los hallamos en el ambiente, estos son excretados de forma inmadura en las heces de gatos infectados y tienen la capacidad de resistir condiciones adversas de ambiente y temperatura.

2.3.1 Taquizoíto

El taquizoíto llamado así en referencia al término griego *Tachos* que significa velocidad es el estadio de *Toxoplasma* que se distingue de los demás debido a su alto índice de replicación, este parásito tiene forma de media luna y mide 2 x 6 μm , tiene un extremo anterior que termina en punta donde se encuentra el conoide y un extremo posterior redondeado (Figura 2) (Dubey et al., 1998). *Toxoplasma* está rodeado por un complejo de tres membranas llamado películo que consta de la membrana plasmática que rodea a todo el parásito y el

complejo membranal interno (IMC), el cual tiene dos elementos distintos: una serie de sacos de membrana aplanados llamados alveolos subyacentes a la membrana plasmática del parásito y un citoesqueleto formado por microtúbulos subpeliculares y una red entrecruzada de filamentos de naturaleza aún no determinada, los sacos alveolares del IMC están dispuestos como tres filas de placas de membrana fusionadas entre sí y tiene funciones importantes en la motilidad del parásito, la invasión a la célula hospedadora y la replicación intracelular (Chen et al., 2015; Foussard, Gallois, Tronchin, Robert, & Mauras, 1990; Harding et al., 2019). Adicionalmente, *Toxoplasma* tiene organelos típicos de una célula eucariota como: el núcleo que está ubicado en la parte media del parásito, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, y una sola mitocondria, además posee organelos especializados en la secreción de proteínas: micronemos, roptrías y gránulos densos que intervienen en la invasión del parásito. Tiene un apicoplasto que es un organelo multimembranal no fotosintético y vital para el parásito y que participa en la síntesis de ácidos grasos entre otros componentes del parásito (McFadden & Yeh, 2017). En la región apical está localizado el conoide, que está constituido por 8 estructuras microtubulares que se enrollan formando un cono truncado hueco que tiene la capacidad de contraerse como un resorte. El conoide está asociado a dos anillos conoidales (anillo apical anterior y posterior), tiene dos microtúbulos intraconoidales y está anclado a un centro organizado de microtúbulos conocido como anillo polar. Del anillo polar se organizan 22 microtúbulos subpeliculares dispuestos en espiral y que se extienden tres cuartas partes de la longitud del parásito (Figura 2) (Dubey et al., 1998; Gomez de Leon et al., 2014; Nichols & Chiappino, 1987).

Los taquizoítos se alojan al interior de la VP, dentro de células infectadas, donde proliferan por endodiogenia, un mecanismo de división asexual muy parecido a la fisión binaria; es un proceso sincrónico en donde al interior de una célula madre se generan dos células hijas (van den Zypen & Piekarski, 1968). Cuando *Toxoplasma* se encuentra dentro de esta VP, el organismo infectado activa sus mecanismos de defensa inmunológica, tal como la producción de anticuerpos, así como activación de linfocitos y secreción de citocinas como el INF- γ . Esta es una citocina que provoca una atenuación de la proliferación de *T. gondii* debido a la falta de nutrientes indispensables para el parásito produciendo en éste un evento de estrés. Al entrar en estrés, *Toxoplasma* deja de replicarse y comienza a diferenciarse hacia el estadio de

Bradizoíto, modificando a la VP en un quiste tisular (Hunter & Sibley, 2012; Sullivan & Jeffers, 2012).

2.3.2 Bradizoíto

El termino *brady* en griego significa lento y se refiere a la etapa de replicación lenta de *Toxoplasma*, haciendo alusión a la etapa de proliferación lenta de los bradizoítos dentro del quiste tisular (Dubey et al., 1998; Sullivan & Jeffers, 2012). Estructuralmente, los bradizoítos difieren ligeramente de los taquizoítos, ya que el núcleo lo tienen situado hacia la parte posterior del parásito, las roptrías se observan más alargadas y electrodensas. Además, los bradizoítos en comparación con los taquizoítos, contienen un número mayor de gránulos de amilopectina y micronemos, además, este estadio es más alargado y menos susceptible a la degradación con enzimas proteolíticas (Dubey et al., 1998). En cuanto a la composición de proteínas los bradizoítos cuentan con proteínas especializadas de acuerdo con su condición metabólica; BAG1 es una proteína de choque térmico que se sintetiza en respuesta a estrés del parásito, esta se encuentra en el citoplasma de este y se sintetiza en la etapa temprana de la diferenciación de *Toxoplasma*. Sin embargo, esta proteína aparentemente no es indispensable en la formación del quiste. El antígeno de superficie (SAG) 4, es otra de las proteínas diferenciales en el estadio de bradizoíto, esta proteína se encuentra en la membrana del parásito pero su función no ha sido estudiada en comparación con la proteína SAG1 que se halla en la membrana de los taquizoítos e interviene en el proceso de invasión (Jung, Lee, & Grigg, 2004; Odberg-Ferragut et al., 1996). En los bradizoítos también se pueden encontrar proteínas relacionadas con los procesos metabólicos, como lactato deshidrogenasa 2 (LDH2) y enolasa (ENO1). Una, cumple con la función de metabolizar más lento el piruvato, y la otra es resistente a alta temperatura (Dando et al., 2001; Dzierszinski, Mortuaire, Dendouga, Popescu, & Tomavo, 2001). La composición proteómica de esta forma de *Toxoplasma* es desconocida, debido a las dificultades técnicas para aislarlo en cantidades suficientes para su análisis.

El bradizoíto es la forma crónica de infección de *Toxoplasma*, este puede permanecer enquistado durante toda la vida del hospedero sin que se dispare una respuesta inflamatoria, su lenta proliferación, debido al estrés metabólico al que se somete, hace que este parásito al

replicarse pierda la sincronía en la división y se aloje dentro de una estructura quística, lo cual le permite pasar desapercibido para el sistema inmunológico (Sullivan & Jeffers, 2012).

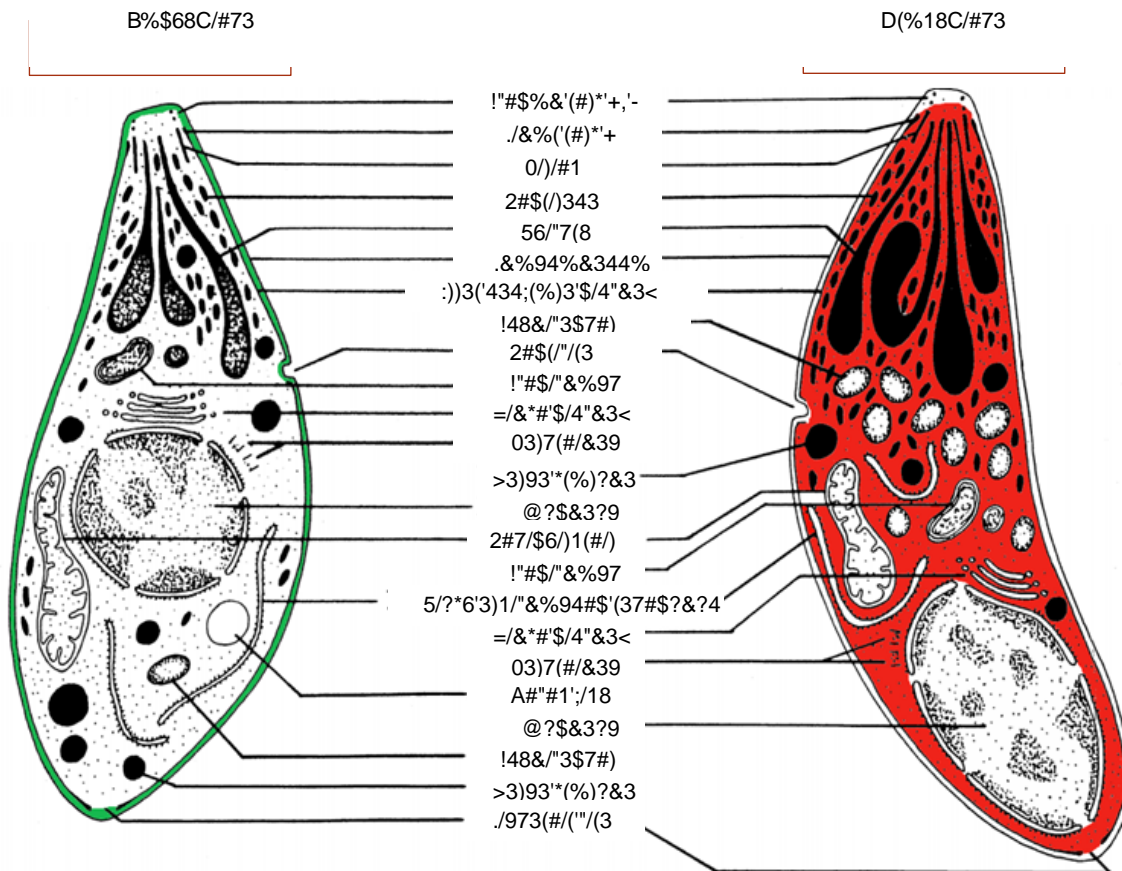


Figura 3. Taquizoíto y bradizoíto, principales estadios estudiados. Organelos presentes en el estadio de taquizoíto y bradizoíto, siendo; la localización del núcleo, el número de gránulos de amilopectina y micronemos, así como el tamaño de las roptrías, algunas de las principales diferencias estructurales que se observan en cada fase. En el taquizoíto, la marca verde indicada en el diagrama representa la localización de la proteína SAG1 la cual no se sintetiza en bradizoítos y en rojo está representada la proteína BAG1 que se encuentra en el citoplasma de los parásitos y no se sintetiza en el estadio de taquizoíto. Modificado de (Dubey et al., 1998)

2.3.2.1 Quiste tisular

Los quistes tisulares que albergan a los bradizoítos pueden detectarse de los 7 a los 10 días posteriores a la infección variando en tamaño y forma, los quistes jóvenes pueden medir 5

μm y contener solo 2 bradizoítos, mientras que los quistes maduros pueden medir hasta 100 μm y albergar hasta 1000 parásitos, debido a esto, la pared del quiste tiene cierta elasticidad que es proporcionada por las proteínas que la componen; quitina y glicoproteínas secretadas por el parásito, los azúcares, como N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina, de proteínas de la pared del quiste como CST1 tienen afinidad por algunas lectinas como la aislada de las semillas de *Dolichos biflorus* lo cual permite la fácil detección de las estructuras quísticas (Dubey et al., 1998; Sullivan & Jeffers, 2012; Tomita et al., 2013).

La pared del quiste tiene aproximadamente 0.5 μm de grosor, protege al parásito y tiene cierta permeabilidad por moléculas de menos de 10 kDa, por debajo de la pared quística y en el espacio entre los parásitos se encuentra la matriz intraquística, que es una malla filamentosa que envuelve al parásito y mantiene la cohesión entre ellos (Mehlhorn & Frenkel, 1980). Un estudio reciente identificó varios componentes proteicos, en su mayoría proteínas provenientes de los gránulos densos (GRA), que son indispensables en la construcción de la pared del quiste y en la infección latente, por lo que la comprensión de la biología de quiste y los mecanismos que intervienen en su formación permitirá el diseño de nuevas estrategias enfocadas hacia la eliminación de *Toxoplasma* (Tu et al., 2019).

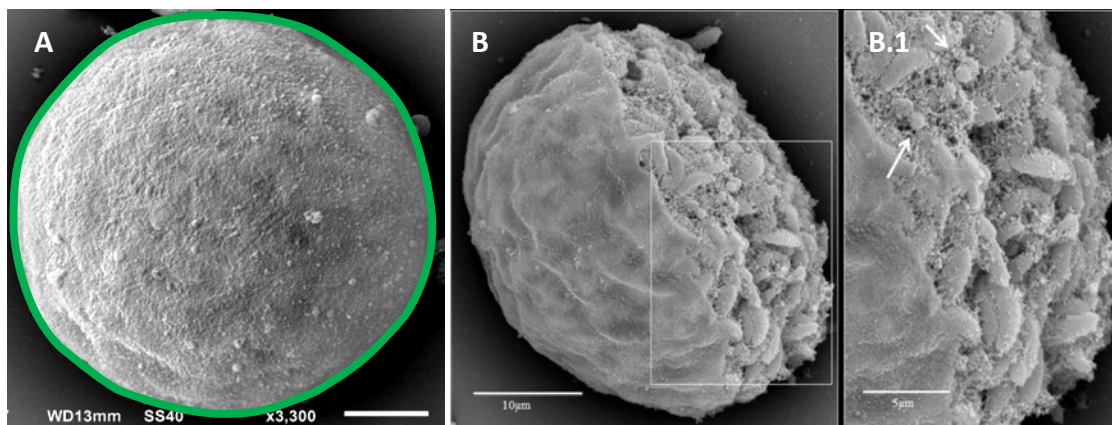


Figura 4. Quistes de *T. gondii* hallados en modelos murinos. A) Quiste tisular, micrografía de barrido de un quiste tisular, se remarcó en verde el contorno del quiste para denotar la localización de la glicoproteína CST1. B) Quiste abierto mediante técnica de Tanaka en muestra procesada para microscopía electrónica de barrido. Los parásitos están envueltos en una malla que mantiene la cohesión y por encima se encuentra la pared quística que es la barrera protectora de los parásitos, el cuadro blanco marca una amplificación que se muestra

en B.1. B.1) Se detalla la malla intraquística que se observa como una red que envuelve a los parásitos (flechas) y la pared del quiste cuyo grosor permite la protección de *Toxoplasma*. Escala en A y B= 10 μm , escala en B.1= 5 μm . Modificado de (Castro-Elizalde et al., 2018)

2.3.3 Esporozoíto

Estructuralmente, el esporozoíto es similar al taquizoíto, excepto que en el primero hay una mayor abundancia de roptrías, micronemos y gránulos de amilopectina, tienen un tamaño de 2 por 7 μm y poseen un núcleo polarizado hacia la parte posterior del parásito. Se encuentran 8 esporozoítos en cada uno de los ooquistes maduros. La barrera protectora del ooquiste permite la supervivencia de los esporozoítos durante un largo periodo de tiempo conservando su infectividad. La estructura de un ooquiste está compuesta por tres membranas, la más externa es muy electrodensa mientras la mediana es un poco menos electrodensa y la más interna moderadamente electrodensa, esta estructura posee un micrópilo de 350 nm de diámetro, este probablemente dejaría difundir libremente CO_2 y enzimas como tripsina que estimularían la activación de los esporozoítos para que estos puedan ser liberados de esta estructura y finalmente infectar al organismo (Dubey et al., 1998).

2.4 Enquistamiento de *Toxoplasma*

Después de la ingesta de ooquistes conteniendo esporozoítos, o de quistes tisulares conteniendo bradizoítos, los parásitos son liberados a la luz de intestino delgado por la acción del ácido gástrico y de la pepsina en el estómago. Al estar libre, *Toxoplasma* invade a los enterocitos del intestino, para replicarse y diferenciarse al estadio de taquizoíto (Black & Boothroyd, 2000; Pittman & Knoll, 2015). El parásito puede diseminarse atravesando la lámina propia a través de una ruta transcelular, invadiendo las células y lisándolas para atravesar hacia el otro lado. Una vía alternativa del cruce de *T. gondii* hacia la lámina propia es, que atravesase por una ruta paracelular rompiendo las uniones intercelulares y cruzando directamente el epitelio (Barragan, Brossier, & Sibley, 2005; Pittman & Knoll, 2015, Ramírez-Flores et al., 2020). Cuando *Toxoplasma* invade a los enterocitos, se secretan las quimiocinas MCP-1, MIP-2 y MIP-1 α y β , lo que resulta en el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, monocitos, células dendríticas (Kushnaryov, MacDonald, Sedmak, & Grossberg) y células T, hacia la lámina propia. Los neutrófilos y los monocitos

inflamatorios, se encuentran entre las primeras células que se translocan a la luz del intestino; en el sitio de la infección, los monocitos se diferencian a macrófagos o CD las cuales ayudan a la eliminación del parásito por fagocitosis, reclutamiento y estimulación de otras células inmunes y presentación de antígeno (Debierre-Grockiego et al., 2007; Pittman & Knoll, 2015). Sin embargo, *Toxoplasma* es capaz de invadir de manera activa o ser fagocitado por los leucocitos en donde puede proliferar evadiendo la unión fagolisosomal o escapando del fagosoma hacia una VP secundaria, y en su momento, puede aprovechar la propiedad de trans migración leucocitaria para llegar a múltiples tejidos al atravesar barreras inmunoprivilegiadas, en un mecanismo conocido como caballo de Troya (Buzoni-Gatel, Schulthess, Menard, & Kasper, 2006; Courret et al., 2006; Pittman & Knoll, 2015).

Los TLR específicos en las CD, implicados en la respuesta inmune a *T. gondii*, incluyen los TLR2, 4, 9, 11 y 12. En ratones, las CD reconocen a la profilina. Esta es una proteína de unión a actina que se localiza en el citoplasma del parásito y se piensa que interviene en la polimerización de actina, por lo que forma parte de la maquinaria que utilizan los protozoarios como *Plasmodium* y desde luego *T. gondii* para invadir a las células (Plattner et al., 2008; Yarovinsky & Sher, 2006), participando tanto en la invasión como en la salida activa de las células hospederas (Plattner et al., 2008). Cuando *Toxoplasma* inicia la invasión activa, la profilina del parásito se libera al medio extracelular mediante un mecanismo desconocido, aunque probablemente por un proceso de capping. Esta proteína, tiene una fuerte afinidad por receptores TLR 11 y 12 (Yarovinsky, 2014; Yarovinsky & Sher, 2006). En otras células, los TLR 2 y 4 parecen reconocer glicofosfatidilinositoles en la superficie del parásito.

En la infección oral, *Toxoplasma* modifica la flora intestinal, estas modificaciones provocan la translocación de bacterias hacia el intestino, que actuarían sinérgicamente con *Toxoplasma* activando la respuesta Th1 a través del TLR 9 (Debierre-Grockiego et al., 2007; Minns et al., 2006). La estimulación de estos receptores Toll provoca la activación de la proteína MYD88 y la consecuente secreción IL-12, que al ser sintetizada y procesada es secretada por las células dendríticas como un heterodímero compuesto por dos cadenas, la α y β , que están unidas por puentes disulfuro; una vez que la IL12 se encuentra en el espacio extracelular se une a su receptor en células TCD8⁺, TCD4⁺ y NK, lo que conduce a la producción y secreción

de IFN- γ principal mediador de la respuesta celular Th1 (Dupont, Christian, & Hunter, 2012) (Figura 5).

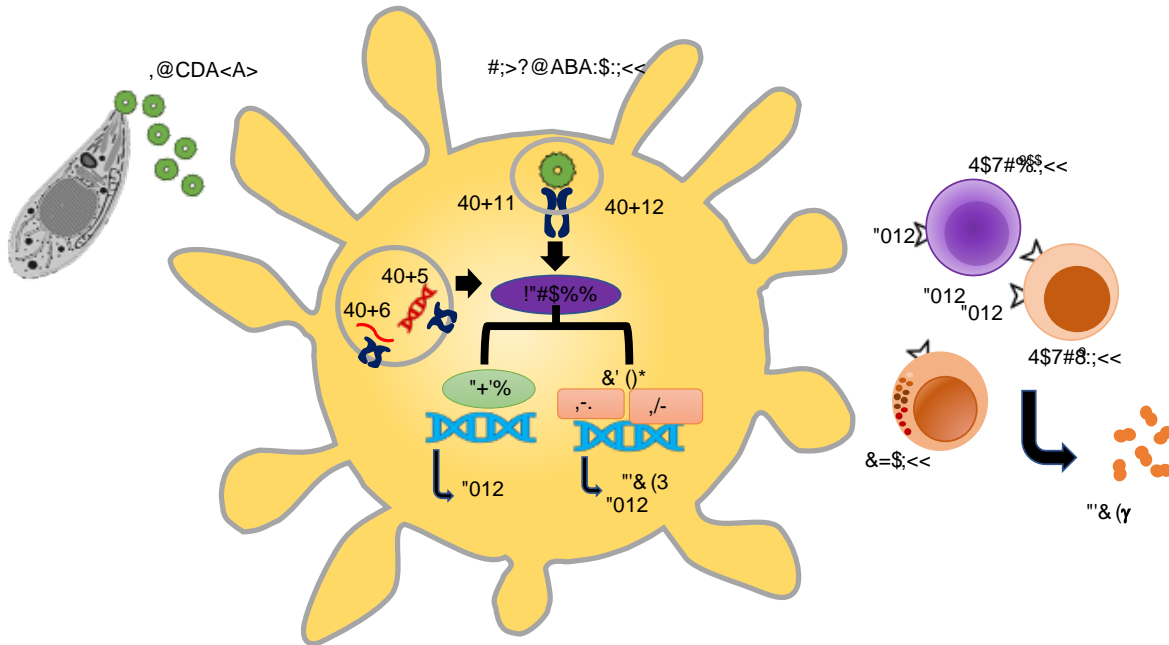


Figura 5. Reconocimiento de *T. gondii* por el sistema inmune. La profilina puede ser liberada por capping durante el deslizamiento del *Toxoplasma* o cuando el parásito se lisa, la proteína se dirige hacia el espacio extracelular junto con ADN y ARN de *T. gondii*, estas moléculas pueden ser fagocitadas por células dendríticas y conducirse hacia los fagolisosomas en donde se encuentra con receptores Toll. Los TLR unen a moléculas con secuencias PAMP, como la profilina. Estos TLR son activados al reconocer estas moléculas patógenas y conducen a la activación de Factor regulador de Interferón 8 (IRF8) y del factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF- $\kappa\beta$), estas proteínas activadas inducen la síntesis de citocinas como IL12 e IFN- γ que son secretadas por las CD, a su vez IL12 se une a su receptor en células especializadas como las NK y CD4⁺ y 8⁺, estas al ser activadas inducen la síntesis de más moléculas de IFN- γ . Modificado de (Suzuki, Orellana, Schreiber, & Remington, 1988; Yarovinsky, 2014)

IFN- γ es reconocido por un único receptor, el Receptor para Interferón-gamma (RIFN- γ), se encuentra en la mayoría de los tejidos del organismo, sin embargo, hay células que no lo expresan (Valente et al., 1992). Como consecuencia de la unión de IFN γ al receptor RIFN γ de células infectadas con *Toxoplasma*, ocurren varios eventos que tienen como fin la

atenuación de la toxoplasmosis, se ha descrito que en macrófagos se estimula a la IDO y a iNOS (Yarovinsky, 2014).

La IDO activada utiliza triptófano como sustrato, lo cual provoca el agotamiento de este aminoácido en la célula hospedera y consecuentemente en el parásito alojado dentro de la VP, el cual al estar bajo condiciones de estrés nutricional, dispara los mecanismos de diferenciación del *T. gondii* modificando la VP en un quiste tisular (Pfefferkorn, 1984; Yarovinsky, 2014). Por otro lado, la iNOS toma como sustrato arginina para convertirla en L-citrulina con la producción de NO. La inanición del parásito por falta de arginina, otro aminoácido esencial, provoca que este comience a diferenciarse, lo mismo sucede cuando *Toxoplasma* censa la presencia de óxido nítrico que es altamente tóxico y tiene la capacidad de destruir al parásito e inducir la producción de quistes (Sa, Tiwari, Ochiai, Mullins, & Suzuki, 2018).

Las proteínas de unión a guanilato (GBP) y las GTPasas (IRG) son proteínas relacionadas con la inmunidad y son inducidas por IFN- γ . Las GBP y las IRG son reclutadas hacia la VP, que se forma al entrar el parásito, las IRG tienen la función de modificar estructuralmente a las membranas por lo que al dirigirse a la VP provocan su destrucción y a consecuencia de esto, *Toxoplasma* queda expuesto y es fácilmente eliminado por autofagia y fusión lisosomal. Por otro lado, GBP se dirige a la membrana mediante mecanismos dependientes e independientes de p62 y mediante vesiculación rompe la membrana vacuolar dejando expuesto al parásito para que sea eliminado (Ling et al., 2006; Martens & Howard, 2006; Saeij & Frickel, 2017; G. A. Taylor et al., 2007) (Figura 6).

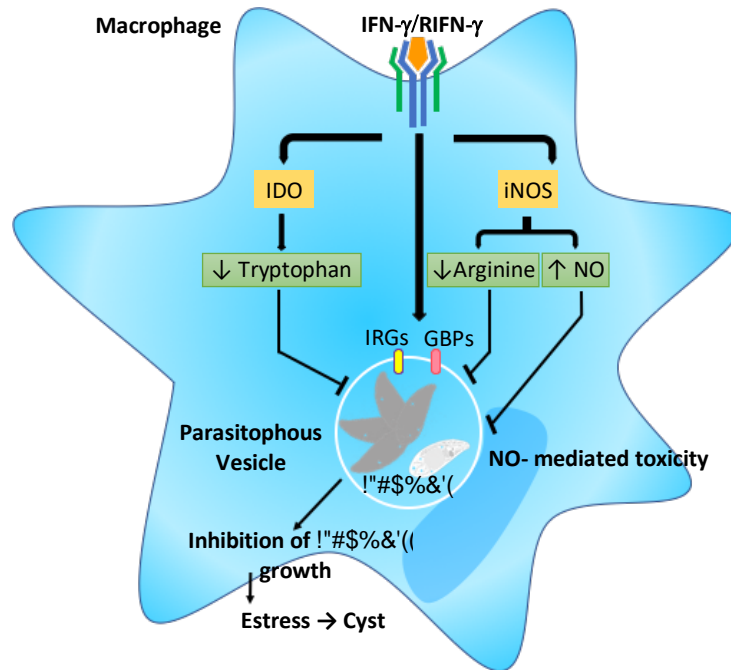


Figura 6. Efectos de la señalización mediada por IFN- γ que conducen a la atenuación de la toxoplasmosis. Durante la infección activa y cuando IFN- γ se une a su receptor en macrófagos pueden ocurrir distintos eventos. La inducción de IDO y la activación de iNOS, al mismo tiempo se induce un estallido oxidativo mediado por óxido nítrico, estos factores provocan estrés por inanición del parásito o incluso la muerte por el estrés tóxico al que se somete. Las IRGs y las GBPs se localizan en la membrana de la VP, estas proteínas al desfosforilarse provocan que la VP pueda fusionarse con los fagolisosomas y su contenido pueda ser destruido. Modificado de (Yarovinsky, 2014).

Toxoplasma a su vez cuenta con mecanismos de defensa ante la respuesta inmune, entre estos mecanismos, está la secreción de proteínas ROP (provenientes de las roptrias) algunas de las cuales son cinasas o pseudocinasas y que pueden bloquear la acción de las GBPs e IGRs. Estas proteínas ROP son activadas en respuesta a IFN- γ . Se ha encontrado, que algunas de estas proteínas, son mediadoras de la respuesta celular inducida por IFN- γ al fosforilar a las proteínas IGR y GBP, que se hallan ancladas a la VP, cuando las IGR y GBP son fosforiladas por las ROP se evita la degradación de la VP por los fagolisosomas (Saeij & Frickel, 2017). ROP18 es una proteína conocida por ser uno de los principales factores que contribuyen en la virulencia del parásito, y que es mayormente expresada en las cepas de *Toxoplasma* tipo 1

(S. Taylor et al., 2006). ROP18 es una cinasa de serina y treonina y es secretada al citoplasma de la célula hospedera en pequeñas vesículas, posteriormente, la cinasa se dirige a la superficie externa de la VP que contiene parásitos y fosforila los residuos de treonina en la región 1 del dominio de la IRG, siendo esta modificación la probable responsable de la inactivación de la función de la GTPasa (Fentress et al., 2010). La actividad no parece ser exclusiva de ROP18, la pseudocinasa ROP5 actúa sinérgicamente aumentando la actividad de ROP18 al interactuar con las IRG y exponer las treoninas que son fosforiladas por esta cinasa y así favorecer la configuración inactiva de los IRG (Zhao & Yap, 2014), en tanto la cinasa ROP17 también contribuye a evitar el reclutamiento de las IRG hacia *Toxoplasma* intracelular, manteniendo la integridad de la VP y del parásito (Li et al., 2019). Las actividades combinadas de ROP17 y ROP18 contribuyen a evitar el reclutamiento de IRG en *T. gondii* a consecuencia de la respuesta a IFN- γ , y la pseudocinasa ROP5 regula a estas cinasas activas para frustrar sinérgicamente la inmunidad innata (Etheridge et al., 2014).

Adicionalmente, otra actividad que se ha atribuido a las proteínas ROP y que está relacionada con la supervivencia de *Toxoplasma*, es que mediante un mecanismo aun no conocido, tienen efecto sobre la carga de quistes hallados en modelos murinos lo que sugiere que las proteínas ROP no solo tienen una función dirigida (N. G. Jones, Wang, & Sibley, 2017), sino que son proteínas versátiles involucradas desde la invasión por *T. gondii* a las células blanco hasta la propia supervivencia del parásito al ayudar a evadir la respuesta inmune.

Una molécula que también es determinante para atenuar la infección por *Toxoplasma* es el TNF- α , esta citocina es secretada por neutrófilos, macrófagos, microglía y células T, y forma parte de la respuesta celular Th1. El TNF- α generalmente actúa como una molécula co-estimuladora al promover la síntesis de IFN- γ pero también juega un papel importante junto con esta citocina para controlar la infección a largo plazo disminuyendo el nivel intracelular de *T. gondii*, disminuyendo su crecimiento y promoviendo su enquistamiento. Sin embargo, TNF- α no tiene efecto en células que no han sido previamente estimuladas por IFN- γ , lo que demuestra la dependencia de esta citocina para controlar el crecimiento de *Toxoplasma* (Dupont et al., 2012; Pittman & Knoll, 2015; Sullivan & Jeffers, 2012).

2.5 Inducción del enquistamiento en *Toxoplasma*

La diferenciación entre las distintas etapas del desarrollo de *T. gondii* (esporozoítos, taquizoítos y bradizoítos) es fundamental para el ciclo de vida del parásito y para la transmisión entre las especies. También está interconectado con la patogénesis de la toxoplasmosis y hace que *Toxoplasma* sea un importante patógeno oportunista en los seres humanos. Con el fin de determinar los mecanismos subyacentes, se han desarrollado sistemas de diferenciación en cultivo celular que imitan la transición de taquizoíto a bradizoíto y formación de quistes tisulares *in vitro* (Soete, Camus, & Dubremetz, 1994) (Figura 7). Uno de los métodos más utilizados para provocar la diferenciación a bradizoíto es mediante la exposición a condiciones de estrés como el mantenimiento de los parásitos a un pH alcalino (8-8.2), adicionalmente se han reportado una amplia variedad de condiciones inductoras de la cistogénesis como la exposición a nitroprusiato de sodio, que actúa como una fuente de óxido nítrico exógeno, el cual reacciona con los centros hierro-azufre en las proteínas, inhibiendo así a las proteínas involucradas en la cadena respiratoria mitocondrial (Bohne, Heesemann, & Gross, 1994). El choque térmico y el tratamiento con arseniato de sodio también provocan la expresión de antígenos de bradizoíto (Soete et al., 1994). La privación de nutrientes, también es un potente inductor en la diferenciación a bradizoítos y se puede lograr a través de la privación de arginina en el medio; la arginina es un aminoácido indispensable para *Toxoplasma*, cuya privación provoca un estado de inanición en el parásito que culmina con la inhibición del crecimiento y posterior enquistamiento (Fox, Gigley, & Bzik, 2004; Yahiaoui et al., 1999). Recientemente, se han caracterizado factores que influyen en la diferenciación del parásito, tales como el estrés del retículo endoplásmico o aquellos que interfieren con la inducción de la salida de calcio (Nagamune et al., 2008; Narasimhan et al., 2008). La inhibición de la síntesis *de novo* de los nucleótidos de purina también es un importante desencadenante del enquistamiento de *Toxoplasma*, lo cual se ha logrado mediante la exposición de los parásitos al fármaco inmunosupresor ácido micofenólico. El ácido micofenólico actúa inhibiendo la enzima inosina monofosfato deshidrogenada (IMPDH) que cataliza la oxidación de inosina 5 monofosfato a xantina 5 monofosfato. En *Toxoplasma*, se han encontrado dos isoformas de la IMPDH y estas enzimas son cruciales para el metabolismo de purinas en *T. gondii* que se sabe, es auxótrofo para los nucleótidos de purina y es dependiente de la ruta de salvamento (Castro-Elizalde et al., 2018).

Adicionalmente, el tratamiento de cultivos *in vitro* con IFN- γ , ha demostrado limitar la replicación de los parásitos, provocando estrés debido a la inanición de arginina y triptófano en los parásitos o por la producción de óxido nítrico (Bohne, Heesemann, & Gross, 1993; Bohne et al., 1994).

El análisis del efecto del IFN- γ en la diferenciación de *Toxoplasma* a bradizoíto cultivados en macrófagos murinos, sugieren que el NO, es responsable del cambio de estadio, actuando indirectamente sobre el parásito y posiblemente también en la célula hospedera; sin embargo, el papel del NO en este proceso aún no ha sido bien determinado (Ferreira da Silva Mda, Barbosa, Gross, & Luder, 2008).

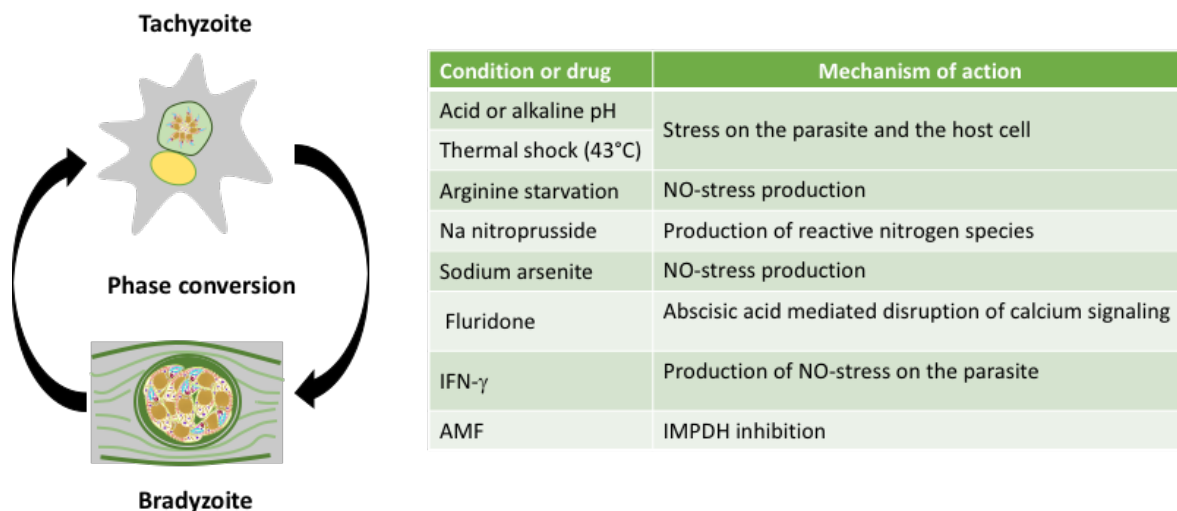


Figura 7. Inducción de la cistogénesis *in vitro*. La conversión de taquizoíto a bradizoíto se puede inducir *in vitro* utilizando en su mayoría condiciones o moléculas que inducen estrés en el parásito provocando un aletargamiento en el metabolismo de *Toxoplasma* y favoreciendo la conversión de taquizoíto a bradizoíto y la transformación de la VP en un quiste tisular. Modificado de (Weiss et al., 1995)

Por otra parte, se ha observado que IFN- γ interviene en la replicación del parásito y en el mantenimiento del quiste de *Toxoplasma*, ya que al remover al IFN- γ de los cultivos donde previamente había quistes preformados, se reactiva la infección y se observa la conversión de los parásitos de bradizoíto a taquizoíto. Por lo que, se puede hipotetizar que IFN- γ estabiliza los quistes de *T. gondii* manteniendo los bradizoíto maduros en la fase G0, es decir

deteniéndolos en esta etapa del ciclo celular. Por el contrario, tras la eliminación del IFN- γ puede ocurrir la reconversión a taquizoítos reactivando el ciclo celular (Radke, Guerini, Jerome, & White, 2003).

Además del IFN- γ , se ha estudiado el efecto de otras citocinas proinflamatorias en la conversión de *Toxoplasma* a bradizoítos. La interleucina (IL-6) que es producida por diversos tipos de células linfoides y no linfoides durante la respuesta inflamatoria, aumenta el número de quistes de *Toxoplasma* que se forman *in vitro* en fibroblastos humanos. El mecanismo por el cual ocurre esto aún no es conocido (Weiss et al., 1995). En contraste, en macrófagos murinos, el TNF- α junto con baja concentración de IFN- γ , inducen la transición de taquizoíto a bradizoíto, esto probablemente por la presencia del IFN- γ en el medio ya que cuando se coloca únicamente TNF- α en el medio, no se promueve la diferenciación del parásito (Bohne et al., 1994).

2.6 Interferón gamma y su receptor

El IFN- γ , es una citocina producida por las células NK y los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ principalmente. Tiene la capacidad de aumentar la expresión de genes relacionados con el reconocimiento de patógenos, procesamiento y presentación de antígenos, respuesta antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora, este es el único interferón que se clasifica dentro de la clase tipo II ya que se une a un receptor de superficie celular distinto al de los interferones de clase I. Este receptor se compone de dos subunidades R α IFN- γ y R β IFN- γ , que se asocian con JAK1 y JAK2 respectivamente (Figura 8A). Cuando IFN- γ se une a las cadenas α (R α IFN- γ), comienza la activación de las cinasas JAK (Figura 8B); estas cinasas una vez activadas regulan la fosforilación de STAT1 y esto da como resultado la formación de homodímeros STAT1-STAT1 que se translocan al núcleo y se unen a GAS (sitio activado por IFN- γ) para inducir la transcripción de genes (Shuai, Schindler, Prezioso, & Darnell, 1992; van Boxel-Dezaire & Stark, 2007) .

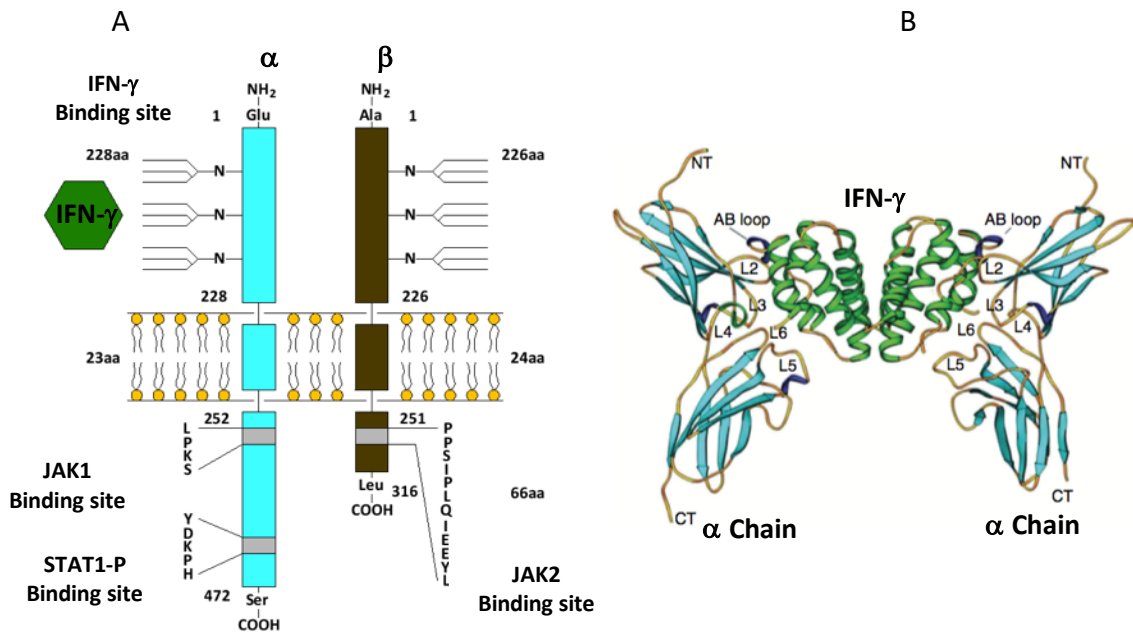


Figura 8. Receptor para IFN- γ y estructura terciaria de las cadenas α uniendo IFN- γ .

A) Cadena α y β del receptor para IFN- γ , en el dominio extracelular de α se encuentra el sitio de unión para IFN- γ y en el dominio intracelular se encuentra el sitio de unión para la cinasa JAK1 y para STAT1 fosforilada (P) y en β , en el dominio intracelular se encuentra el sitio de unión para la cinasa JAK2. B) Estructura terciaria de las dos cadenas α uniendo el dímero de IFN- γ . En ambas cadenas del lado extracelular se observan sitios de glicosilación que no son indispensables para la unión de IFN- γ a el receptor. PDB: 6E3K (Pestka, Krause, & Walter, 2004) y modificado de (Bach, Aguet, & Schreiber, 1997)

Además de la vía canónica JAK-STAT, muchas moléculas efectoras se activan río abajo después de la unión del IFN- γ a su receptor. Las rutas mejor caracterizadas son PI3K y la vía de las MAP cinasas. La activación de estas vías tiene varios resultados que son importantes en la señalización del IFN- γ : por ejemplo, la fosforilación, por una MAP cinasa, de STAT1 en S727 (sitio no indispensable para la formación del homodímero de STAT1) aumenta la eficacia transcripcional de STAT-STAT; además, la fosforilación y la activación de los sustratos adicionales que se encuentran río abajo de STAT1, dan como resultado la estimulación de cascadas de transducción alternativas que conducen a la transcripción de genes independientes a STAT1, y por lo tanto representan respuestas secundarias a la vía (Wen, Zhong, & Darnell, 1995). Adicionalmente se ha observado que tres isoformas de PKC

(α , ϵ y δ) son activadas en respuesta a IFN- γ , y en consecuencia se aumenta la transcripción del complejo principal de histocompatibilidad clase II y la fosforilación de cinasas reguladas por señales intracelulares 1/2 (ERK1/2) y de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP) cinasas (Choudhury, 2004; Giroux, Schmidt, & Descoteaux, 2003; Ramsauer et al., 2002). Por otra parte, algunos estudios han demostrado que PKC tiene un papel importante en la señalización mediada por IFN- γ ya que puede funcionar como una serina cinasa para STAT1 e incluso podría estar involucrada en la actividad transcripcional independiente a la vía de IFN- γ . Estudios recientes han demostrado que la proteína cinasa C (PKC) se activa río abajo de PI3K y funciona como una serina cinasa dirigida a STAT1 en algunas células como las mesangiales, es decir, la activación de la fosfoinositido 3-cinasa (PI3K) en última instancia, resulta en la activación río abajo de la proteína cinasa C, que a su vez regula la fosforilación de STAT1 en el residuo de serina en la posición 727. La fosforilación de serina en esta posición no es esencial para la translocación de STAT1 al núcleo o para la unión de STAT1 al ADN pero es necesaria para la activación transcripcional completa que es inicialmente activada por la vía de señalización IFN- γ JAK-STAT (Platanias, 2005).

La regulación negativa de la vía JAK-STAT se logra mediante mecanismos comunes (Figura 9), tales como la internalización del receptor en vesículas endocíticas y su posterior degradación. Las señales de inhibición más específicas se dan a través de la intervención de las proteínas tirosina fosfatasas que pueden actuar desfosforilando los dímeros de STAT activados a nivel nuclear y reciclando el monómero de esta proteína para que pueda migrar nuevamente a la membrana (David, Grimley, Finbloom, & Larner, 1993; Haspel, Salditt-Georgieff, & Darnell, 1996). Por su parte las JAKs tienen sus propios inhibidores llamados proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOC) (Gazzinelli et al.) que se unen directamente a las cinasas y las inactivan (David et al., 1993). La internalización del receptor de IFN- γ , sucede después de la unión del ligando y la formación de complejos, esto a través de dos vías diferentes: por medio de caveolas y mediante “coated pits” de clatrina, este mecanismo de regulación se pudo observar entre los 1.5 y 15 min dependiendo de las células utilizadas (Kushnaryov et al., 1988; Sadir, Lambert, Lortat-Jacob, & Morel, 2001; Wilmes et al., 2015).

La internalización del receptor se produce a una velocidad constante y una vez interiorizado puede ser degradado dentro de compartimentos ácidos intracelulares o puede ser reciclado y

enviado a la superficie celular, permitiendo de esta manera que la célula pueda interactuar de nuevo con otras moléculas de IFN- γ . Datos adicionales, han demostrado que la internalización del IFN- γ , es mediada a través de su unión específica a su receptor y no a través de su pinocitosis. Estas observaciones se respaldan mediante ensayos utilizando células deficientes en la expresión del receptor (Macrófagos P388D1), determinando que, estas también tenían deficiencias en la degradación de IFN- γ . Además, la degradación es inhibida por anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de IFN- γ a su receptor. En contraste, se ha reportado que el reciclamiento del receptor no es dependiente de la unión del IFN- γ , como se había propuesto, sino el receptor se recicla de forma constitutiva pudiendo reaparecer en la superficie celular (Celada & Schreiber, 1987).

Por otra parte, el receptor de IFN- γ está constituido por dos subunidades, la subunidad α con 489 aminoácidos y un peso molecular de ~ 54 kDa y la subunidad β con 356 aa y un peso molecular de ~ 38 kDa. Ambas subunidades presentan dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares (Figura 8A). En ausencia de ligando, las dos subunidades presentan uniones débiles o están separadas; sin embargo, con la presencia de IFN- γ se acopla el receptor completo activando su funcionalidad (Fischer, Novick, Orchansky, & Rubinstein, 1988).

El RIFN- γ es sintetizado en el retículo endoplásmico y glicosilado en el aparato de Golgi. Al final ocurren tres glicosilaciones intermedias que son importantes para que el receptor se exprese en la superficie celular, estos receptores maduros que se encuentran en la membrana plasmática presentan una masa aproximada de 80 y 95 kDa (Fischer et al., 1988), siendo esta masa molecular producto de las diferencias de glicosilación entre algunos tejidos. La caracterización completa del receptor de humano fue lograda mediante clonación. Los genes del receptor, tanto en humano como en murino se hallaron en el cromosoma 6 y 9, respectivamente (Kozak et al., 1990).

El receptor α del IFN- γ se une al ligando con alta afinidad ($K_a = 1 \times 10^{-9}$ a 1×10^{-11} M) y se expresa en la mayoría de las células en niveles de 200 a 25,000 sitios/célula. Por ejemplo, en células HEP-2 se ha demostrado que hay alrededor de 4,900 y 6,200 sitios de unión. Las constantes de afinidad presentan valores de alrededor de 0.5 y 3.5×10^{-10} M en todos los linajes (Langer & Pestka, 1988; van Loon et al., 1991).

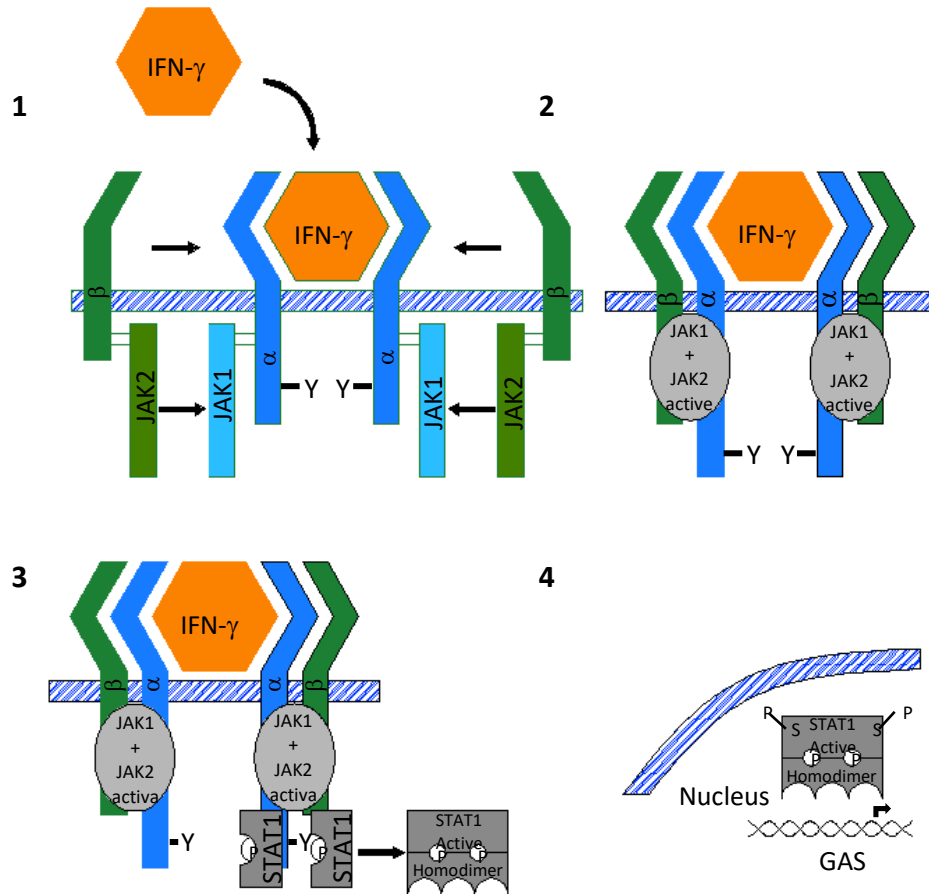


Figura 9. Señalización por IFN- γ . El receptor se compone de dos subunidades, IFNGR α y IFNGR β , que se asocian con JAK1 y JAK2, respectivamente. 1) El homodímero de IFN- γ se une a las cadenas α provocando un cambio conformacional que induce la autofosforilación de JAK2, la proteína fosforilada transfosforila a JAK1. 2) La cinasa fosforilada, fosforila un residuo de tirosina de la cadena α . 3) la proteína STAT1 es reclutada y es fosforilada al unirse a las cadenas α , ya fosforilada forma un homodímero. 4) El homodímero de STAT1 es translocado al núcleo en donde se une al sitio GAS del ADN para inducir la transcripción de genes (Bach et al., 1997).

2.7 Receptores no inmunes para IFN- γ .

La cadena α del receptor para IFN- γ , es la encargada de unir a la citocina y comenzar así con la cascada de señalización (Green, Young, & Valencia, 2017). En el sitio de unión, se

encuentran 5 sitios posibles de glucosilación, los cuales son dispensables para la señalización por el receptor (Schreiber & Farrar, 1993).

Por otro lado, diversos estudios han revelado que si bien muchos organismos expresan el receptor para IFN- γ , este es específico de especie. Por lo que la afinidad de cada molécula de IFN- γ a su receptor depende del origen de estos (Gibbs et al., 1991; Schreiber & Farrar, 1993). Un hecho interesante es que algunos poxvirus tienen en su genoma una secuencia que codifica para una proteína similar al receptor de IFN- γ en mamíferos (Alcami & Smith, 1996b). La primera en reportarse fue en el virus *Mixoma* en donde se encontró que la proteína que une IFN- γ es un receptor soluble para la citocina y tiene un 25% de identidad con el receptor de conejo, esta proteína es soluble y es sintetizada por los organismos infectados por el virus del *Mixoma* (Mossman, Upton, & McFadden, 1995; Upton, Mossman, & McFadden, 1992). Una vez secretada hacia el espacio extracelular, tiene una alta afinidad por el IFN- γ secretado por las células especializadas de los organismos infectados y cuando el receptor de *Mixoma* se une a IFN- γ , este provoca la inhibición de la respuesta inmune permitiendo la proliferación del virus (Upton et al., 1992).

Posteriores estudios encontraron que los poxvirus como en el virus *vaccinia* y *cowpox* también tienen la capacidad de inducir la secreción del receptor en células infectadas (Alcami & Smith, 1996a, 1996b). El virus de *Mixoma* induce la síntesis de M-T7 la proteína de unión a IFN- γ la cual es análoga a la proteína B8 en el virus *Vaccinia*; esta proteína B8, tiene la facultad de formar dímeros y unirse con el homodímero de IFN- γ (Figura 10) (Alcami & Smith, 2002). Si bien M-T7 es una proteína que tiene alta especificidad de especie al solo unirse a su ligando de IFN- γ en conejo, B8 muestra una inusual amplia facultad de unirse con los IFN- γ de distintas especies como humano, bovino y rata; sin embargo, tiene poca afinidad por el IFN- γ de conejo (Mossman, Upton, Buller, & McFadden, 1995; Symons, Tschärke, Price, & Smith, 2002). Además, estos tipos de virus también llevan consigo secuencias para proteínas de unión a otras interleucinas como: TNF- α , IL-1 β e IL-8 los cuales los hace más virulentos al momento de invadir (Lalani et al., 1997; Lalani & McFadden, 1997).

Un hecho interesante es que además de los virus, se ha encontrado que el parásito anaeróbico causante de la amebiasis, *Entamoeba histolytica*, también expresa proteínas que son homólogas a las proteínas de mamíferos y las usa como factores de virulencia.

Interesantemente este parásito también expresa proteínas de unión a citocinas como IL-8 y recientemente se ha encontrado que es capaz de sintetizar una proteína de unión a IFN- γ la cual es considerada como un factor de virulencia ya que esta proteína al unirse a IFN- γ aumenta la capacidad fagocítica, el efecto citopático y la formación de abscesos hepáticos (Diaz-Valencia, Perez-Yepe, Ayala-Summano, Franco, & Meza, 2015; Pulido-Ortega et al., 2019). Un hecho importante, es que esta proteína se encuentra en la membrana de *E. histolytica* y funciona como una proteína receptora de IFN- γ . Aunque su mecanismo de señalización aún es desconocido, esta proteína cuando se une a IFN- γ tiene la capacidad de regular positivamente factores de virulencia en el parásito. Está anotada como una posible cinasa de tirosina y tiene 20 % de identidad con la cadena α del RIFN- γ humano (Pulido-Ortega et al., 2019).

Además de este tipo de receptores que se unen a citocinas en *E. histolytica* al igual que otros parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Trichomonas vaginalis*, se han identificado receptores para otras moléculas de los hospederos, entre las que están receptores para fibronectina y colágeno, cuyas funciones intervienen en el reconocimiento a la célula blanco participando en los procesos de invasión de estos parásitos (Franco, Manning-Cela, & Meza, 2002; Talamas-Rohana, Rosales-Encina, Gutierrez, & Hernandez, 1992; Velge, Ouaisi, Cornette, Afchain, & Capron, 1988).

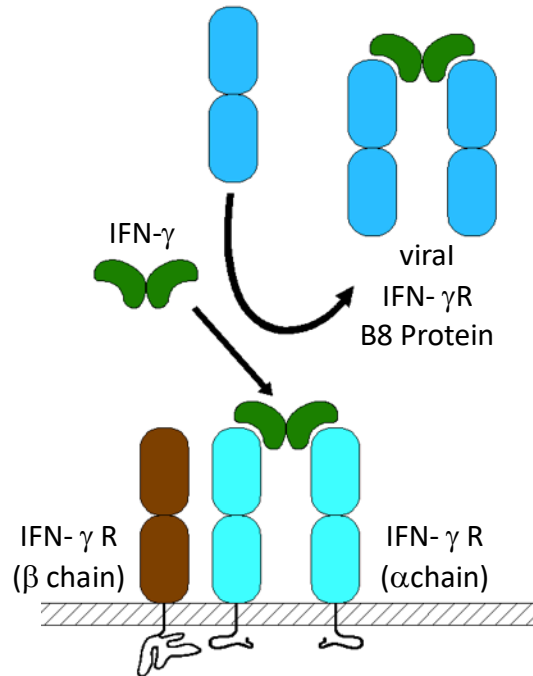


Figura 10. Receptor para IFN- γ en humanos y *Vaccinia* virus. El receptor para IFN- γ en mamíferos está compuesto por dos cadenas α y dos cadenas β , las encargadas de unir a la citocina son las cadenas α ; sin embargo, en organismos infectados por el virus *Vaccinia*, dos moléculas de RIFN- γ soluble del virus compiten por IFN- γ del medio extracelular impidiendo la unión de la citocina con las cadenas α del receptor en mamíferos. Modificado de (Alcami & Smith, 1996a).

3.0 Antecedentes directos

Los modelos *in vitro* de diferenciación a bradizoítos que emplean citocinas proinflamatorias tienen la intención de generar estrés en el parásito, ejercido en parte, por la respuesta inmune. Se ha encontrado que la exposición a IFN- γ de cultivos celulares infectados con taquizoítos de *T. gondii*, no solo limita la replicación del parásito, sino que también induce la formación de quistes (Figura 11) (Bohne, Holpert, & Gross, 1999). Este efecto solo se ha reportado en cepas del tipo II y III de *Toxoplasma*; sin embargo, no se había podido inducir la diferenciación a bradizoítos de la cepa RH (tipo I), una cepa no formadora de quiste, o de las cepas VEG y ME49, sometidas al tratamiento con esta citocina (Soete et al., 1994).

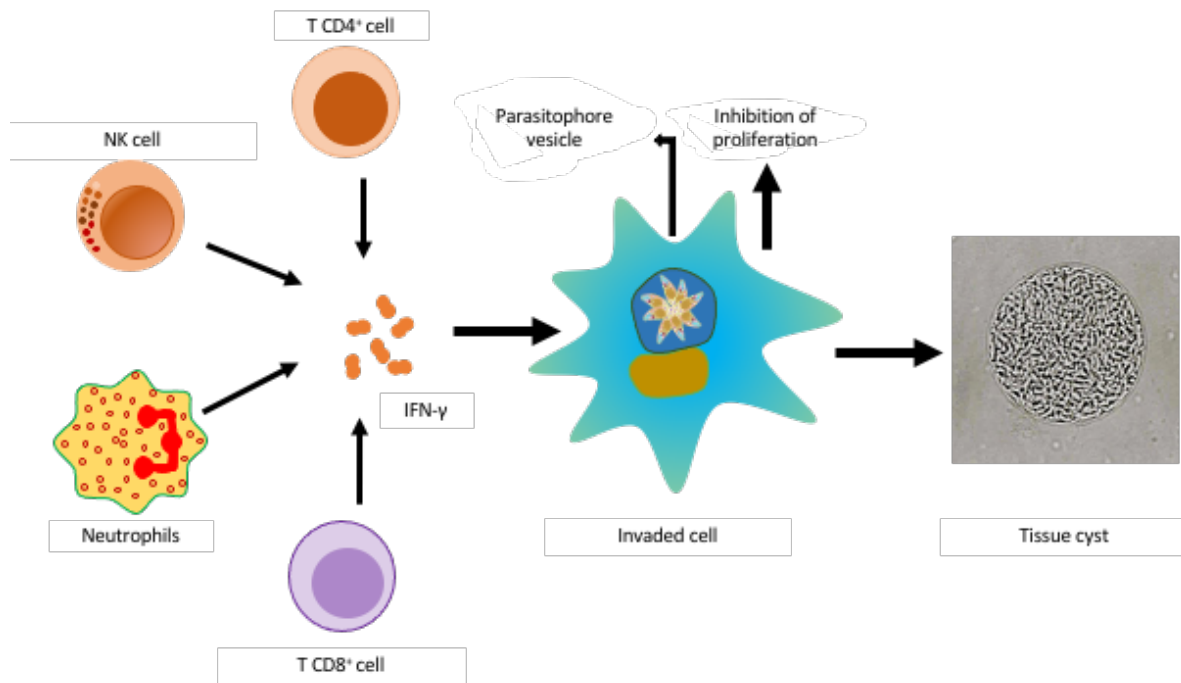


Figura 11. Células de la respuesta Th1 son responsables de la diferenciación de *Toxoplasma*. Una vez que IL-12 se une a su receptor en células como T CD4⁺, T CD8⁺, Natural killer y neutrófilos se induce la secreción de IFN- γ el cual activa señales que tienen como consecuencia la inhibición de la proliferación de *Toxoplasma* dando paso a la generación de quistes tisulares en el organismo infectado. Modificado de (Yarovinsky, 2014).

En estudios realizados recientemente, utilizando células HEp-2 que fueron previamente invadidas con taquizoítos de *Toxoplasma* y mantenidas en medio de cultivo expuestas a distintas concentraciones de IFN- γ , se observó que dependiendo del tiempo y la concentración de IFN- γ , la expresión de antígenos de bradizoíto como BAG1 y la glicoproteína CST1 aumentaba (Fig. 12) (Ospina Riaño, 2015).

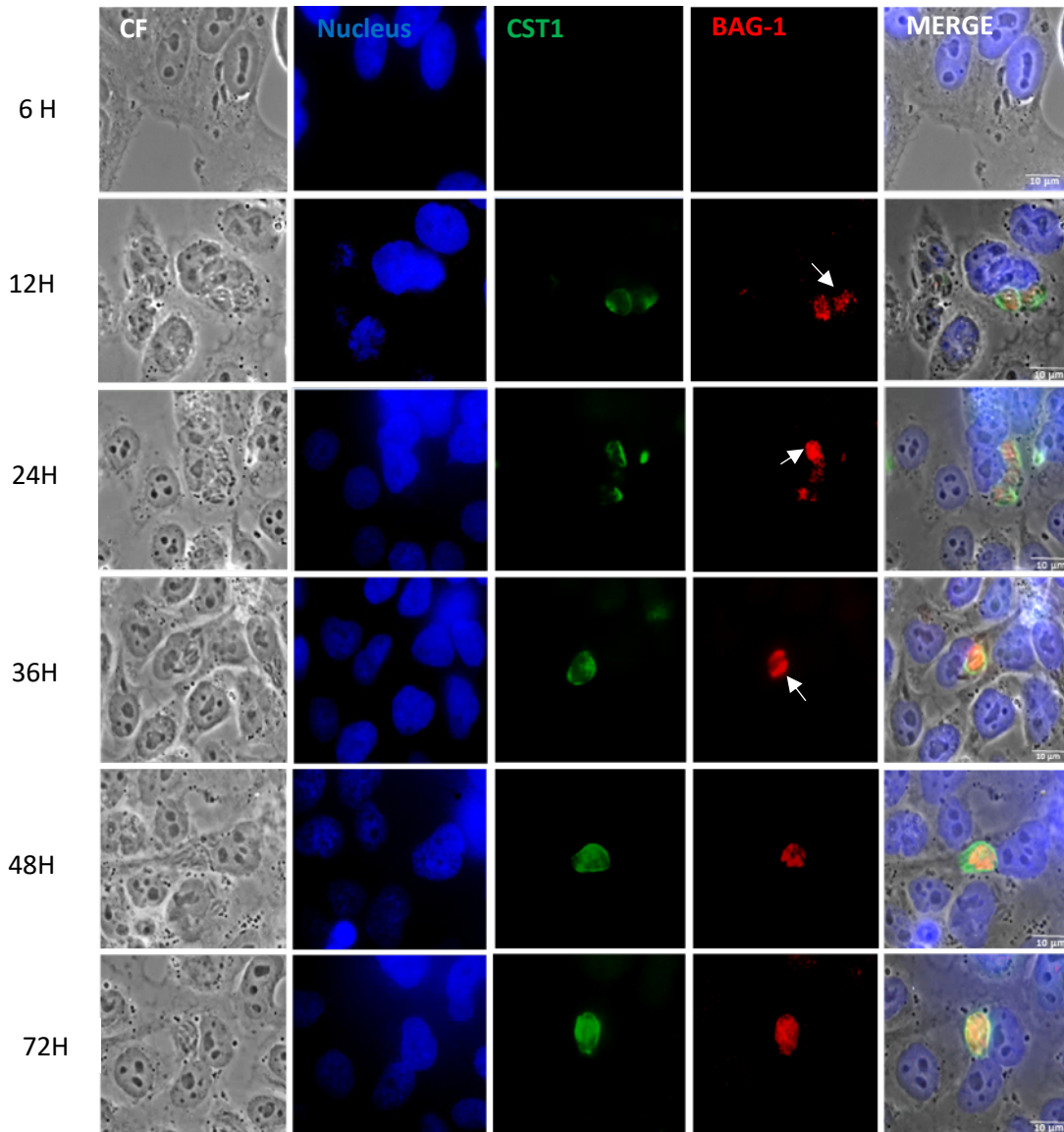


Figura 12. Co-expresión de CST1 y BAG1 durante el curso temporal de la cistogénesis inducida por exposición a IFN- γ . El cultivo celular invadido con *Toxoplasma* fue expuesto a 200 U/ml de IFN- γ por 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h, la flecha blanca indica a la proteína BAG en citoplasma de bradizoítos. CF= Contraste de fase, Núcleo marcados con DAPI, CST1= lectina *D. biflorus*-FITC, BAG1-TRITC, Merge= a contraste de fase + fluorescencia. Escala = 10 μ m. (Ospina Riaño, 2015)

Por consiguiente, la adición de IFN- γ al cultivo infectado, indujo modificaciones en la organización intravacuolar típica de los parásitos cuando proliferan como taquizoítos,

encontrando significativas diferencias en comparación con la proliferación de los taquizoítos cultivados en medio desprovisto de la citocina (Fig 13). Además, al evaluar la expresión de la glicoproteína CST1 se observó que al aumentar la concentración de IFN- γ , con las que se indujo la diferenciación, se aumentaba gradualmente el porcentaje de VPs que dieron marcaje positivo para CST1 (datos no mostrados) (Ospina Riaño, 2015). También se demostró por microscopía confocal que los parásitos con mayor tiempo de proliferación y que se encontraban dentro de estas VPs positivas, expresaban BAG1 un antígeno que se encuentra en el citoplasma del parásito y que se expresa en los bradizoítos de *Toxoplasma* (Fig. 12).

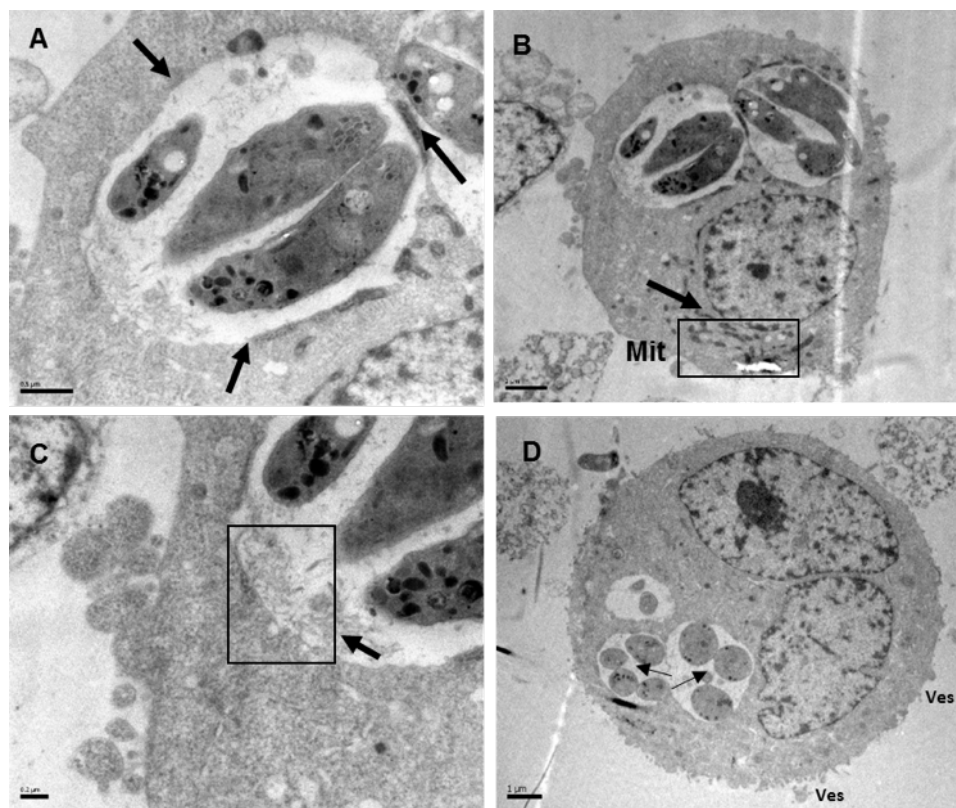


Figura 13. Formación de la pared quística, polarización de la red vesículo tubular, dispersión mitocondrial y desorden intravacuolar. Tratamiento con 200 U/ml de IFN- γ por 3 días. A, Etapa temprana de la pared quística las flechas indican la formación de la pared del quiste. B, mitocondrias dispersas en citosol, recuadro y flechas. C, polarización de la red vesículo-tubular, recuadro y flechas. D, vesículas en cara externa de la membrana celular, flechas. Escala= 0.5 μ m, escala= 2 μ m, escala= 0.2 μ m, escala= 1 μ m respectivamente (Ospina Riaño, 2015)

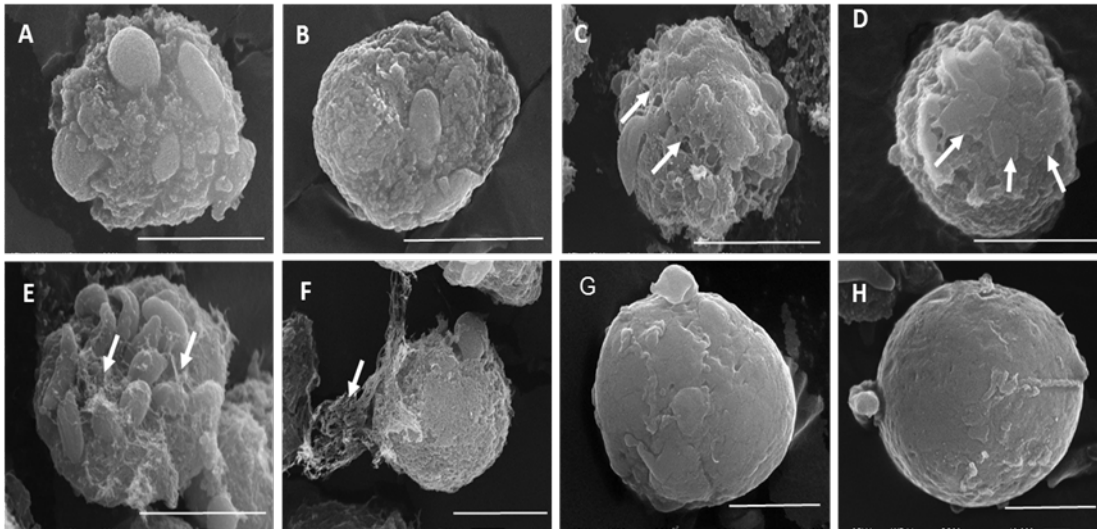


Figura 14. Evolución de quistes a los 6 y 10 días de exposición al IFN- γ . Los taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* se expusieron a 200 U/ml de IFN- γ . (A-B) Quistes con 6 días de maduración; (C-D) formación de capas, flechas. (E) Presencia de matriz intraquística, flechas (F) Presencia de una matrix extraquística que enreda y recubre a los quistes, flechas. (G-H) quistes con 10 días. Estructuras esféricas que corresponden a quistes en maduración. Escalas= 5 μ m. (Ospina Riaño, 2015)

Cuando los taquizoítos se incubaron con 200 U/ml de IFN- γ por tiempos prolongados (entre 6 y 10 días), se encontró que las células infectadas, se redondeaban y adquirían una forma esférica, las cuales se desprendían de la monocapa de células. Estas estructuras tienen apariencia de quistes en formación y además, tienen diferentes capas en forma de placas que envuelven a los parásitos en su interior, también se observó que la membrana de la VP se engrosaba aparentemente para dar forma a la pared quística y se observó una malla intraquística que envuelve a los parásitos (Fig 14). Adicionalmente, algunos quistes mostraban una matriz fibrosa que los envolvía por la parte externa.

Por lo que se demostró que, a pesar de que la cepa RH de *Toxoplasma* es considerada como no cistogénica, debido a su alta letalidad, esta es capaz de formar estructuras prequísticas cuando se mantiene en cultivo y en contacto con IFN- γ . En ese mismo sentido, hasta la fecha no se tienen claros los mecanismos que induce esta citocina para que el parásito pueda

diferenciarse y aún más no se ha elucidado si el IFN- γ tiene un efecto sobre su receptor en la célula hospedadora o interactúa directamente con el parásito, es decir, si el IFN- γ activa los taquizoítos para que puedan diferenciarse y esta activación sea mediada a través de un receptor en *Toxoplasma* que sirva como sensor molecular que permita activar factores de transcripción en el parásito para que pueda pasar del estadio de taquizoíto a bradizoíto (Riaño, 2015).

4.0 Justificación

El IFN- γ es una citocina que coordina una serie de sistemas celulares a través de la regulación de la transcripción de genes inmunológicamente relevantes que están especialmente relacionados con el procesamiento y presentación de antígenos, respuesta antiviral, respuesta antiproliferativa y con el reconocimiento a patógenos. En *Toxoplasma*, esta citocina tiene el papel de inducir la cistogénesis o el enquistamiento tisular, como se ha reportado para las cepas de baja virulencia de los genotipos II y III y recientemente se observó que también induce la cistogénesis de taquizoítos de la cepa RH (tipo I) (Ospina Riaño, 2015).

No obstante, a pesar de que existen reportes sobre la participación del IFN- γ en la diferenciación de los parásitos a bradizoítos, aún no se han estudiado los mecanismos moleculares que intervienen en tal proceso y tampoco se sabe si el IFN- γ induce la cistogénesis al entrar en contacto con su receptor en la célula hospedera o si *Toxoplasma* posee una molécula con propiedad de unir IFN- γ y activar así factores de transcripción involucrados en el proceso de diferenciación de *T. gondii*.

Por lo anterior se considera de suma importancia elucidar los mecanismos y la molécula que sirve como receptor de IFN- γ en *T. gondii*, que conducen a la activación de los taquizoítos para su diferenciación a bradizoítos.

5.0 Hipótesis

El pretratamiento de taquizoítos la cepa RH de *Toxoplasma gondii* con IFN- γ induce el enquistamiento del parásito en células infectadas, por la probable unión del IFN- γ a una proteína de unión en la superficie del parásito.

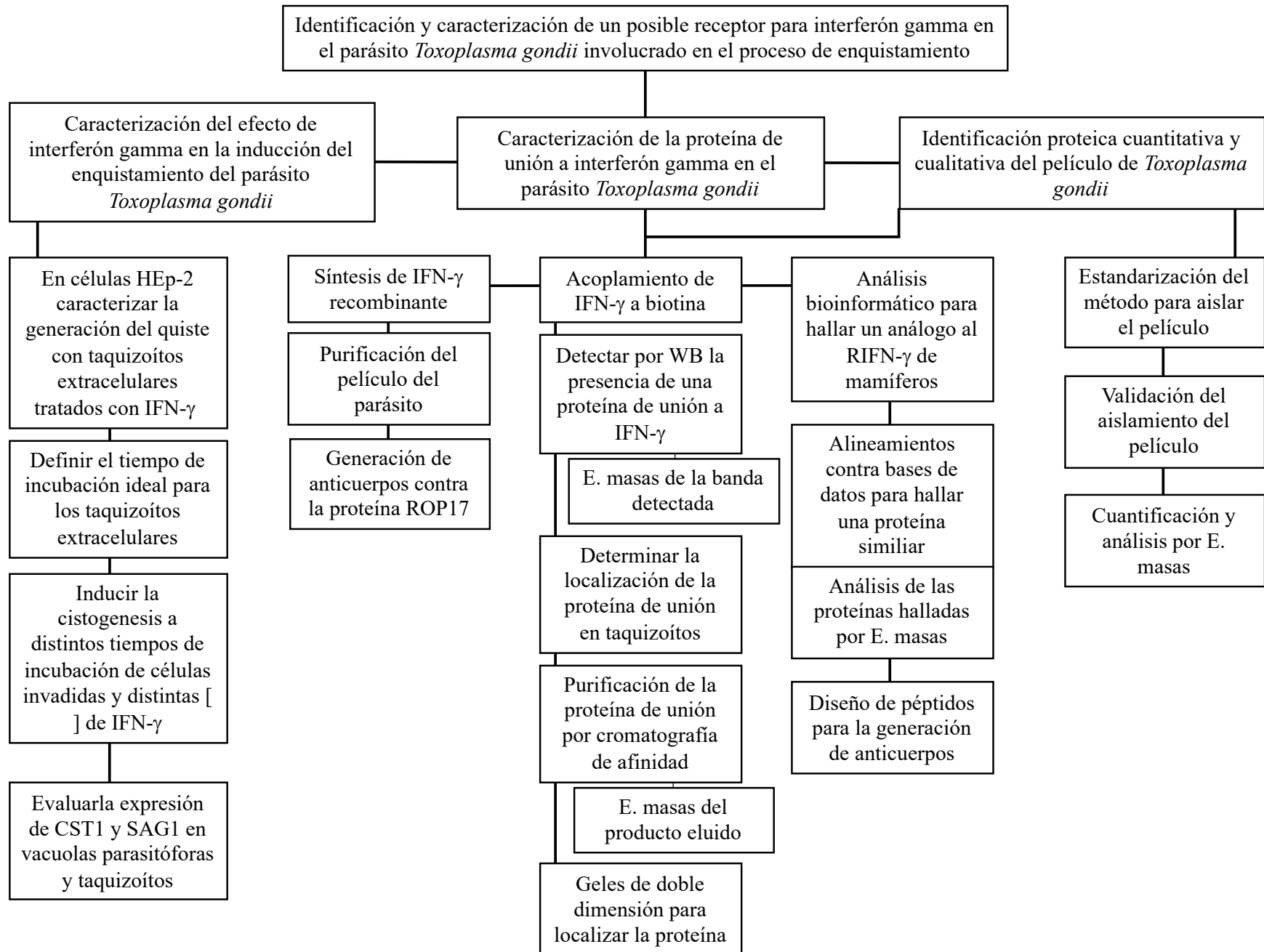
6.0 Objetivo general

Determinar el efecto de IFN- γ , en taquizoítos extracelulares de *T. gondii* como un inductor del proceso de cistogénesis, e identificar y caracterizar a una posible molécula receptora en el parásito involucrada en este proceso.

7.0 Objetivos específicos

1. Caracterizar el efecto de IFN- γ en taquizoítos para su diferenciación a bradizoítos y formación de quiste tisular.
2. Determinar el efecto de IFN- γ en taquizoítos extracelulares evaluando: extrusión del conoide, capacidad invasiva y de proliferación.
3. Buscar una proteína receptora o de unión a IFN- γ en *T. gondii* mediante métodos bioinformáticos y bioquímicos.
4. Purificar el receptor de *T. gondii* para IFN- γ (TgRIFN- γ) por cromatografía de afinidad.
5. Identificar el receptor por espectrometría de masas y análisis bioinformático de los resultados.
6. Localizar el RIFN- γ en taquizoítos de *T. gondii*.
8. Identificar la proteína de unión a IFN- γ en *Toxoplasma* utilizando los anticuerpos generados.
9. Analizar la proteómica de la fracción de película enriquecida.

8.0 Estrategia experimental



9.0 Materiales y métodos

9.1 Cultivo celular

Se mantuvo la línea celular HEp-2 (células epiteliales humanas de carcinoma de laringe) (HEp-2, ATCC-CCL 23), en medio mínimo esencial (MEM, GIBCO, Carlsbad, CA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 8 % más penicilina 20 U/ml y estreptomina 20 µg/ml e incubadas a 37° C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Las células se cultivaron mediante pases consecutivos en botellas de 25 cm² o en cajas de 3.3 cm de diámetro y en una campana de flujo laminar de bioseguridad clase II tipo A/B3 (Nuair Biological Safety Cabinets, Plymouth, MN, USA). Cuando las células alcanzaron el 100 % de confluencia se lavaron con 1 ml de verseno (EDTA al 0.5% en PBS) a pH 7.2, se tripsinizaron (Tripsina grado cultivo celular al 0.025 %) en presencia de EDTA por 1 min a 37 °C, y se re-sembraron en medio MEM. El cultivo celular se trabajó en una campana de flujo laminar de bioseguridad clase II tipo A/B3 (Nuair Biological Safety Cabinets, Plymouth, MN, USA).

9.2 Anticuerpos y Ligandos.

IFN-γ r humano recombinante (Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, Texas), IFN-γ humano recombinante (sintetizado con ayuda del Dr. Edgar Morales Ríos del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV), anticuerpo anti-IFN-γ (Sigma Aldrich, St. Louis), anticuerpo policlonal anti-Receptor 1 de IFN-γ de cabra (Sigma Aldrich, St. Louis), anticuerpo policlonal anti-ROP17 de ratón (producido en el laboratorio a partir de un péptido de ROP17 sintético), SAG1 (donado por la Dra. Dominique Soldati-Favre Departamento de Microbiología y Medicina Molecular, Facultad de Medicina-Universidad de Ginebra, Suiza), lectina DBA acoplada a FITC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), anticuerpos monoclonales anti-IMC1, anti-GAP45 (donados por la Dra. Dominique Soldati-Favre Departamento de Microbiología y Medicina Molecular, Facultad de Medicina-Universidad de Ginebra, Suiza). El RNA de células Mononucleares de Sangre Periférica fue donado por la Dra. Maria del Carmen Sanchez Torres y las células Jurkat fueron donadas por el Dr. Vianney Ortiz Navarrete

9.3 Cepa RH

Se utilizaron taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* que corresponde a taquizoítos de la población clonotípica I que es considerada de muy alta virulencia y con una letalidad del 100 % (LD100) al 5º día haber infectados a los ratones con un solo parásito (Mondragon, Howe, Dubey, & Sibley, 1998). Además, presenta una elevada motilidad *in vitro* y una rápida diseminación *in vivo*, por ello no forma quistes en ratones infectados.

9.4 Obtención y mantenimiento de *T. gondii* cepa RH

La cepa RH es de fácil mantenimiento en ratones ya que después de 3 a 4 días post-infección se obtienen hasta 200×10^6 de parásitos por ratón. Para el mantenimiento de los taquizoítos de la cepa de *T. gondii*, se inoculan vía intraperitoneal a ratones hembras de la cepa Balb/c con $1-5 \times 10^6$ taquizoítos en 100 μ l de PBS estéril. A los 3 días se sacrifican por dislocación cervical, se inoculan 5 ml de PBS pH 7.2 estéril en la cavidad peritoneal y se cosecha la suspensión peritoneal rica en taquizoítos. La suspensión se centrifuga a 700 g, durante 10 min, se elimina el sobrenadante y el botón celular se resuspende en 3 ml de PBS. Los taquizoítos son purificados a través de filtros de 5 μ m para eliminar los macrófagos del ratón. Se ajusta el número de taquizoítos a 1×10^7 / ml con PBS y se inoculan ratones sanos para continuar así el mantenimiento de la cepa. En la manipulación de taquizoítos se emplean las medidas de bioseguridad para el manejo de patógenos con nivel de bioseguridad tipo II, como son el uso de bata, guantes, cubrebocas, goggles, condiciones asépticas y uso de la campana de bioseguridad tipo II. El manejo de los animales se realiza de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 del cuidado y uso de los animales de laboratorio.

9.5 Infección de células con taquizoítos de *T. gondii*

Se siembran 40,000 células HEp-2 en cajas Petri de 3.3 cm de diámetro y se mantienen en medio MEM al 8 %; cuando se alcanza un 50 % de confluencia se infectan con taquizoítos en una relación 1:50 (célula-parásito) por 2 h. Posteriormente se lavan las células con MEM sin suero a fin de eliminar los parásitos extracelulares y se dejan crecer en medio de cultivo con suero y en incubadora de CO₂ a 37 °C a los tiempos deseados para cada experimento.

9.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se prepara una curva patrón con concentraciones de BSA desde 5 hasta 50 $\mu\text{g/ml}$ en PBS a partir de una solución stock de albumina de 1 mg/ml en PBS. De cada una de las concentraciones preparadas se colocan 10 μl en cada pocillo por triplicado en una placa de ELISA de 96 pozos transparente, se añade 200 μl de solución de Bradford (1 ml de solución de Bradford más 4 ml de agua bidestilada). Se registra la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca (MicroPlate Reader S80XR, BioRad). La curva de calibración se grafica y se obtiene la concentración proteica de la muestra y se ajusta a la cantidad de proteína necesaria. Para Western blot y SDS-PAGE se utilizaron 20 μg de proteína total por carril.

9.7 Preparación de extractos totales (ET) de taquizoítos

Para los extractos totales, se solubilizaron 200 x 10⁶ taquizoítos en amortiguador de lisis (Laemmli) (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, SDS al 4 %, glicerol al 20 % y azul de Bromofenol al 0.002 %, β -mercaptoetanol al 2 % y una mezcla de inhibidores de proteasas TPCK, TLCK y PMSF). Posteriormente, la muestra se sonicó a 40 Hz por 4 veces durante 15 seg (Procesador Ultrasónico GE 130PB Cole-Parmer, Vernon Hills, USA). Para electroforesis en condiciones reductoras la muestra se hirvió durante 5 min y para condiciones no reductoras, el buffer Laemmli no contenía el agente reductor, β -mercaptoetanol, y la muestra no fue hervida (Gavini & Parameshwaran, 2020).

9.8 Análisis de proteínas por SDS-PAGE

Para conocer los patrones electroforéticos de extractos proteicos, estos se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en mini-geles de 0.75 mm de grosor. El gel de poliacrilamida al 10 % que contenía las proteínas separadas se tiñó con azul de Coomassie R-250, con nitrato de plata o bien fue transferido a membrana de nitrocelulosa para su análisis mediante Western blot. Se digitalizaron los geles en un foto-documentador (EZ Imager, BioRad, Hercules, CA, USA), mediante el programa Image™ Lab Software Versión 4.1 (BioRad, Hercules, CA, USA). El mismo programa proporcionó los pesos moleculares aproximados de cada banda.

9.9 Tinción con azul de Coomassie

Los geles de poliacrilamida se lavaron por 5 min con agua destilada y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 13 % disuelto en la mezcla de metanol al 50 % y ácido acético al 10 % durante toda la noche a 4 °C en agitación. El gel se destiñe con una solución de metanol al 50 % más ácido acético al 10 % hasta observar las bandas.

9.10 Tinción con nitrato de plata

Para teñir los geles, se colocan en un recipiente de vidrio y se lavan con 50 ml de agua MQ por 10 min en agitación. Se coloca el gel en solución fijadora (metanol al 40% y 50 µL de formaldehído al 37 %) por 10 min en agitación. Después se lava dos veces con agua MQ por 5 min, se agrega una solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/ml) durante 1 min en agitación. Se lava dos veces con agua MQ durante 20 seg. Se adiciona una solución de nitrato de plata al 0.1 % y se incuba con agitación durante 10 min. Se adiciona la solución reveladora (carbonato de sodio al 3 %, tiosulfato de sodio al 0.0004 % y 50 µl de formaldehído al 37 %) en agitación hasta que aparezcan las bandas. La reacción se detiene adicionando ácido cítrico 2.3 M incubando con agitación durante 10 min, y por último se lava con agua MQ.

9.11 Western blot (Wb)

Para evaluar el reconocimiento de los diversos anticuerpos utilizados, las muestras de extracto total, película, citoesqueleto y sobrenadante del aislamiento de citoesqueleto se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % y SDS al 10 % a 80 V. El gel se colocó en buffer de transferencia pH 8.3 (Tris-OH 25 mM, glicina 0.19 M, metanol 4.95 M) por 5 min y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante 70 min a 200 mA. La membrana fue bloqueada con leche al 6 % durante 2 h, posteriormente se incubó con los anticuerpos de interés por 16 h a 4 °C. Se realizaron 5 lavados de 5 min con TBS más Tween al 0.1 % (TBST). La membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de chivo o ratón acoplado a HRP (dilución 1:7000) por 1 h a temperatura ambiente (TA), posteriormente, se realizaron lavados con TBST 5:5 y la membrana se reveló utilizando un kit de quimioluminiscencia ECL-Plus (GE Healthcare, UK).

9.12 Inmunofluorescencia

Con la finalidad de determinar la ubicación de la molécula de unión a IFN- γ en *Toxoplasma*, taquizoítos obtenidos del peritoneo del ratón se trataron con 500 U/ml de IFN- γ en PBS, durante 30 seg, 5 min, 10 min, 15 min y 30 min. Se utilizó esta concentración debido a que en reportes previos en nuestro laboratorio se demostró que era la que inducía el enquistamiento del parásito (Ospina Riaño, 2015). Los taquizoítos se lavaron con PBS y se fijaron con PAF 2 % por 30 min. En un segundo ensayo, los parásitos inmediatamente después de ser extraídos del peritoneo del ratón y purificados fueron fijados, y posteriormente se sometieron a interacción con el IFN- γ a 37 °C. Los parásitos provenientes de ambos ensayos, se bloquearon con PBS + SFB al 1 % durante 30 min y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti IFN- γ (1:50) (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, MO, EUA) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron 5 veces con PBS por 5 min y posteriormente se les colocó el anticuerpo secundario anti-cabra/FITC (Jackson Inmuno Research, USA). Una vez que se le realizaron nuevamente 5 lavados, los taquizoítos se montaron en cubreobjetos cubiertos con Poli-L-lisina 2 μ g/ml por 30 min. Todos los lavados e intercambio de soluciones se hicieron mediante la centrifugación de los parásitos a 700 x g.

Para la fluorescencia con el anticuerpo anti-ROP17, los taquizoítos extraídos del peritoneo del ratón, fueron fijados con PAF al 2 % y permeabilizados con tritón X-100 al 0.5 % por 3 min, posteriormente, se lavaron con PBS y se bloquearon con SFB al 1 % por 30 min. Terminado el tiempo de bloqueo, se incubaron con el anticuerpo anti-ROP17 1:25 a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se le realizaron lavados con PBS de 5 min y se colocó el anticuerpo secundario acoplado a FITC 1:100 durante 1 hora a TA, posteriormente se lavaron los parásitos y finalmente se añadió DAPI 1:1000 durante 20 min a TA, y se montaron en laminillas previamente cubiertas con Poli-L-lisina. Una vez eliminados los parásitos no adheridos, se adicionaron 7 μ l de Vectashield (Vector Laboratories, UK) y se colocó el cubreobjetos de vidrio. Las laminillas fueron observadas en el microscopio de fluorescencia ZEISS Axioscope 2 Mot Plus, y en el microscopio confocal LSM 700 ZEN 2009 ambos de Carl Zeiss Inc. (Gottingen, Germany).

9.13 Expresión de la glicoproteína CST1 inducida por la exposición de taquizoítos de *Toxoplasma* a IFN- γ y posterior invasión de células HEp-2

Con el fin de determinar la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos, así como la transformación de la célula invadida a un quiste tisular *in vitro*, se detectó la expresión de la glicoproteína CST1 mediante fluorescencia utilizando la lectina de *Dolichos biflorus* acoplada a FITC, la lectina tiene afinidad el carbohidrato de la pared del quiste N-acetilgalactosamina por lo que detecta fácilmente el enquistamiento del parásito (Boothroyd et al., 1997; Castro-Elizalde et al., 2018).

Los taquizoítos purificados se incubaron con IFN- γ a concentraciones de 50, 100, 200, 500 y 1000 U/ml en MEM sin suero o PBS, por 4 h a 37 °C o con 500 U/ml por distintos tiempos (30 min, 1, 2, 3 y 4 h). Terminada la incubación, los parásitos se lavaron con PBS para asegurar la eliminación de la citocina del medio. Posteriormente, cultivos de células HEp-2 crecidos a una confluencia del 60 %, se infectaron por 2 h con 1×10^6 taquizoítos pretratados con el IFN- γ , se eliminaron los parásitos no invasores y se dejó proliferar a los taquizoítos intracelulares durante 6, 12, 24, 48 y 72 h. Al final de cada tiempo, se fijaron las células con 4 % de paraformaldehído (PAF, Electron Microscopy Science, Washington, PA) por 30 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con tritón X-100 (Sigma, Aldrich, St. San Louis Missouri) al 0.5 % por 3 min. Después de lavarse con PBS, se bloqueó con SFB al 1 % por 30 min. A continuación, las células se incubaron con la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC (Vector, Burlingame CA, EE. UU., dil 1:200 en PBS) por 2 h a temperatura ambiente (TA) y se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI (Molecular Probes, Oregon, EE. UU.) por 20 min. Finalmente, se lavaron con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre laminillas usando Vectashield (Vector laboratorios, Inc. CA). Los cubreobjetos se sellaron con barniz y se observaron en el microscopio de fluorescencia y en el microscopio confocal (LSM700 Zeiss, Carl Zeiss, DEU). Se cuantificó el número de VPs que presentaban tinción positiva a CST1 en al menos 300 vacuolas por laminilla y el experimento se repitió en 3 ensayos independientes.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de VPs positivas a CST1, con respecto al tiempo y para cada concentración evaluada. Como control negativo, se expusieron células invadidas solo a MEM-SFB al 8% no-complementado sin utilizar IFN- γ por los tiempos

indicado. Los datos se procesaron para determinar la media +/- SD y se analizaron usando la prueba ANOVA de una vía y t-Student de datos no paramétricos.

9.14 Expresión de las proteínas SAG1 y CST1 durante la diferenciación de taquizoítos

Con la finalidad de dar seguimiento al proceso de enquistamiento de *Toxoplasma*. Los taquizoítos purificados se expusieron a 500 U/ml de IFN- γ por 4 h, se invadieron células HEp-2 con los parásitos incubados y se dejaron proliferar por 6, 12, 24, 48 y 72 h. La diferenciación del parásito se evaluó marcando a las moléculas SAG1 y CST1; SAG1, es una proteína específica de taquizoítos (Jung et al., 2004), mientras que CST1 se expresa en la pared de los quistes conteniendo bradizoítos (Tomita et al., 2013). Después del periodo de incubación las células se procesaron para inmunofluorescencia siguiendo el protocolo arriba mencionado y utilizando un anticuerpo anti-SAG1 de ratón (dilución 1:100). Para evidenciar la marca de SAG1 se usó un anticuerpo de conejo anti- IgG de ratón acoplado a TRITC (dilución 1:200) (Zymed, San Francisco, CA, EE. UU.). Para realizar una co-localización con la glicoproteína CST1, las células se lavaron con PBS y se incubaron con lectina de *D. Biflorus* acoplada a FITC (dilución 1:200 en PBS) por 2 h a TA. Una vez lavados, se incubaron con DAPI (Molecular Probes) por 20 min. Como controles negativos las células invadidas se colocaron en MEM + 8 % de SFB durante los tiempos ya especificados (sin IFN- γ). Los resultados se analizaron en el microscopio de fluorescencia y en el microscopio confocal.

9.15 Aislamiento del películo de *Toxoplasma gondii*

Con la finalidad de identificar la proteína de unión a *Toxoplasma* (TgRIFN- γ), se siguió la metodología de acuerdo a Foussard et al., (1990) para el aislamiento del películo del parásito. Para ello se sacrificaron de 5 ratones y se obtuvieron 10×10^9 taquizoítos que fueron previamente lavados con PBS pH 7.2 y aislados. Estos parásitos se centrifugaron a 700 x g por 10 min a TA. Posteriormente los parásitos se resuspendieron en 2 ml de PBS y se sonicaron por 40 segundos al 10 % de la potencia máxima del aparato (Procesador Ultrasónico GE 130PB Cole-Parmer, Vernon Hills, USA). Posterior a esto la muestra se centrifugó a 600 x g por 3 min a 4° C y se recuperó el sobrenadante. Este se centrifugó a 30,000 x g en la ultracentrífuga Beckman usando el rotor 50 Ti, por 30 min, se recuperó el sobrenadante y se

precipitó con isopropanol a una proporción 1:1. Se recuperó el botón y se resuspendió en una solución que contenía sacarosa 1.6 M, EDTA 1 mM y trietanolamina 5 mM pH 7.5. La suspensión se colocó en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa con las siguientes proporciones: 5 ml 1.6 M, 6 ml 1.4 M, 6 ml 1 M, 4 ml 0.25 M. Todas las soluciones de sacarosa contenían EDTA 1 mM y trietanolamina 5 mM y el gradiente se centrifugó a 113,000 x g por 1 h a 4° C en el rotor SW 41Ti. Posterior a esto se recolectaron las fracciones del gradiente que iban de 0.25 M a 1 M. La muestra recolectada se resuspendió en 3 volúmenes de buffer de homogenización que contenía 250 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA y 5 mM de trietanolamina. Esta suspensión se centrifugó a 12,000 x g por 40 min en el rotor 50 Ti y el botón obtenido se utilizó para los distintos fines requeridos.

9.16 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para evaluar el aislamiento del películo del parásito, la muestra de interés se fijó con glutaraldehído 2.5% durante 1 h a TA. Después de lavarse con PBS, se fijó por segunda vez con tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en PBS por 1 h en agitación. Posterior a esto, los taquizoítos se deshidrataron con etanol a concentraciones crecientes del 50 al 100 % por 10 min en cada concentración a TA y en agitación. Posteriormente, las muestras se infiltraron gradualmente en una mezcla de resina Spurr (EMS, Hatfield PA) – etanol absoluto (1:1, 3:1 y posteriormente en resina al 100% tres veces). Una vez infiltradas, las muestras se colocaron en moldes y se polimerizaron a 60° C por 36 h. De los bloques obtenidos se realizaron cortes finos en el ultramicrotomo (Reichert Jung, Austria), se colectaron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo saturados.

Se observaron en el microscopio de transmisión (JEM 1400, JEOL LTD, Japan).

9.17 Acoplamiento de IFN- γ a biotina

Con la finalidad de mejorar el etiquetado de la proteína que se une a IFN- γ y que se encuentra en el películo del parásito, se acopló el IFN- γ a biotina para usarlo como marcador. Para el etiquetado de proteínas con biotina se usó el Biotin Protein Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse, Germany). Se disolvieron 100 μ g de IFN- γ en 100 μ l de PBS y se colocaron 105 μ g de biotina disuelta en DMSO. La mezcla de reacción se incubó por 2 h a TA en agitación suave. A la mezcla de reacción de 100 μ l se le agregaron 900 μ l más de PBS

para tener un volumen final de 1 ml. La reacción se colocó en la columna de Sefadex G25 previamente lavada y bloqueada. Se dejó fluir y luego se le agregaron 2.5 ml más de PBS, se recolectaron fracciones de 500 µl aproximadamente, luego se agregaron 3.5 ml más de PBS y se volvieron a recolectar fracciones del mismo volumen, siendo las primeras 3 fracciones las que contenían el IFN- γ acoplado a biotina. Las fracciones recolectadas y cuantificadas se validaron por Wb para determinar la unión de biotina a IFN- γ así como el título a utilizarse de avidina- HRP.

9.18 Interacción de IFN- γ con una molécula en *Toxoplasma* por Far Western blot

Para determinar si existe una interacción entre el IFN- γ y una proteína en *Toxoplasma*, realizamos un ensayo de Far Wb sin la utilización de anticuerpos. La fracción enriquecida de películo aislado de taquizoítos junto con el sobrenadante y el extracto total se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10 %, se realizó la electrotransferencia y la membrana se bloqueó con leche descremada al 6 % por 2 h a TA. Posteriormente se incubó con 500 ng/ml de IFN- γ -biotina por 16 h a 4° C, luego se le realizaron 3 lavados con TBST de 5 min cada uno y se colocó la avidina / HRP (Dilución 1:30,000) en TBST dejando incubar 1 h a TA. Después se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con TBST y la membrana se reveló utilizando un kit de quimioluminiscencia ECL-Plus (GE Healthcare, UK).

9.19 Interacción de IFN- γ -biotina con *Toxoplasma* por fluorescencia

Con el fin de marcar la proteína del películo del parásito que se une a *Toxoplasma*, se realizaron ensayos con IFN- γ -biotina. Se fijaron taquizoítos con PAF al 4% por 30 min a TA, posteriormente se les colocó IFN- γ -biotina y se dejó incubar durante toda la noche a 4° C en agitación, al día siguiente se les realizaron lavados mediante centrifugación y se les colocó avidina-FITC (dilución 1:1,000) durante 1 h en agitación a TA, después se realizaron lavados mediante centrifugación y los taquizoítos se montaron en cubreobjetos cubiertos con Poli-L-lisina 2 µg / ml por 30 min. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con agua y se montaron en portaobjetos con 7 µl de Vectashield (Vector Laboratories, UK). Las laminillas se observaron en el microscopio de fluorescencia y en el microscopio confocal.

9.20 Purificación del RIFN- γ mediante cromatografía de afinidad

Con la finalidad de aislar la proteína de unión a IFN- γ en *Toxoplasma*., se preparó una columna de afinidad acoplada a IFN- γ . A 1 g de sefarosa 4 B activada con bromuro de cianógeno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), se le agregó 3.5 ml de amortiguador de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.35). La sefarosa hidratada se centrifugó a 330 x g por 5 min y se lavó con HCl 1 mM frío por 30 min, posteriormente se lavó con agua destilada y amortiguador de acoplamiento. En un tubo de 15 ml conteniendo a la sefarosa se le adicionó el IFN- γ (10 mg) y se dejó en agitación suave toda la noche a 4 ° C para llevar a cabo el acoplamiento. La sefarosa-IFN- γ se lavó con PBS y amortiguador de acoplamiento y se cuantificó la proteína del sobrenadante para determinar la eficiencia de unión. Posteriormente se bloquearon los sitios que quedaron activos en la sefarosa colocando glicina 0.1 M en amortiguador de carbonatos pH 9.5 y se dejó en agitación toda la noche a 4 ° C. Al día siguiente se lavó exhaustivamente primero con el amortiguador de acoplamiento y después con PBS. La columna se lavó con PBS. Para la purificación del RIFN- γ de *Toxoplasma* se realizó un extracto total (ET) de taquizoítos en amortiguador de lisis (amortiguador de fosfatos 0.1 M, tritón 0.5 %, Np 40 0.5 %, NaCl 150 mM), la muestra se sonicó cuatro veces a 40 Hz por 30 seg en hielo, y se centrifugó a 16,000 x g a 4 ° C por 15 min y se tomó el sobrenadante. La proteína solubilizada y cuantificada, se agregó a la columna de afinidad y el sobrenadante se recuperó, repitiendo el ciclo 5 veces más. Se detuvo el flujo y se dejó en agitación toda la noche a 4 ° C para llevar a cabo la unión receptor-IFN- γ . Al día siguiente se realizó la elución del receptor, para ello inicialmente se lavó la columna con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm fuera de 0. La elución del receptor se llevó a cabo por la adición secuencial de amortiguadores Pre-46 strip (glicina 50 mM pH 9.3) y Alk-strip (dietilamina 50 mM pH 11.5). Las fracciones colectadas se llevaron a pH 8.3 con una solución de Tris-HCl 1 M, se evaluó el contenido proteico de las fracciones colectadas mediante absorbancia a 280 nm. Al término de la elución de la columna, esta se llevó a pH 7.2 lavando con dos volúmenes de amortiguador de columna, dos volúmenes de agua bidestilada y varios volúmenes de PBS pH 7.2. Las fracciones que contenían la proteína se colectaron de acuerdo con el perfil de elución y se dializaron con PBS por 24 h a 4° C. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE.

9.21 Espectrometría de masas

Con la finalidad de conocer la identidad de la proteína aislada y la composición proteómica del película de *Toxoplasma*. A partir del patrón electroforético del gel de poliacrilamida, se cortaron las bandas y se destiñeron con una solución decolorante (metanol-ácido acético 50:10). La banda que contenía todas las proteínas, fue digerida enzimáticamente de acuerdo con el protocolo de Shevchenko *et al* (Shevchenko, Tomas, Havlis, Olsen, & Mann, 2006). Los péptidos concentrados fueron cargados en una columna de exclusión C18 (Waters, Milford, MA) de 180 μm x 20 mm, con tamaño de poro 100 angstroms, 5 μm de tamaño de partícula y desalado usando 0.1 % de ácido fórmico en agua y 0.1 % de ácido fórmico en acetonitrilo. Después, los péptidos fueron cargados y separados en una columna HSS T3 C18 (Waters) de 75 μm x 150 μm , 100 angstroms, 1.8 μm de tamaño de partícula usando un UPLC ACQUITY M-Class (Waters) con un gradiente en incremento de las fases antes mencionadas. Los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro de masas (E. masas) con electrospray como fuente de ionización (ESI) y movilidad iónica (IMS) Synapt G2-Si (Waters), usando la configuración de Data Independent Acquisition (DIA) mediante el modo HDMSE (Waters). Los archivos tipo raw conteniendo los espectros MS y MS/MS fueron deconvolucionados y comparados usando el software ProteinLinx Global Server (PLGS) v.0.3 (Waters) en contra de la base de datos de *Toxoplasma gondii* (descargada de ToxoDB). Los parámetros incluyeron a tripsina como enzima de corte, carbamidometilación (C), amidación (N-terminal), deamidación (N, Q), oxidación (M) y fosforilación (S, T, Y) como modificaciones variables. Todas las identificaciones tuvieron un porcentaje de confianza superior al 95 % (Protein AutoCurate Green). El Synapt G2-Si fue calibrado con [Glu1]-Fibrinopeptido, $[M+2H]^2 = 785.84261$ a 1.5 ppm.

Para la cuantificación de las proteínas identificadas, se usó como estándar para todas las muestras, una alícuota de 25 fmol μl^{-1} de alcohol deshidrogenasa 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt: P00330). Con la finalidad de analizar la muestra, se cuantificó el área bajo la curva de los espectros obtenidos por el UPLC ACQUITY M-CLass en el modo MSE. Todas las demás condiciones cromatográficas y espectrométricas fueron idénticas a las antes mencionadas.

9.22 Inducción de la extrusión del conoide

Con el fin de observar si el IFN- γ induce la extrusión del conoide en los taquizoítos *in vitro*, se incubaron 5×10^5 taquizoítos purificados con IFN- γ 500 U/ml, por diferentes intervalos de tiempo (15, 30, 45, 60 seg y 2, 3, 4, 5 min). Inmediatamente después del tiempo transcurrido los parásitos se fijaron con glutaraldehído (Polysciences, Warrington, PA) al 1.25 % en PBS por 30 min. Los parásitos se lavaron con PBS por centrifugación a $700 \times g$ por 10 min para quitar el fijador y luego se lavaron con agua para posteriormente montar las muestras sobre cubreobjetos con 10 μ l de glicerol al 50 % en PBS y ser analizadas en el microscopio de contraste de fases Axioscope II Mot. Se cuantificó el número de taquizoítos con el conoide extruido de una población de al menos 300 parásitos con al menos 3 repeticiones en experimentos independientes; se utilizó etanol 0.5 M como control positivo de inducción de la extrusión del conoide para realizar la comparación (Del Carmen, Mondragon, Gonzalez, & Mondragon, 2009)

9.23 Ensayos de invasión

Con la finalidad de determinar si el IFN- γ tenía efectos en la invasión del parásito. Se cultivaron células HEp-2 en cubreobjetos estériles de vidrio colocados en cajas Petri de 3.3 cm incubadas en condiciones de 5 % de CO₂ a 37 °C y en medio MEM al 8 % de suero fetal bovino. Las células HEp-2 a una confluencia del 60 % se infectaron con taquizoítos preincubados con IFN- γ 500 U/ml, en una proporción 1:20 (20 taquizoítos por célula). Después de 2 h de la invasión, las células se fijaron con glutaraldehído al 1.5 % por 30 min. Los cubre objetos se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos con 7 μ l de glicerol al 50 %. Se cuantificaron al menos 300 células para determinar qué porcentaje de estas se encontraba invadida, esto mediante la observación del número de VPs por célula contada. Por otro lado, se recolectaron y se determinó el porcentaje de parásitos que no invadieron.

9.24 Ensayos de proliferación

Con la finalidad de determinar si el IFN- γ tenía efectos en la proliferación de *Toxoplasma*. Las células HEp-2 se cultivaron en cubreobjetos estériles de vidrio colocados en cajas Petri de 3.3 cm, se incubaron en condiciones de 5 % de CO₂ a 37 °C y en medio MEM al 8 % de suero fetal bovino. Las células HEp-2 a una confluencia del 60 % se infectaron con

taquizoítos preincubados por 4 h con IFN- γ 500 U/ml, en una proporción 1:20 (20 taquizoítos por célula). Se dejaron infectar las células por 2 h y posteriormente se realizaron lavados para eliminar a los parásitos que no infectaron, se les colocó medio MEM + SFB y se dejaron proliferar por 72 h. Una vez concluido el tiempo de incubación, las células se lisaron mediante su pasaje a través de agujas de diferentes calibres para liberar y cuantificar a los parásitos. El 100 % representado en las gráficas corresponde al total de parásitos hallados en los controles sin IFN- γ , los datos se analizaron con la prueba estadística t-Student para datos no paramétricos.

9.25 Síntesis de IFN- γ recombinante

Con la finalidad de tener IFN- γ en grandes cantidades para la realización de los experimentos, se clonó la citocina. Para la generación de una cromatografía de afinidad se necesitaron grandes cantidades de IFN- γ , por lo que se decidió clonar y sintetizar esta citocina. Se diseñaron se diseñaron los siguientes *primers* a partir del gen para IFN- γ en humanos (J00219.1 Homo sapiens interferón-gamma (IFNG) gene):

F. GTGGATCCCAGGACCCATATGTA

R. CAAGCTTTCACCTGGGATGCTCTTCG

Y para amplificar el plásmido pRSET se utilizaron los siguientes *primers*:

F. CATCCCAGTGAAAGCTTGATCCGGCTG

R. GGGTCCTGGGATCCACCCTGGAAG

Se diseñaron 4 primers para amplificar la secuencia del gen y del plásmido pRSET. Con los primers sintetizados se montaron reacciones de PCR usando la enzima Phusion High-Fidelity en un gradiente de temperatura de 50 a 70 °C (Termociclador T-100), una vez determinada la temperatura óptima se corrieron nuevamente reacciones de PCR con la temperatura de mayor cantidad de producto de PCR para tener mayor cantidad de muestra para la clonación. Ya sintetizado el ADN del gen para IFN- γ , se sintetizó el ADN del plásmido a usar y con la finalidad de digerir el plásmido molde que se utilizó para la síntesis, se usó la enzima DpnI en 5 μ L de buffer de reacción 10X (Custmart + buffer Biolabs), esto se hizo a 37 °C por 1 h y posterior a esto se colocó a 80 °C por 20 min para desnaturalizar la enzima. Después se cuantificó el ADN tanto del plásmido digerido como del gen amplificado. Se realizó la transformación bacteriana y la clonación libre de ligación usando 50 μ l de

células de *E. coli* químicamente competentes de One Shot® TOP10 súper competentes y en una relación plásmido: gen 1:1, 1:2, 1:5, 1:10. Colocada la relación del plásmido: gen, se incubaron las células de *E. coli* por 30 min a 4 °C y posteriormente se colocó a 42 °C por 35 seg e inmediatamente se incubó a 4 °C por 2 min. Después de transcurrido el tiempo se le agregaron 400 ml de medio LB y se dejó incubando por 1 h a 37 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 14,000 x g por 3 min y el pellet se colocó en una caja de cultivo con medio LB y ampicilina como medio de selección y se dejó incubando toda la noche a 37 °C. Al siguiente día se seleccionaron y picaron algunas colonias de cada caja en la que hubo crecimiento y se colocó cada colonia recolectada en 3 mL de medio LB más 3 µl de ampicilina 100 mg/ml y se dejó incubando toda la noche a 37 °C en agitación. Al siguiente día se realizó la extracción del ADN plasmídico de las bacterias cultivadas y se realizaron las PCR de colonias para verificar la presencia del gen insertado de la proteína de nuestro interés. Utilizando el constructo de ADN de la proteína y del plásmido se realizó nuevamente la transformación bacteriana bajo las mismas condiciones, pero esta vez utilizando las células SOLUBL21 especializadas para la síntesis de proteínas. Se seleccionaron algunas colonias que tuvieron crecimiento para realizar ensayos de perfiles de expresión a distintos tiempos y temperaturas de incubación para determinar bajo qué condiciones se expresa IFN- γ utilizando IPTG 1 mM como estímulo para la expresión de la proteína. Una vez analizado el tiempo y la temperatura óptima, se realizaron macro cultivos para la obtención de la proteína. De las colonias crecidas, se seleccionaron algunas y se colocaron en 10 ml de medio LB + 10 µl de ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente se colocaron los 10 ml del cultivo en 500 ml de medio 2XYT + 500 µL de ampicilina y se dejó crecer el cultivo a 37 °C en agitación hasta que se alcanzó una absorbancia no menor a 0.6 UAbs, posterior a esto se adicionaron otros 500 ml de medio 2XYT, 1 ml de IPTG 1M, 500 µL de ampicilina 100 mg/ml y 1 mL de MgSO₄ y se dejó incubando en las condiciones ya determinadas. Trascurrido el tiempo, las células se centrifugaron a 4,500 rpm en un rotor ID81000 por 30 min a 4 °C y el pellet se guardó a -70 °C por no menos de 1 h. Posteriormente las células se descongelaron en hielo y posteriormente se lisaron por sonicación para después ultracentrifugarlas a 287,000 x g por 30 min a 4 °C en rotor 70 Ti. El sobrenadante se recolectó y se filtró en un filtro de 0.2 µm. Pasado esto se purificó por FPLC con un gradiente de imidazol. La proteína con la cola de histidinas se llevó a un volumen aproximado de 25

ml de buffer TEV y se le colocaron de 300 a 500 μ L de la enzima TEV, se dejó incubar toda la noche a 4 °C posteriormente se purificó la proteína cortada mediante FPLC y ésta se concentró a un volumen de 500 μ L finalmente se purificó, mediante por una columna de exclusión molecular Superdex200 Increase (10/300 mm; GE Healthcare) y se llevó a la concentración deseada.

9.26 Análisis bioinformáticos

Para los análisis bioinformáticos se utilizaron diversas bases de datos.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> a partir de esta base de datos se realizaron los análisis bioinformáticos; alineamientos de R1IFN- γ (GenBank: AAH05333. 1) y R2IFN- γ (GenBank: AAH03624.1) con el genoma de *Toxoplasma* (taxid:5810) y alineamientos con el receptor soluble de IFN- γ del virus *Vaccinia* (GenBank: AAD22050.1) y *Myxoma* (GenBank: AYW61140.1). Con la herramienta <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> se realizaron los alineamientos de secuencias múltiples, realizando comparaciones entre los receptores hallados. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> I-TASSER se usó como herramienta de predicción de la estructura terciaria de la proteína ROP17 al igual que los programas Phyre² <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>, Raptor X <http://raptorx.uchicago.edu/> y SWISS-MODEL <https://swissmodel.expasy.org/>. Para el análisis de la secuencia terciaria con los mejores parámetros de acuerdo a las gráficas de Ramachandan se usó <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>.

Para la selección de un péptido que fuera inmunogénico y generar anticuerpos dirigidos contra la proteína ROP17, se usó la página de IEDB Analysis Resource <http://tools.iedb.org/bcell/>, seleccionamos los mejores paramatroa y elejimos un peptido que se mandó a sintetizar a la empresa Gen Script, USA. Para realizar los ensayos de Docking molecular se utilizó la estructura cristalizada del IFN- γ tomada de la base de datos de Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/>.

Y para realizar el Docking molecular entre la proteína ROP17 (modelo de I-TASSER) y el IFN- γ (1HIG) se usó el programa; <http://zdock.umassmed.edu/>. También se usaron plataformas como <https://toxodb.org/toxo/> y <https://www.uniprot.org/> para la búsqueda de proteínas y análisis por espectrometría de masas (E. masas), y el programa

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> para la búsqueda de dominios transmembranales de las proteínas halladas por E. masas.

9.27 Producción de anticuerpos contra ROP17

Con la finalidad de determinar si la molécula de unión a IFN- γ es ROP17. Se obtuvieron anticuerpos anti-ROP17 en nuestro laboratorio de la siguiente manera: en el día 1 se sangró al ratón para obtener el suero preinmune. Después, se resuspendieron 5 μ g del péptido sintetizado en 100 μ l de PBS y luego se colocaron 100 μ l mas de adyuvante Titermax (Sigma, Aldrich, St. Louis, Missouri) y la solución se inoculó vía i.p. en ratones BALB/c. 8 y 15 días más tarde se realizó una segunda y tercera inoculación del péptido disuelto únicamente en PBS por vía i. p. Una cuarta inoculación se hizo en la cola por vía intravenosa usando 5 μ g de proteína en 100 μ l de PBS. Los ratones se sangraron al tercer día y posteriormente se sacrificaron; se colectó el suero, se clarificó y se tituló. Tanto la inmunización como el sangrado se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) previamente mencionada.

10.0 Resultados

10.1 La exposición de taquizoítos extracelulares a IFN- γ induce la cistogénesis en células invadidas

En un reporte previo de nuestro laboratorio (Ospina Riaño, tesis de maestría, 2015), se logró inducir la diferenciación de taquizoítos de *Toxoplasma* de la cepa RH mediante la exposición prolongada y continua de células infectadas con taquizoítos a IFN- γ , observándose desde las 72 h la expresión de la glicoproteína CST1, esta es una molécula secretada por los bradizoítos y se encuentra enriquecida en la pared del quiste. Además mediante la cuantificación del porcentaje de VPs positivas a CST1, se determinó que entre las concentraciones de 200 y 1000 U/ml de IFN- γ se obtenía la mayor expresión de la glicoproteína con formación de quiste tisular *in vitro*. Con estos resultados, existía la interrogante acerca del mecanismo por el cual el IFN- γ inducía la cistogénesis, ya sea: a) que se indujera la diferenciación a través de mecanismos que estuvieran directamente relacionados con la unión del IFN- γ a un receptor en la membrana de la célula hospedero infectada o b) el IFN- γ , actuara de manera directa sobre el parásito mediante su unión a alguna molécula de superficie generando su activación para llevar a cabo el proceso de diferenciación a bradizoíto y transformación de la célula infectada en un quiste tisular.

Con base en lo anterior, en un primer objetivo se determinó si la exposición de taquizoítos extracelulares a IFN- γ durante tiempos determinados, seguido de un lavado exhaustivo con solución salina y posterior invasión de células blanco, era capaz de inducir la diferenciación de *Toxoplasma* con expresión de CST1 y formación de un quiste tisular. Para ello, se determinó la presencia de CST1 mediante fluorescencia utilizando la lectina de *D. biflorus*. En un ensayo preliminar, se hizo la preincubación de taquizoítos con 500 U/ml de IFN- γ durante 30 min, 1, 2, 3 y 4 h (Figura 15). Se observó, que de acuerdo al tiempo de exposición de los parásitos al IFN- γ , el porcentaje de VPs positivas a CST1, aumentó progresivamente evaluado después de 72 h de proliferación (Figura 15B), observando estructuras esferoidales a las que llamamos “estructuras prequísticas” (Fig. 15A). Únicamente se probó la exposición a IFN- γ , hasta las 4 h ya que *Toxoplasma* al ser un patógeno intracelular obligado no tiene la capacidad de sobrevivir en una ubicación extracelular por tiempos mayores a las 6 h. Como control se utilizaron parásitos sin tratamiento con IFN- γ tratados bajo las mismas condiciones.

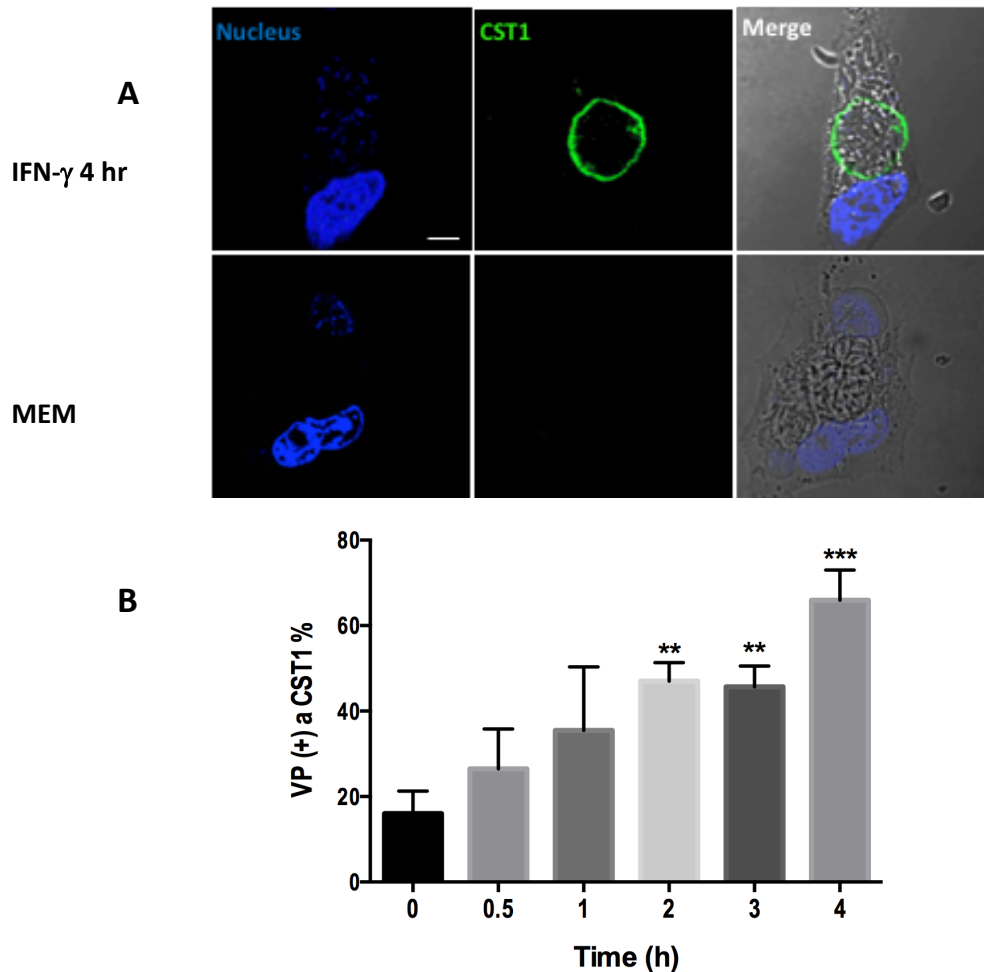


Figura 15. Determinación de la expresión de la glicoproteína CST1, después de la preincubación de los taquizoítos con IFN- γ . A) Imagen de fluorescencia por microscopía confocal de parásitos pretratados con IFN- γ 500 U/ml por 4 h, se observa la modificación de la VP en una estructura prequistica que se evidencia por la marca de la glicoproteína CST1. B) Determinación del porcentaje de VPs positivas a CST1, después de la preincubación de taquizoítos de *T. gondii* a los distintos tiempos con 500 U/ml de IFN- γ . El ensayo se valoró a las 72 h de proliferación de los taquizoítos: Núcleo= DAPI, CST1= Lectina-FITC, Merge= Contraste diferencial interferencial (DIC) + fluorescencia. La prueba estadística usada fue Anova de una vía, $P = 0.0002$, $n=3$; Escala = 5 μ m

10.2 Progresión de la diferenciación de los parásitos inducida por exposición a IFN- γ

Con el fin de determinar la concentración óptima de IFN- γ en la inducción del proceso de diferenciación y cistogénesis de los taquizoítos, se utilizaron diversas concentraciones dentro del rango fisiológico de una respuesta inmune (Chardes et al., 1993). Para ello, los taquizoítos se preincubaron con IFN- γ en un rango de concentración de 50 a 1000 U/ml por 2 h. Los parásitos se dejaron proliferar a distintos tiempos (6, 12, 24, 48 y 72 h) a fin de determinar el inicio de la expresión de CST1 y por consiguiente la diferenciación de los taquizoítos con formación de estructuras prequísticas

Las figuras correspondientes (Figuras 16-19) incluyen micrografías de microscopía confocal que representan las diferentes etapas en la formación de un quiste tisular en donde CST1 está marcada en verde y el núcleo de las células hospedero, con DAPI. Como se puede observar en la Figura 16 correspondiente a 6 h de proliferación, se detecta la expresión de CST1 aunque de forma muy limitada y en forma de agregados finos (Fig. 19). A las 12 h de proliferación, la expresión de CST1 se detectó en forma de un parche en el extremo posterior del parásito y en la membrana de la VP (Fig. 17A cabeza de flecha), mientras que a las 24 h de proliferación, la marca de CST1 se detectó rodeando al parásito muy probablemente por estar decorando la membrana de la VP; también se detectó en el cuerpo residual que está ubicado en el centro de las rosetas de proliferación al interior de la VP y también en el extremo apical de los parásito proliferantes (Fig. 17B). A las 48 h ya se observa la marca de CST1 delimitando la membrana de las VP y formando estructuras esféricas, algo de marca se siguió detectando en el cuerpo residual de los parásitos en roseta (Fig. 18A). Por contraste de fases, se puede determinar que al interior de las estructuras esféricas se encuentran ubicados los parásitos distribuidos en forma compacta sin un arreglo determinado. A las 72 h, las estructuras esféricas presentaron una mayor intensidad en la marca de CST1, encontrándose una proliferación de los parásitos aparentemente disminuida ya que todavía era posible contar el número de parásitos al interior de las VPs, (Fig. 18B). A las 72 h de proliferación en parásitos expuestos a 1000 U/ml de IFN- γ , la mayoría de las estructuras esféricas estaban marcadas con CST1. La figura 19, muestra las frecuencias de estructuras esféricas que fueron positivas al marcaje para CST1 después de la exposición a diferentes concentraciones de IFN- γ y de acuerdo al tiempo de proliferación del parásito. Como se

puede ver, a medida que aumentaba el tiempo de proliferación, el número de VPs positivas a CST1, fue incrementando independientemente de la concentración de IFN- γ utilizada.

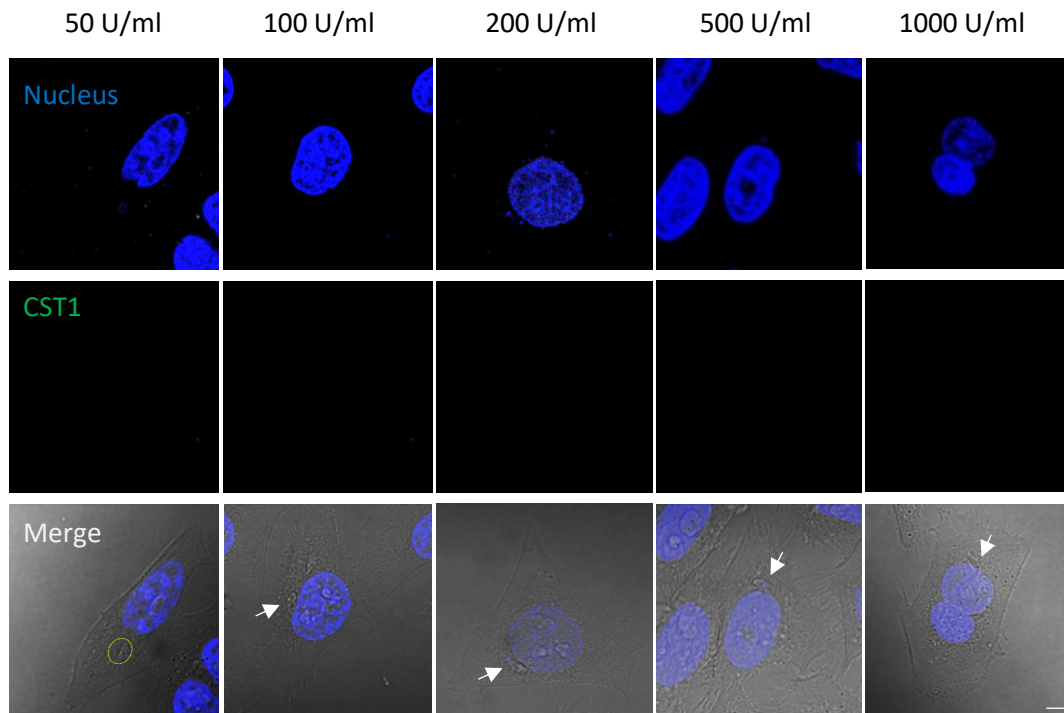


Figura 16. Expresión de CST1 a las 6 h, en VP de taquizoítos expuestos a 500 U/ml de IFN- γ . A las 6 h la expresión de la glicoproteína se observó de forma limitada, en la imagen de fluorescencia se observa el panorama general de lo hallado en la monocapa invadida; en la imagen se logra ver que los parásitos se encuentran en la periferia del núcleo (flechas) y en el caso del IFN- γ 50 U/ml ya se alcanza a observar la replicación de estos (puntilleo). Núcleo= DAPI, CST1= Lectina-FITC, Merge= Contraste diferencial interferencial (DIC) + fluorescencia. Escala = 5 μ m.

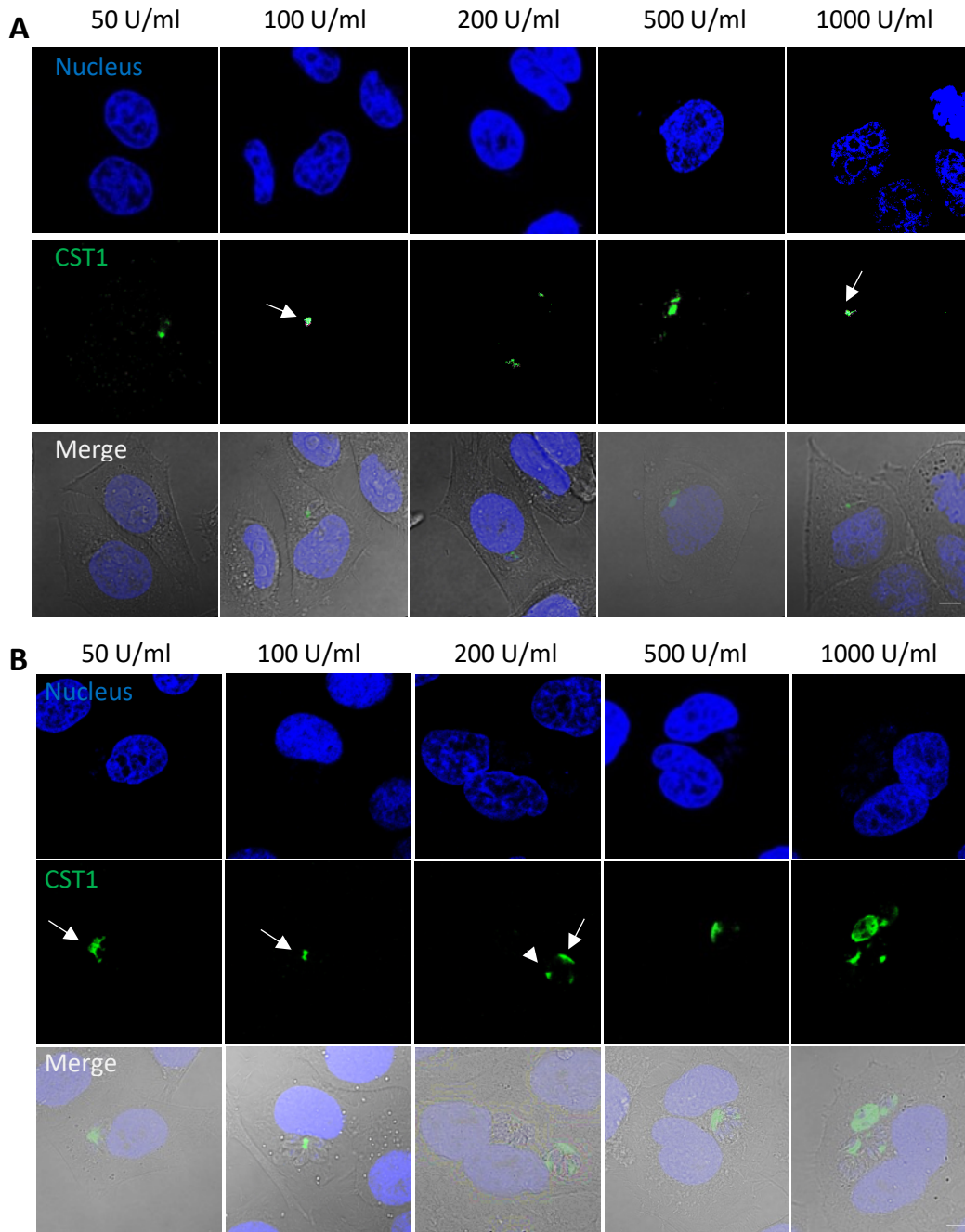


Figura 17. Expresión de CST1 a las 12 (A) y 24 (B) h, en VP de taquizoítos expuestos a 500 U/ml de IFN- γ . Se muestra como la marca comienza a ser más evidente durante las 12 h apareciendo en su mayoría en el cuerpo residual de las VP (flechas) y a las 24 h se observa cómo la proteína migra hacia la periferia de la VP (Cabezas de flecha), en algunas ocasiones como en el caso de las 1000 U/ml se observan estructuras redondeadas (18B 100U/ml).

Núcleo= DAPI, CST1= Lectina-FITC, Merge= Contraste de interferencia diferencial (DIC) + fluorescencia. Escala = 5 μ m

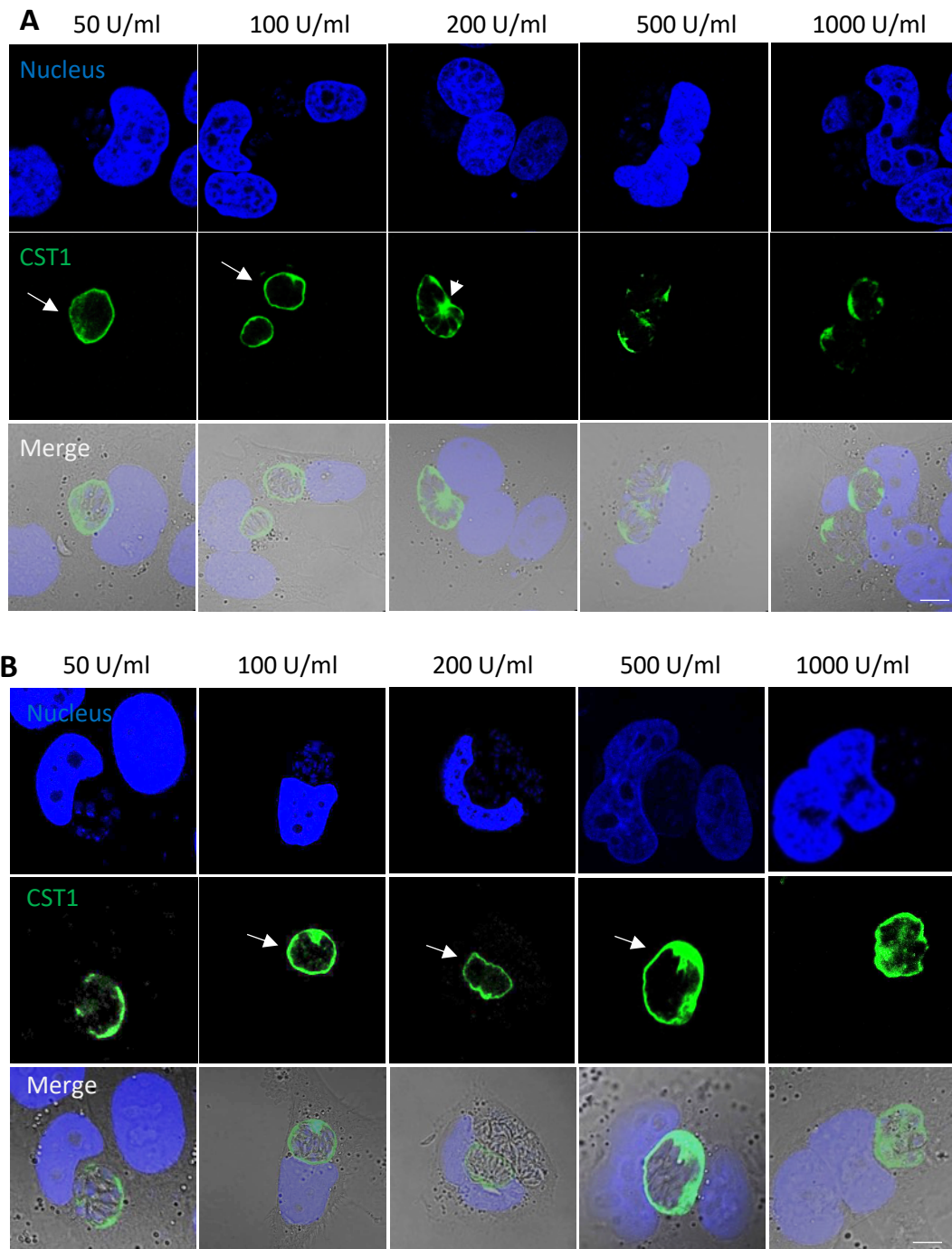


Figura 18. Expresión de CST1 a las 48 (A) y 72 (B) h, en VP de taquizoítos expuestos a 500 U/ml de IFN- γ . A partir de este tiempo, se comienza a observar la VP más redondeada

y los parásitos comienzan a proliferar más lentamente, la marca de CST1 se detecta alrededor de la estructura prequistica (flechas) y en algunas ocasiones se logra observar en el cuerpo residual (cabeza de flecha). En su mayoría a estos dos tiempos se observa la VP adquiriendo una forma redondeada y se hace evidente la baja tasa de proliferación de los parásitos. Núcleo= DAPI, CST1= Lectina-FITC, Merge= Contraste de interferencia diferencial (DIC) + fluorescencia. Escala = 5µm

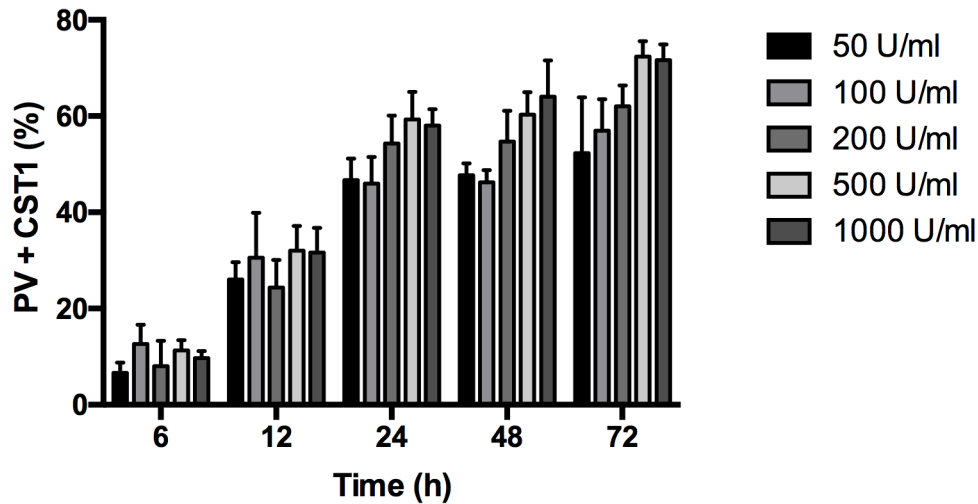


Figura 19. Porcentaje de VPs positivas a CST1. Gráfica donde se representan los resultados de fluorescencia de VPs con la marca de la glicoproteína CST1. El cultivo celular invadido con taquizoítos de *Toxoplasma* pretratados con IFN- γ , se fijó y se trató para evidenciar la marca de CST1 a distintos tiempos con concentraciones crecientes de IFN- γ . De acuerdo con análisis estadístico t-Student para datos no paramétricos. La diferencia significativa entre las concentraciones de 1000 y 500 U/ml comparadas con 50 U/ml *p= 0.02. n=3

Con base en lo anterior, se determinó si el aumento en la expresión de CST1 tenía una relación directa con la expresión de proteínas del estadio de taquizoíto como la proteína SAG1. SAG1 es una proteína de membrana que se expresa únicamente en el estadio de taquizoíto y esta proteína deja de expresarse en la etapa de diferenciación del parásito a la forma de bradizoíto mientras que la glicoproteína CST1 que es marcador del estado diferenciado de bradizoíto a quiste, empieza a expresarse.

Con el fin de dar seguimiento a los cambios en la expresión de SAG1 y CST1 durante el proceso de enquistamiento inducido por la exposición a IFN- γ , se incubaron taquizoítos con 500 U/ml de IFN- γ por 4 h, se invadieron células HEp-2 por 2 h, y se dejaron proliferar por 6, 12, 24, 48 y 72 h. A cada tiempo las células fueron procesadas para fluorescencia marcándose tanto CST1 como SAG1 (Fig. 20). A las 6 h de proliferación apenas es distinguible la marca de CST1 y SAG1 continuó delimitando el películo del parásito. A las 12 h, los taquizoítos se redondearon con una distribución de SAG1 en la periferia de los parásitos, mientras que la marca de CST1, se presentó en forma de pequeños parches aparentemente al interior de los parásitos (Fig. 20, flecha). A 24 h de proliferación, se detectan mas parches de CST1 cercanos al parásito y al cuerpo residual, mientras que la marca de SAG1 se detectó en forma fragmentada y perdiéndose la continuidad del marcaje en la periferia de los parásitos (cabeza de flecha). A las 48 h de proliferación, la marca de SAG1 solo se detectó como pequeños puntos en los cuerpos de los parásitos, mientras que la de CST1 se detectó mayoritariamente asociada a la membrana de la VP; adicionalmente, la VP empezó a adquirir una forma ovoide conteniendo en su interior a los parásitos proliferantes. A las 72 h de proliferación, la marca de SAG1 ya no es detectable mientras que la de CST1 está claramente confinada a la membrana de VPs con morfologías ovoides sugiriéndose el inicio del proceso de enquistamiento del parásito. Un aspecto interesante es, que a las 48 y 72 horas de incubación, al interior de algunas de las estructuras ovoides, se observó una cantidad de parásitos mucho menor que en las VPs normales (Fig. 18B, 200 U/ml (merge) (fecha y punta de flecha respectivamente) y (Fig. 21 B, merge), sugiriendo que el proceso de enquistamiento detuvo la proliferación de los parásitos tal vez para prepararlos para su diferenciación a un estado menos activo que es el de bradizoíto. Un hallazgo interesante y aún no reportado es que, la glicoproteína CST1 una vez sintetizada, se asoció desde los primeros tiempos de su detección, con la membrana de la VP, es decir que esta membrana vacuolar sirve como andamio o sistema de sostén para que de ahí se empiece a formar la pared quística.

Por otro lado, también se determinó que no todos los parásitos que invaden a una célula, y que son tratados con IFN- γ , entran en proceso de enquistamiento al mismo tiempo como se muestra en la figura 20 B; en donde se observan dos VPs, una que expresa CST1 que mantendría alojados a los bradizoítos y, la otra VP donde no se observa la expresión de CST1

pero si de SAG1 en los parásitos; además se observa que la cantidad de parásitos es menor en la estructura que expresa CST1, lo cual sugiere una disminución en la proliferación, que es una condición relacionada con el enquistamiento de *Toxoplasma*. En el control negativo de parásitos sin IFN- γ en proliferación por 72 h, no hay la expresión de CST1, mientras que para SAG1 se colocó únicamente el anticuerpo secundario (Fig. 20C).

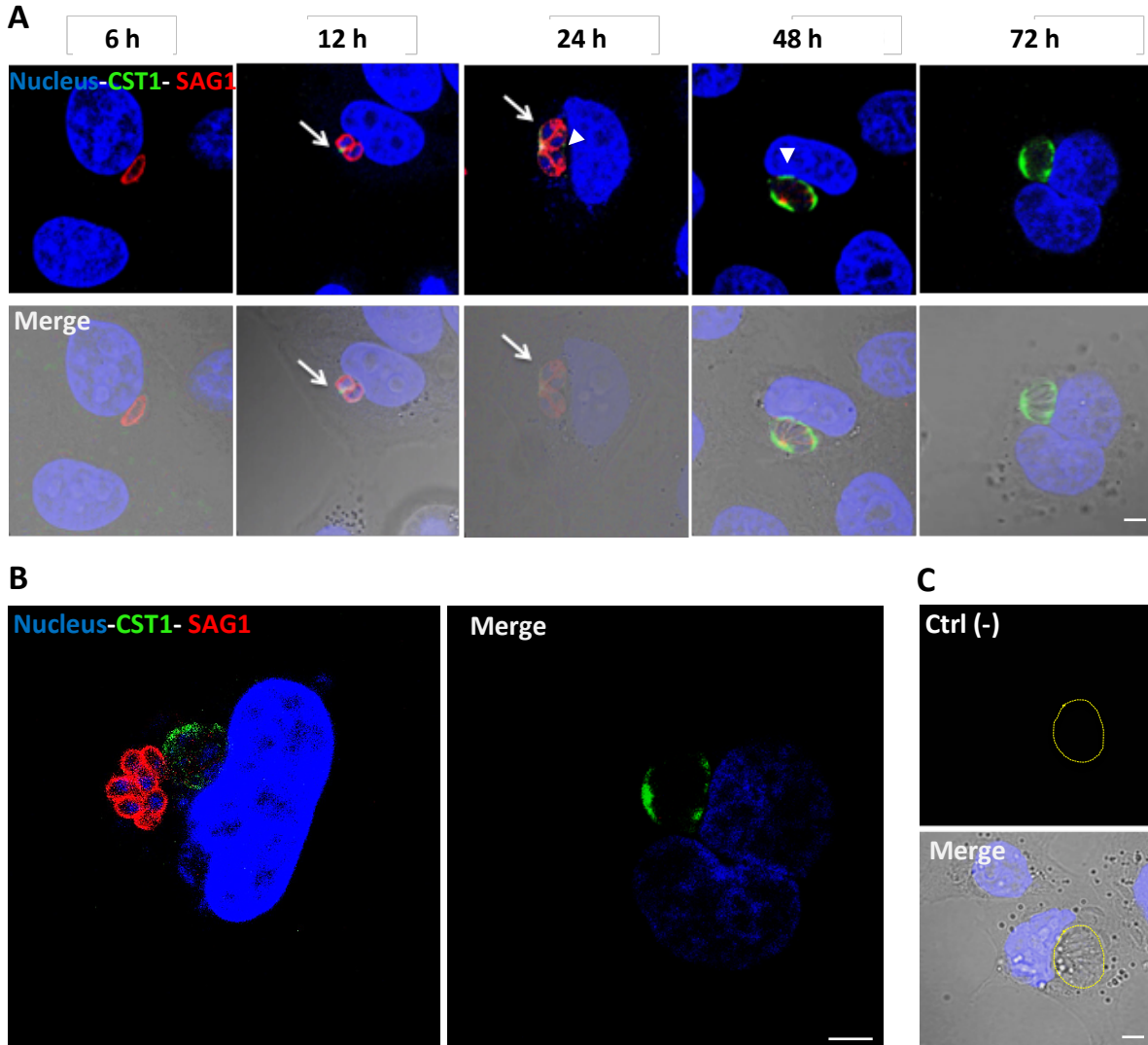


Figura 20. Expresión de CST1 y SAG1 de 6-72 h de proliferación de los taquizoítos de *Toxoplasma* con 500 U/ml de IFN- γ . A) Se muestra la expresión gradual de CST1 conforme el proceso de diferenciación se lleva a cabo, viendo que a las 72 h los parásitos se diferenciaron lo cual también se demuestra con la pérdida gradual de la marca de SAG1 específica de taquizoítos. B) Célula multi-invasada, que muestra dos VPs en un cultivo

incubado por 72 h; en verde se ve la marca de CST1 que muestra la diferenciación de los parásitos y en rojo se observa la marca de SAG1 propia de los parásitos en el estadio de taquizoíto. C) Control negativo de CST1 en parásitos incubados por 4 h sin IFN- γ y mantenidos en proliferación por 72 h. Círculo= VP, Núcleo= DAPI, CST1= Lectina-FITC, SAG1= TRITC, Merge= Contraste diferencial interferencial (DIC) + fluorescencia. Escala = 5 μ m

10.3 Efecto de IFN- γ en la extrusión del conoide, invasión y proliferación de taquizoítos preincubados con la citocina.

Con base en reportes previos (Castro-Elizalde et al., 2018), cuando el parásito inicia el proceso de diferenciación, el metabolismo del mismo se hace más lento provocando que la tasa de proliferación de *Toxoplasma* disminuya, esto con la finalidad de mantenerse dentro de la estructura quística formada en el interior de las células infectadas y que luego evoluciona hasta convertirse en un quiste tisular. En este sentido, se evaluó si en nuestras condiciones de inducción de enquistamiento por la exposición a IFN- γ , se afectaba la proliferación de los parásitos, para lo cual los parásitos preincubados con IFN- γ , se usaron para invadir células HEP-2 y se dejaron proliferar por 72 h. Al término de este tiempo, se cosecharon las células, se purificaron los parásitos y se contaron a fin de determinar el porcentaje de proliferación con respecto al control de parásitos no expuestos a IFN- γ . Lo que se observó fue que la tasa de proliferación de los parásitos se encontró disminuida hasta en un 30% respecto al control, corroborándose lo descrito en reportes previos como se muestra en la Figura 21A (Dubey, 2009).

Para determinar si los parásitos expuestos a IFN- γ modifican alguna otra función dinámica relacionada con la invasión de las células hospederas, se estudió si sus capacidades para la extrusión del conoide y de invasividad estaban afectadas. Para ello, se incubaron los parásitos con 500 U/ml de IFN- γ de acuerdo al protocolo antes descrito y posteriormente se evaluaron para la extrusión del conoide utilizando etanol como inductor de acuerdo a lo reportado por Del Carmen et al., (2009) así como en su capacidad de invasividad en células HEP-2 por 2 h determinándose los porcentajes de invasión y extrusión del conoide respectivamente. Como se muestra en la Figura 21 B y 21 C, se encontró que la exposición al IFN- γ no modificó la

invasividad ni la capacidad para extruir el conoide con respecto a los controles (Fig. 21 B y C respectivamente).

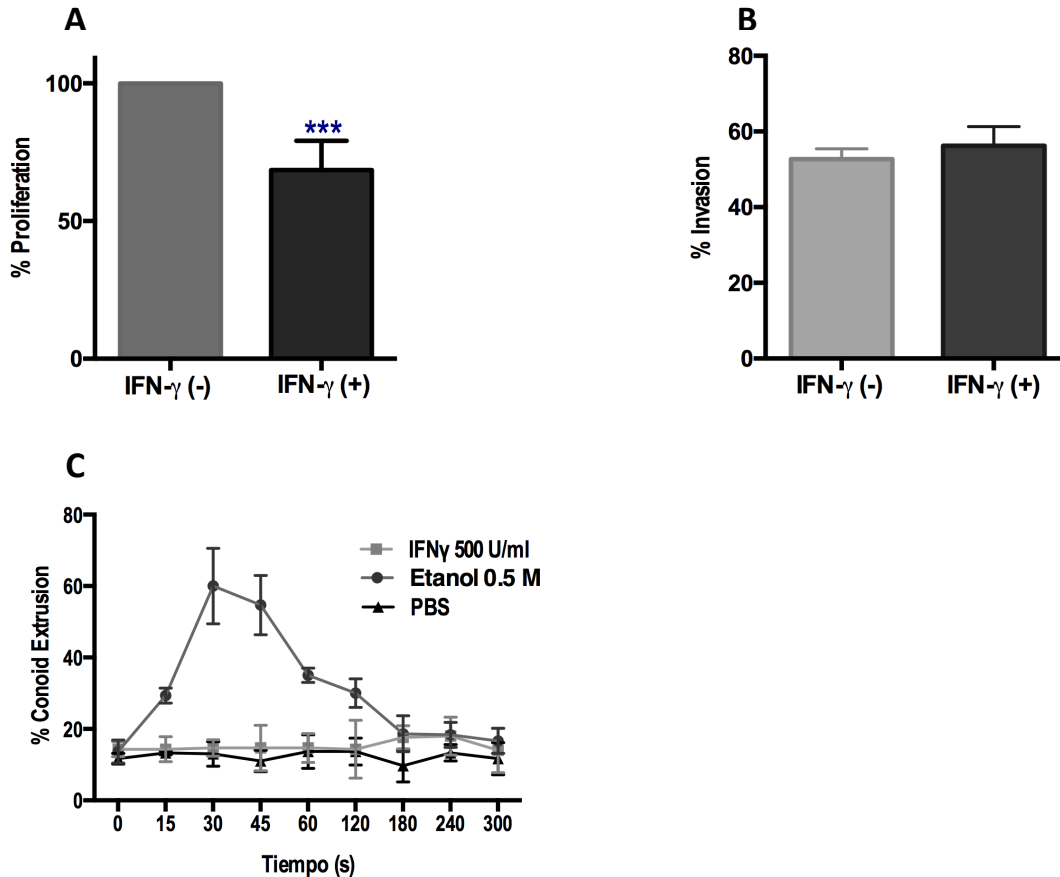


Figura 21. Efecto de IFN- γ en la extrusión del conoide, invasión y proliferación de *Toxoplasma*. Los taquizoítos se preincubaron con 500 U/ml de IFN- γ , se lavaron exhaustivamente y se usaron para los ensayos de proliferación e invasión, mientras que para la extrusión del conoide, el IFN- γ se colocó a distintos tiempos y posteriormente se fijaron los taquizoítos para observar el efecto. A) Efecto del pretratamiento de taquizoítos con IFN- γ en la proliferación (-) = control sin citocina, (+) = con IFN- γ . B) Efecto de IFN- γ en la invasión por *Toxoplasma* previa incubación con la citocina, como control negativo se incubaron los taquizoítos en PBS y se contó el número de VPs en 300 células. C) Efecto de IFN- γ en la extrusión del conoide con respecto al tiempo. Se usó etanol como control positivo para inducir la extrusión del conoide (Del Carmen et al., 2009), como control negativo se usó PBS la estadística se realizó usando t-Student para datos no paramétricos. $P < 0.0002$. $n = 3$.

10.4 IFN- γ se une a *Toxoplasma gondii* probablemente a través de un receptor en la membrana del parásito.

Debido a que la incubación de parásitos extracelulares con la citocina, generó una respuesta celular del parásito que tuvo como consecuencia su diferenciación a bradizoíto y formación de quistes tisulares aparentemente a partir de la membrana de la VP, es muy probable que *Toxoplasma* sea capaz de detectar y unir a la molécula de INF- γ en una forma similar a como ocurre en otros patógenos (Diaz-Valencia et al., 2015; Talamas-Rohana et al., 1992; Velge et al., 1988). Por lo que, con la finalidad de determinar si *Toxoplasma* posee una proteína de unión a IFN- γ , se incubaron parásitos previamente fijados con IFN- γ recombinante 500 U/ml, a fin de determinar la unión del IFN- γ mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-IFN- γ . Se encontró en los parásitos, un patrón fluorescente en forma de pequeños parches discontinuos sobre la membrana (Figura 22, cabeza de flecha). Este marcaje no fue detectado en todos los parásitos.

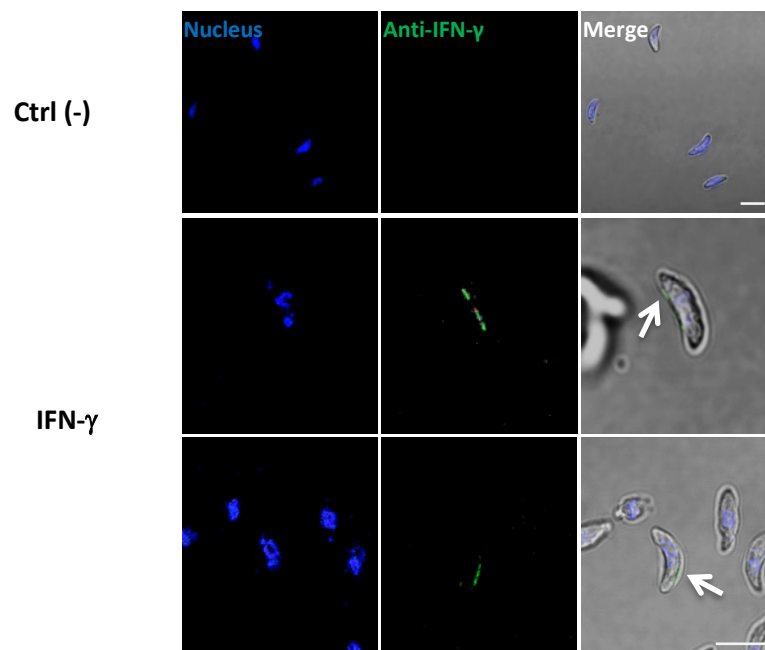


Figura 22. Molécula de unión a IFN- γ vista por inmunofluorescencia. Los taquizoítos previamente fijados se incubaron con la citocina, se realizó la inmunotinción usando un anticuerpo dirigido a IFN- γ , se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo y se observó la marca en algunas zonas de los parásitos (flechas), las flechas marcan la periferia

de las membranas teñidas. Ctrl (-) corresponde a el procesamiento de parásitos sin IFN- γ . Núcleo= DAPI, Anti-IFN- γ = FITC, Merge= Contraste de interferencia diferencial + fluorescencia (DIC). Escala = 5 μ m

10.5 Acoplamiento de IFN- γ a biotina para la detección de la molécula de unión a la citocina

El marcaje detectado en algunos parásito (Figura 22) nos hizo plantear que probablemente la estrategia experimental seguida no fue la más efectiva, y tal vez se debió a que, en el protocolo se utilizaron, aparte de la citocina, dos distintos anticuerpos para detectar la proteína, por lo que se concluyó que un método de detección más directo podría generar una mejor señal de lo observado. Por lo que se decidió el acoplamiento del IFN- γ a moléculas de biotina, un método muy utilizado para el etiquetado de proteínas cuyo uso es aplicado incluso para cromatografía de afinidad (Bayer & Wilchek, 1980). El acoplamiento de biotina a una proteína es mediante una reacción de sustitución en donde el grupo carboxilo de la biotina que viene acoplado con la molécula de hidroxisuccinimida reacciona con los grupos amino de las proteínas permitiendo el acoplamiento de la biotina a estas. Posteriormente, se purificó el complejo IFN- γ /biotina y el producto recolectado lo evaluamos para determinar si se llevó a cabo la reacción.

Biotina es una vitamina que tiene alta afinidad con avidina, esta última puede ser acoplada a HRP y moléculas fluorescentes permitiendo la detección de la proteína en cuestión, en este caso IFN- γ . La validación de la reacción de acoplamiento se realizó mediante electroforesis de IFN- γ , el producto de la reacción entre IFN- γ y biotina (IFN-g/biotina) y biotina sola y su evaluación por Wb como se muestra en la figura 23 A. Encontrándose una banda de 40 kDa que por Wb tiene a las moléculas de IFN- γ evaluando con un anticuerpo específico y de la biotina evaluado por incubación con avidina-HRP.

Una vez que se corroboró el acoplamiento, realizamos la titulación del IFN- γ /biotina para determinar la concentración mínima en la que la avidina-HRP se puede acoplar y que la señal es fácilmente observada (Fig. 23 B). Finalmente, se realizó la titulación de IFN- γ /biotina para determinar cuál concentración era la ideal para ser detectada por nuestro sistema (Fig. 23 C). De este ensayo, se concluyó que la mejor condición para trabajar con este sistema es con la

dilución 1:30,000 que fue la que se usó para en ensayo de la figura 23 C en donde se pueden detectar hasta 1 ng de la citocina acoplada a biotina.

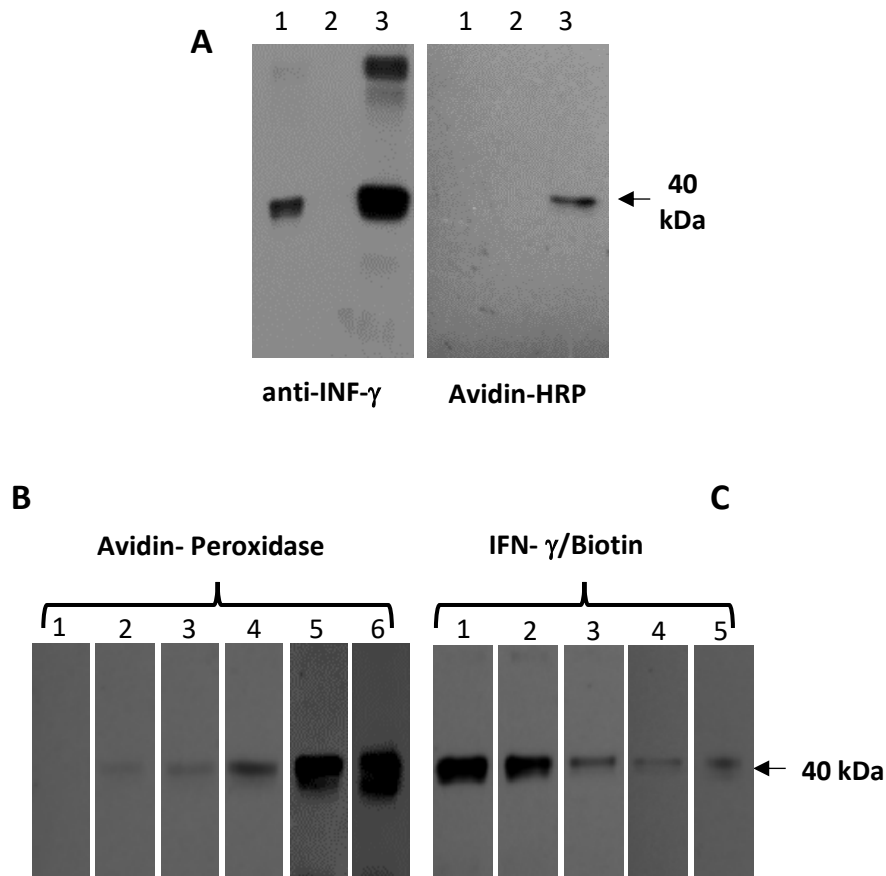


Figura 23. Validación del acoplamiento del IFN- γ a biotina. Validación de la unión de IFN- γ a biotina en: A) se usó anti-IFN γ , el anticuerpo contra la citocina, y avidina-HRP, molécula que reconoce a la biotina; en el carril 1 se corrió IFN- γ , en el 2 biotina, y en el 3 IFN- γ /biotina. B) Determinación de la dilución de avidina-HRP para detectar 500 ng de la citocina. 1= 1:500,000, 2= 1:200,000, 3= 1:100,000, 4= 1:50,000, 5= 1:30,000, 6= 1:10,000 C) Mínima concentración detectable de IFN- γ /biotina. 1= 500 ng, 2= 300 ng, 3= 100 ng, 4= 10 ng, 5= 1 ng.

10.6 IFN- γ / biotina se une a la proteína de unión a IFN- γ en *Toxoplasma*

La avidina y la estreptavidina son tetrámeros que poseen alta afinidad por la biotina ($K_d= 1 \times 10^{-15}$ M) (Weber, Ohlendorf, Wendoloski, & Salemme, 1989) y unen cada uno 4 moléculas de biotina y estas características sirven para amplificar la sensibilidad de inmunoensayos y

tienen un amplia gama de aplicaciones en la biotecnología y la bioquímica, utilizándose incluso para hallar dominios funcionales en proteínas y receptores. (Weber et al., 1989; Wilchek & Bayer, 1984). Cuando se evaluó el IFN- γ - biotina en los taquizoítos, se obtuvo un aumento en la marca fluorescente de la molécula unidora de IFN- γ en la membrana de *Toxoplasma* corroborando los resultados previos de inmunofluorescencia indirecta (Fig. 24). No obstante, la frecuencia no fue mucho mayor y tal vez se debe a que no todos los parásitos expresan a la molécula unidora de IFN- γ al mismo tiempo, lo cual podría sugerir un evento de inducción para la expresión de esta molécula.

De acuerdo a lo observado en la figura 24, la marca fue observada solo en algunos parásitos, sin embargo, se puede observar que la intensidad de la fluorescencia se mejora en comparación con el ensayo donde se utilizaron anticuerpos (Fig. 22), aunque haría falta cuantificar la marca para sustentar lo mencionado. La marca se observó de manera más clara como parches en la membrana de los parásitos (flecha), pero también hay parásitos carentes de la marca (cabeza de flecha), al incubar a los taquizoítos únicamente con la avidina-FITC no se observó marca por lo que mediante este ensayo también corroboramos la especificidad del marcaje.

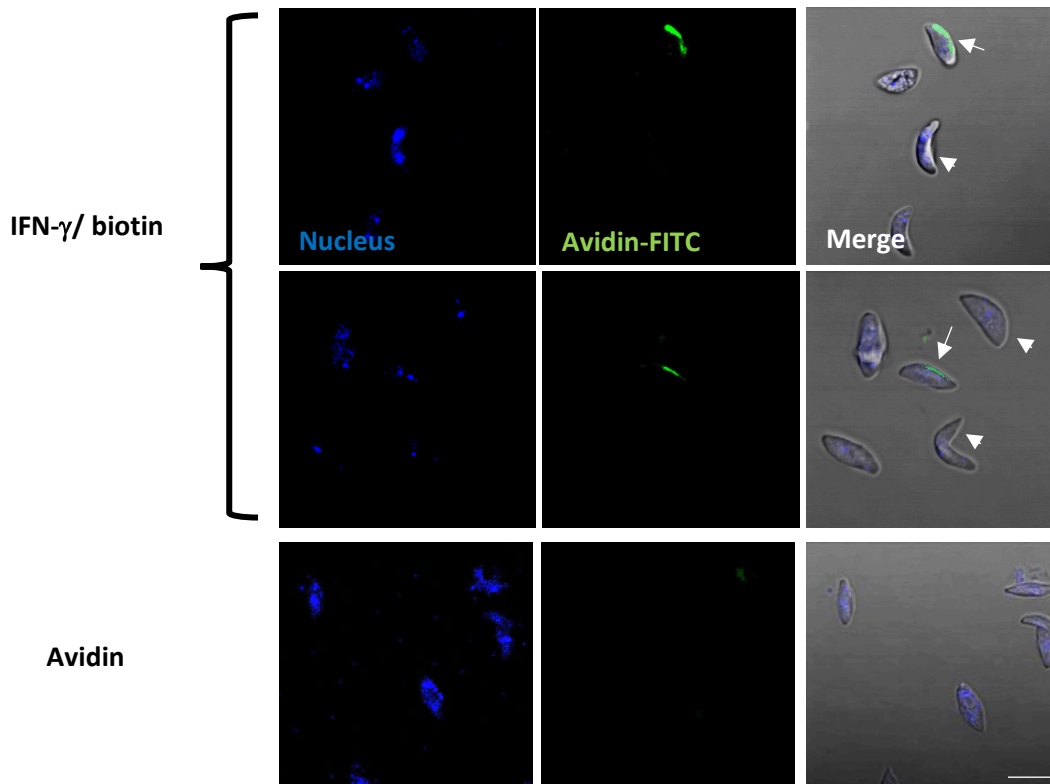


Figura 24. Molécula de unión a IFN- γ evidenciada a través de la marca generada por la citocina unida a biotina y avidina-FITC. En IFN- γ / biotina, se adicionó la citocina a los parásitos después de ser fijados, posteriormente, se colocó avidina-FITC para hacer evidente la marca. En avidina, los taquizoítos fueron incubados solo con PBS. Núcleo= DAPI, Avidin-F= hace evidente la unión de IFN- γ / biotina con el receptor en el parásito (flechas), Merge= Contraste de interferencia diferencial (DIC). Escala = 5 μ m

10.7 Aislamiento del películo de *Toxoplasma gondii* como estrategia para aislar la proteína de unión a IFN- γ

Con el fin de identificar a la molécula unidora del IFN- γ , se estandarizó una estrategia experimental que nos permitiera aislar una fracción enriquecida de películo, y posteriormente su identificación mediante estrategias proteómicas. Se siguió el protocolo reportado por Foussard et al., (1990), para el aislamiento del películo (complejo trimembranal del parásito). Una vez lisados los parásitos, se aisló la fracción enriquecida de películo mediante un gradiente discontinuo en el rango de sacarosa entre 1.6 a 0.25 M. Se obtuvieron tres fracciones, F1, F2 y F3 (Figura 25 A). Cada fracción se proceso para PAGE-SDS, Wb y

MET. Para electroforesis y Wb se corrió: la fracción F1, el sobrenadante o fracción soluble (Snt) después de la lisis y ultracentrifugación de los parásitos, y el extracto total de taquizoítos sin tratamiento (WE). Se observó que en el perfil electroforético de F1, se enriquecieron algunas bandas (Figura 25 B, flechas), las cuales no se observaban en la fracción soluble o se encontraban menos intensas. Al hacer la validación del extracto aislado por Wb (Figura 25 A), observamos que la proteína del complejo membranal interno IMC 1, se encontraba solo en F1 y en el extracto total como era de esperarse pero no en la fracción Snt, lo mismo sucedió con GAP45, una proteína propia del películo y que se utilizó como control positivo. Esta proteína solo se observó en F1 como en extracto total. Para el análisis ultraestructural de las fracciones mediante MET, se recolectaron las fracciones y el pellet obtenido después de la centrifugación, fue procesado para ultramicrotomía y observación al MET (Fig. 25 B-D). Se encontraron estructuras que tenían apariencia de filamentos, estas estructuras correspondían a fracciones del películo, algunas se veían enrolladas o formando vesículas (Figura 25 B, asteriscos y flechas) y se observaban electrodensas, los microtúbulos se observaron por debajo del complejo de membranas (Figura 25 B, b, cabeza de flechas) y las regiones más electrodensas correspondieron al complejo membranal interno (Figura 25 B, d, flechas). En las figuras C y D se observaban organelos (flechas rojas) y parásitos semicompletos (Doble cabeza de flechas) estas fracciones fueron las más contaminadas y no fueron consideradas como parte de nuestro aislado del películo.

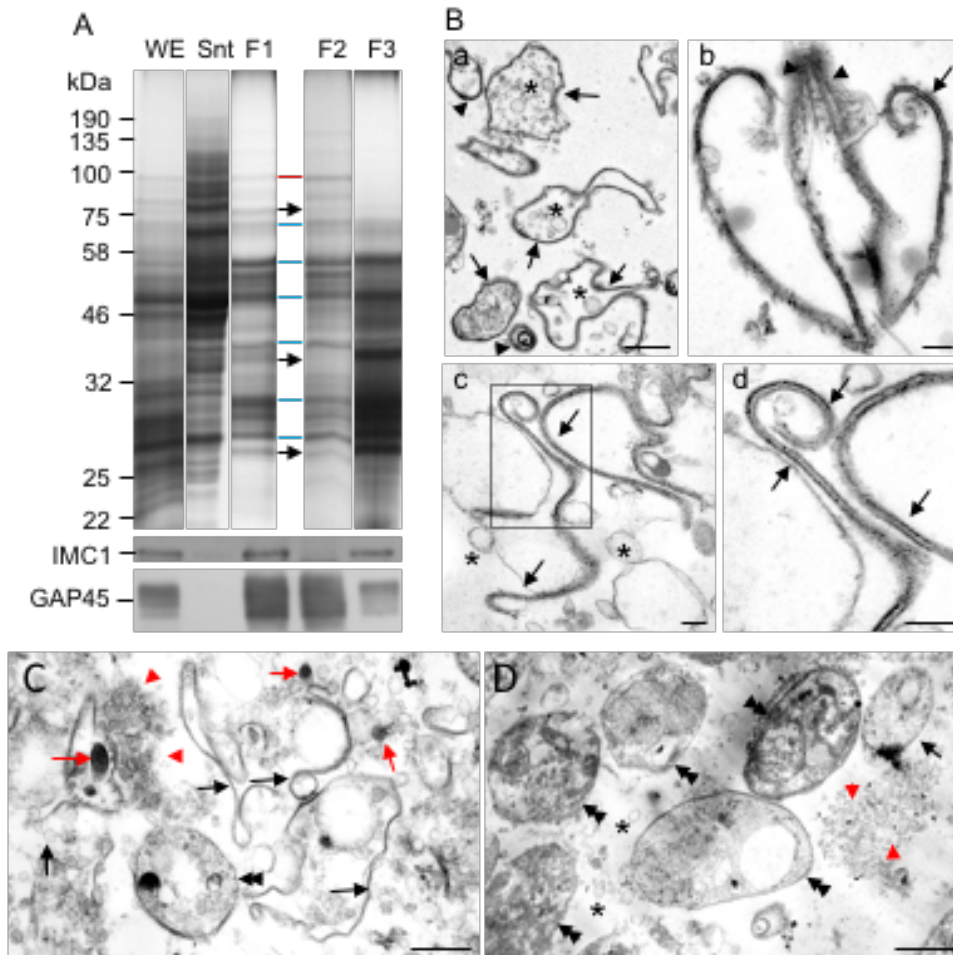


Figura 25. Análisis de la película de *Toxoplasma gondii*. A) SDS-PAGE de extracto completo (WE), sobrenadante (Snt) y fracciones (F1, F2 y F3) obtenidas por centrifugación en gradiente de sacarosa. IMC y GAP45 indican WB para las proteínas mencionadas. Los recuadros B-D corresponden a MET de fracciones aisladas. Los recuadros B a-d corresponden a la fracción F1, con enriquecimiento de la película; El recuadro C corresponde a la fracción F2; El recuadro D corresponde a la fracción F3. Las flechas negras indican vesículas grandes derivadas de la película, los asteriscos indican vesículas pequeñas; las puntas de flecha indican estructuras del citoesqueleto, las flechas rojas indican orgánulos densos, las puntas de flecha rojas indican material difuso y las puntas de flecha negras dobles indican parásitos semi-completos D) MET parásitos de la fracción F3. Las puntas de flecha dobles negras indican parásitos parcialmente extraídos. Barras de escala en Ba, C y D = 1 μ m, barras de escala en Bb-d = 200 nm.

Con el fin de identificar las proteínas que forman parte del películo de *Toxoplasma* y hallar potenciales blancos de unión a IFN- γ , se realizó la identificación proteómica del extracto de membranas del parásito. Un hecho interesante es que, a la fecha no existen reportes acerca de los componentes de la membrana del películo, por lo que, este ensayo en conjunto nos brindará información acerca de las posibles proteínas de unión a IFN- γ , y por otro lado, la identificación de los componentes del películo.

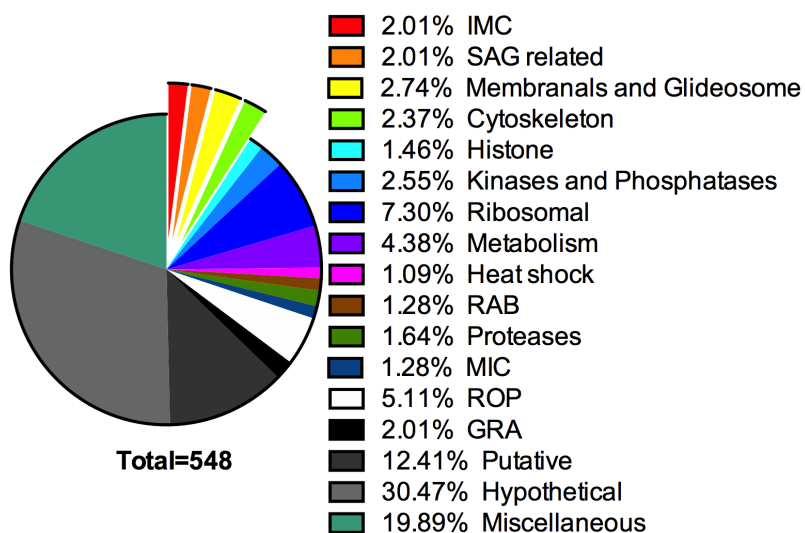


Figura 26. Distribución de las proteínas halladas en el películo de *Toxoplasma*. La digestión de proteínas del películo de *Toxoplasma* se realizó con tripsina, se aplicaron términos de exclusión para aquellas proteínas que no cumplían ciertas características y finalmente se obtuvieron 548 moléculas que se clasificaron de acuerdo con su probable función u organelo en el que se pueden localizar. Las rebanadas que sobresalen representan a las proteínas más representativas que forman parte del películo del parásito. El 100 % corresponde a las 548 proteínas.

El análisis se realizó utilizando dos métodos para la digestión de las proteínas. En el primero se hizo la digestión de las proteínas con tripsina y se procesaron para E masas identificándose 548 proteínas (Figura 26) que se cuantificaron utilizando como estandar una alícuota de 25 fmol μl^{-1} de alcohol deshidrogenasa 1, de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína fue usada como estándar para todas las muestras cuantificadas como se muestra en la figura 27. Las

proteínas detectadas correspondieron a componentes de la membrana plasmática, al complejo membranal interno o forman parte de los mecanismos de motilidad necesarios para la invasión celular, como las proteínas IMC y las proteínas GAP.

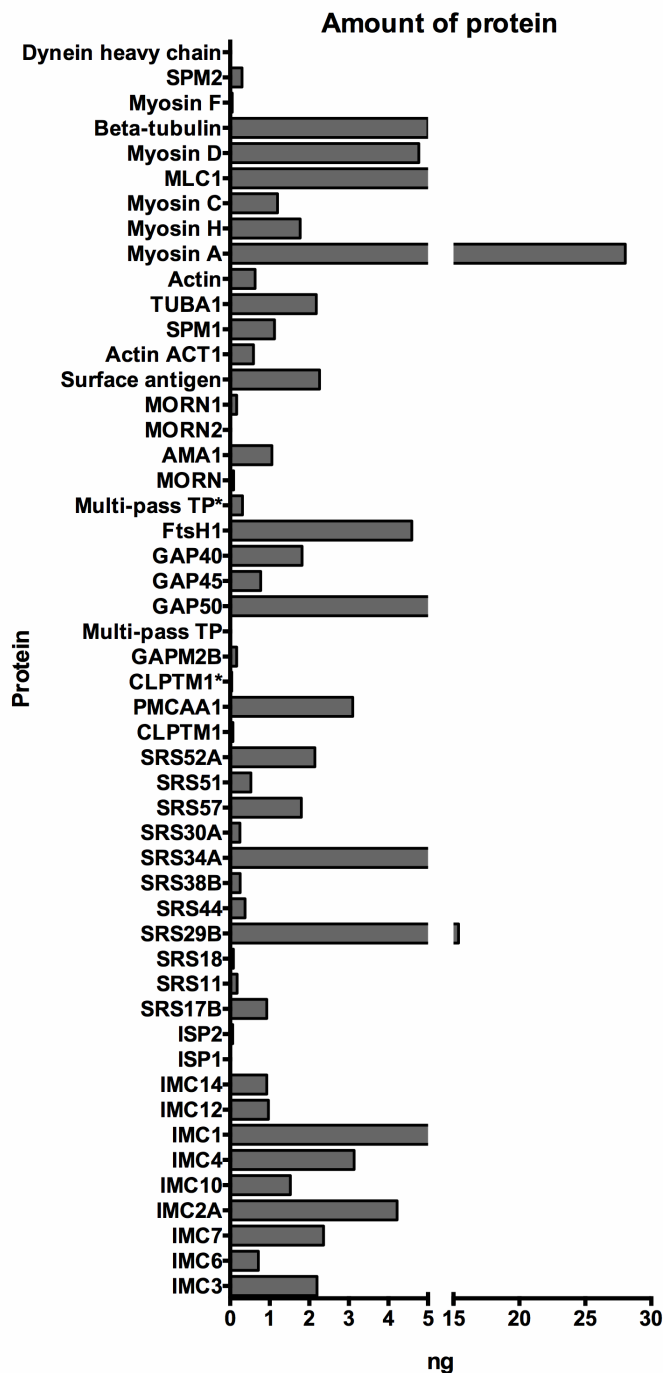


Figura 27. Cuantificación relativa de las proteínas propias del películo de *Toxoplasma*.

Se muestran en la gráfica las proteínas que por su naturaleza se hallan en el complejo trimembranal de *Toxoplasma* como las proteínas GAP, IMC y aquellas relacionadas con el citoesqueleto y motilidad del parásito y cuya localización se asocia con el películo de *Toxoplasma*. Multi-pas TP * corresponde a TGGT1_267620, Multi-Pas TP corresponde a

TGGT1_219270, CLPTM1 * corresponde a TGGT1_205240, CLPTM corresponde a TGGT1_299110.

Quimotripsina, es una serina proteasa que rompe en el carboxilo terminal de la tirosina, fenilalanina, triptófano y metionina. Esta enzima, en espectrometría de masas se usa para digerir con mayor facilidad aquellas proteínas con dominios hidrofóbicos como las proteínas de membrana (Giannone, Wurch, Podar, & Hettich, 2015), nosotros usamos esta enzima con la finalidad de hallar la mayor cantidad posible de proteínas ya que el extracto a analizar, era de membranas de *Toxoplasma*. Con esta técnica de digestión y en el análisis proteómico, se encontraron 137 proteínas (Figura 28) de las cuales 22 no se encontraron en la muestra digerida con tripsina (Tabla 1). De las 22 proteínas halladas mediante un análisis bioinformático en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> se buscó si tenían sitios liposolubles que indicaran ser proteínas transmembranales, esto con la finalidad de alinear posteriormente sus secuencias con las secuencias del receptor para IFN- γ de mamíferos. Se encontraron 6 proteínas con característica de ser proteínas transmembranales (Tabla 1, en rojo). Sin embargo, cuando se realizó el análisis bioinformático, no hallamos proteínas que tuvieran identidad con el receptor de mamífero. El conjunto de proteínas halladas se clasificaron de acuerdo a su localización en algún organelo del parásito o por la función que realizan.

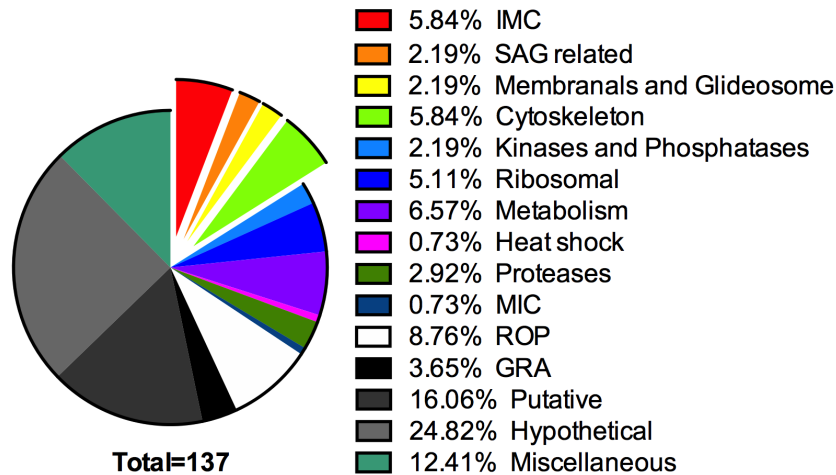


Figura 28. Gráfica de pastel de las proteínas halladas en el películo de *Toxoplasma digridis* con quimotripsina. Se aplicaron términos de exclusión para aquellas proteínas que no cumplían ciertas características y finalmente se obtuvieron 137 proteínas las cuales se clasificaron de acuerdo a la probable función u organelo en el que se pueden hallar.

Tabla 1. Proteínas halladas en el películo del parásito.

Se incluyen las proteínas que se encontraron por digestión con Quimotripsina, y en rojo están indicadas aquellas que mediante el análisis bioinformático, se determinó la presencia de regiones transmembranales y zonas liposolubles que corresponden a características de proteínas transmembranales. Dicha caracterización se realizó en el software del siguiente link: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

10.8 *T. gondii* posee una proteína que tiene identidad con un RIFN- γ soluble

Las proteínas moonlight, son moléculas presentes en muchos organismos, estas son proteínas que pueden tener diversas funciones en el organismo que las expresa (Collingridge, Brown, & Ginger, 2010). Como ejemplo, en *Leishmania* la proteasa GP63 cumple funciones importantes para la virulencia del parásito, y recientemente se encontró que tiene actividad de ciclooxigenasa, por lo cual, a la misma proteína se le atribuyen funciones totalmente distintas en el mismo parásito (Estrada-Figueroa et al., 2018). Además, esa versatilidad no siempre está mediada de acuerdo a la secuencia de aminoácidos que poseen, y que determina un dominio por el cual cumplen determinada función, sino que, el parecido estructural hace que puedan ser proteínas con funciones iguales a su semejante estructural, como GP63 y la

Accession	Description	Mass	Score	Unique peptides
TGGT1_315230-t26_1	Hypothetical protein	69	13.7	4
TGGT1_313900-t26_1	Non-specific serine/threonine protein kinase	385	6.3	2
TGGT1_310780-t26_1	Dense granule protein GRA4	36	3.7	1
TGGT1_306560-t26_1	Hypothetical protein	67	11.2	3
TGGT1_300000-t26_1	rRbosomal protein RPL18	21	5.3	2
TGGT1_281910-t26_1	Hypothetical protein	43	11.9	2
TGGT1_261600-t26_1	Creatinase domain-containing protein	97	13.1	3
TGGT1_260500-t26_1	Putative COPI associated protein	30	36.1	6
TGGT1_257530-t26_1	Transporter, major facilitator family protein	55	35.6	8
TGGT1_254330-t26_1	Lipase	134	9.6	4
TGGT1_249530-t26_1	Putative exportin 1	131	36.4	9
TGGT1_243355-t26_1	Hypothetical protein	10	4.9	1
TGGT1_242640-t26_1	Hypothetical protein	332	8.9	2
TGGT1_231770-t26_1	Putative alpha-tubulin I	52	27.6	9
TGGT1_227280-t26_1	Dense granule protein GRA3	24	34.8	6
TGGT1_218560-t26_1	Acetyl-coA carboxylase ACC2	369	6.9	3
TGGT1_218540-t26_1	Putative peptidase S15	45	20.2	4
TGGT1_215980-t26_1	Hypothetical protein	25	26.0	4
TGGT1_214470-t26_1	Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain-containing protein	86	28.3	4
TGGT1_214260-t26_1	Putative alpha-glucan water dikinase 1	193	13.3	4
TGGT1_213280-t26_1	SAG-related sequence SRS25	21	24.7	4
TGGT1_202240-t26_1	RAP domain-containing protein	202	22.7	5

ciclooxigenasa-2 de *Homo sapiens* (Estrada-Figueroa et al., 2018).

En el estudio del proteoma del parásito *Toxoplasma*, hallamos distintas proteínas, muchas de las cuales tienen funciones ya descritas y otras cuyas funciones aún no han sido definidas. En este trabajo uno de los objetivos del aislamiento del películo fue conocer la composición de proteínas para así realizar análisis bioinformáticos para determinar si en las proteínas halladas había alguna similitud con el RIFN- γ de mamíferos, al mismo tiempo se realizó el análisis bioinformático de toda la base de datos de *Toxoplasma* realizando alineamientos con las secuencias para el RIFN- γ de diversos mamíferos.

Después de un análisis detallado, no se detectaron proteínas que tuvieran algún porcentaje de similitud en su secuencia con el RIFN- γ de mamífero (Figura 29A). Sin embargo, si se encontró en el genoma de diversos virus, una secuencia que codifica para un RIFN- γ , que es sintetizado por las células hospedadoras del virus y que es liberado al espacio extracelular; este RIFN- γ viral tiene como finalidad unirse al IFN- γ secretado e inhibir la acción antiviral del IFN- γ (Alcami & Smith, 1996b; Smith, Talbot-Cooper, & Lu, 2018; Symons et al., 2002). De acuerdo con la secuencia de aminoácidos de este receptor realizamos un alineamiento en el genoma de *Toxoplasma* y se encontró una proteína cinasa con cierto porcentaje de identidad con la secuencia del receptor viral. Se determinó que la secuencia de la proteína ROP17 de la cepa ME49 de *Toxoplasma*, tiene una identidad del 26 % con la secuencia del receptor viral (Figura 29B). ROP17 está clasificada como una proteína cinasa, que se encuentra en las roptrías del parásito y junto con otras proteínas ROP juegan un papel muy importante en la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Etheridge et al., 2014), además la proteína ROP17 fue una de las proteínas halladas por E. masas en el películo de *Toxoplasma* (Figura 37, proteínas ROP).

A Your search is limited to records that include: *Toxoplasma gondii* (taxid:5811)

Job Title	gb AAC52064.1
RID	6KM7PJPB016 <small>Search expires on 03-13 14:04 pm</small> Download All
Program	Citation
Database	nr See details
Query ID	AAC52064.1
Description	interferon-gamma receptor alpha chain [Homo sapiens]
Molecule type	amino acid
Query Length	484
Other reports	

No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

B Your search is limited to records that include: *Toxoplasma gondii* (taxid:5811)

Job Title	gb ALF36351.1
RID	6KKYXNR101R <small>Search expires on 03-13 13:59 pm</small> Download All
Program	BLASTP Citation
Database	nr See details
Query ID	ALF36351.1
Description	soluble interferon-gamma receptor-like protein [Vaccinia ...]
Molecule type	amino acid
Query Length	272
Other reports	Distance tree of results Multiple alignment MSA viewer

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy			
Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show <input type="text" value="100"/> 							
<input checked="" type="checkbox"/>	select all	2 sequences selected					
		GenPept	Graphics	Distance tree of results	Multiple alignment		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	rhostry_protein_ROP17 [Toxoplasma gondii ME49]	30.4	30.4	26%	6.2	26.39%	XP_002365072.1
<input checked="" type="checkbox"/>	rhostry_protein_ROP17 [Toxoplasma gondii TcCatPRG2]	30.4	30.4	26%	7.5	26.39%	KYKZ0289.1

Figura 29. Blast del RIFN- γ de humano y del virus *Vaccinia* con el genoma de *Toxoplasma*. A) Blast del R α IFN- γ de humano con el genoma de *Toxoplasma*, no se hallaron secuencias que fueran significativamente comparables. B) Blast del RIFN- γ soluble del virus *Vaccinia* con el genoma de *Toxoplasma*

10.9 La clonación de IFN- γ permitirá la purificación de la proteína de unión en *Toxoplasma*.

Para poder corroborar que ROP17 es la proteína de unión a la citocina, se montó una columna de cromatografía de afinidad con IFN- γ acoplado a sefarosa con el fin de purificar la proteína del parásito con capacidad de unir al IFN- γ . Con el fin de obtener grandes cantidades de IFN- γ para el montaje de la columna cromatográfica y los ensayos posteriores, se clonó el IFN- γ . Primero se realizó el diseño de primers para el gen de IFN- γ , posteriormente, se obtuvo el cDNA a partir de células JURKAT y células mononucleares de sangre periférica (RNA donado por Dra. María del Carmen Sánchez Torres del Departamento de Biomedicina). Con ayuda de los *primers* sintetizados, se montaron las reacciones de PCR y se amplificó el gen de IFN- γ . Para esto, se montaron varias reacciones y se probó un gradiente de temperatura para hallar la condición óptima en las que se sintetizan mas copias del gen (Figura 30), llegando a la conclusión de que 65.9 era la ideal.

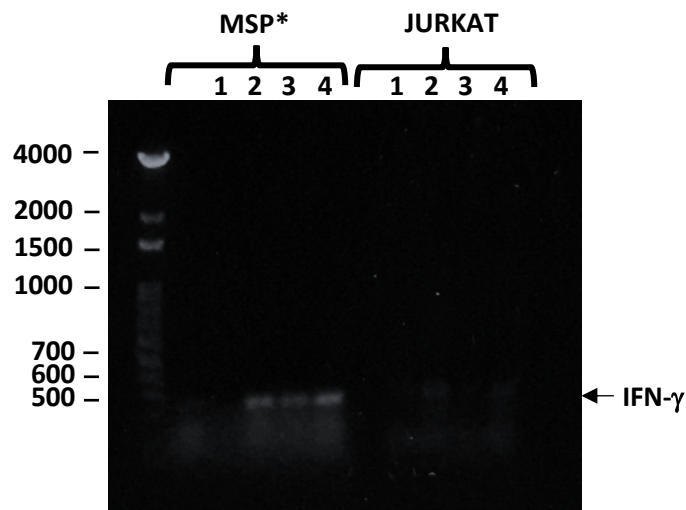


Figura 30. Reacción de PCR para amplificación del gen para IFN- γ . El gen de IFN- γ se sintetizó a partir del RNA de células mononucleares de sangre periférica* y la línea celular JURKAT. El IFN- γ tiene una secuencia de 498 pb . El gradiente de temperatura usado para la amplificación fue de 1=50, 2=53.8, 3=65.9 y 4=70°C.

El vector de expresión pRSET, tiene un sitio de resistencia a ampicilina, una cola de histidinas, un dominio lipoil y un sitio de corte para la enzima TEV cerca de la proteína. El

sitio de resistencia a ampicilina permite la selección de las bacterias que tengan el plásmido insertado, la cola de histidinas servirá para la purificación del IFN- γ , el dominio lipoil ayuda a la solubilidad de la proteína y el sitio de corte para la enzima TEV permite que podamos quitar las colas de histidinas después de la primera purificación (Figura 31 B).

Una vez que se encontraron las condiciones ideales, se sintetizó el DNA del gen para IFN- γ , y la secuencia del plásmido pRSET como se muestra en la figura 31 A, los productos de PCR fueron cuantificados para posteriormente realizar el ensamble *in vivo* de ambas moléculas en células TOP10 supercompetentes cultivadas en medio de selección con 100 ug/ml de ampicilina. Estas células proporcionan una alta eficiencia en la transformación y son ideales para la clonación y propagación de plásmidos.

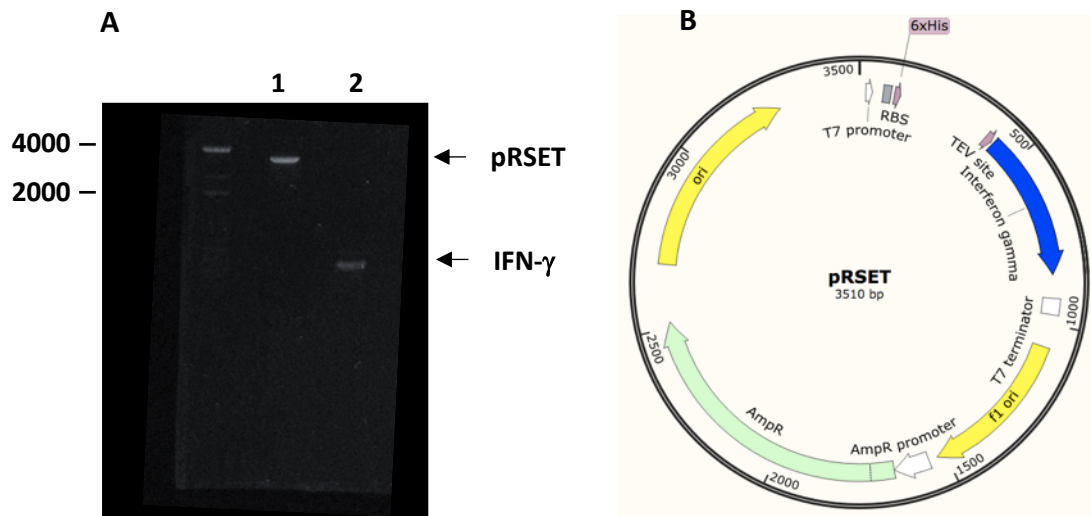


Figura 31. Amplificación de los genes pRSET e IFN- γ . A) Gel de agarosa donde se muestran las bandas correspondientes a cada amplificación, el carril 1 corresponde al amplificado del plásmido pRSET y el carril 2 al amplificado del IFN- γ . B) constructo plásmido-genIFN- γ , se muestran los sitios donde se encuentran las colas de histidinas, el sitio de corte de la enzima TEV y el sitio de resistencia a ampicilina (AmpR).

Después de la transformación bacteriana, las células se crecieron en agar y las colonias se propagaron mediante cultivo en tubos y se les extrajo el DNA con minipreps por lisis alcalina. Se realizaron PCR en las colonias, seleccionando aquellas que amplificaban el gen del plásmido e IFN- γ . Posteriormente el constructo plásmido-gen se introdujo en células SoluBL21, que son bacterias significativamente mejoradas para la expresión de proteínas solubles en mamíferos, en estas se determinaron los perfiles de expresión a 37°C y a TA durante incubaciones de 3 y 12 h. Los perfiles de expresión se muestran en la Figura 32.

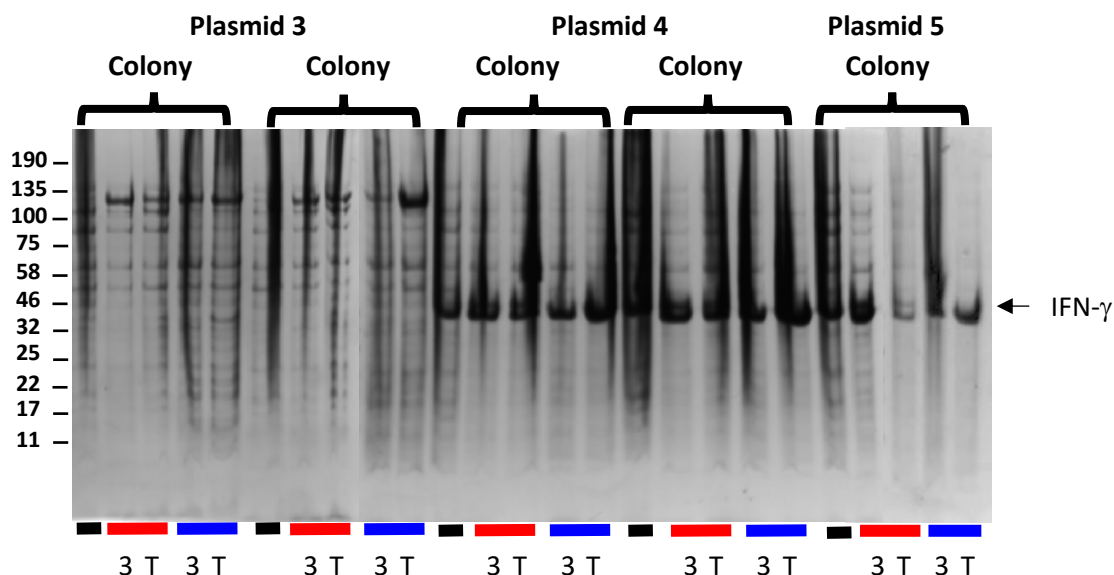


Figura 32. Perfiles de expresión de los plásmidos seleccionados. Se seleccionaron varias colonias de las bacterias que fueron transformadas con diferentes plásmidos seleccionados. Las colonias se crecieron en tubos y se determinaron las condiciones en las cuales era más favorable la expresión del IFN- γ . La línea horizontal negra en la base de la figura, corresponde los controles sin el inductor IPTG incubados toda la noche a 37 °C, la línea roja representa las colonias que fueron cultivadas a 37 °C y la línea azul aquellas que se cultivaron a TA para ambas condiciones se les dejó por 3 horas= 3 y toda la noche=T.

Cuando se definieron las condiciones de cultivo, se seleccionó el ADN del cual se obtuvo la mayor expresión de la proteína y nuevamente se realizó la transformación de las células SoluBL21. Se seleccionaron 3 colonias, se cultivaron a las condiciones estandarizadas y finalmente las bacterias se lisaron. Se dejó incubando el extracto total bacteriano con la

enzima TEV, que es una cisteína proteasa que se usa entre otras cosas para escindir las colas de histidina que están unidas al IFN- γ . Se observó que la banda correspondiente al IFN- γ recombinante unido a la cola de histidinas tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa y cuando esta es removida por la enzima TEV alcanza un peso de 20 kDa aproximadamente (Figura 33) de acuerdo a lo reportado (Pandey & Veeranki, 2018). Hasta este punto se estandarizaron las condiciones en pequeñas muestras de cultivo, una vez que el método estaba montado se procedió a realizar los mismos pasos desde la transformación de las células SoluBL21, pero ahora en cultivos con mayor volumen.

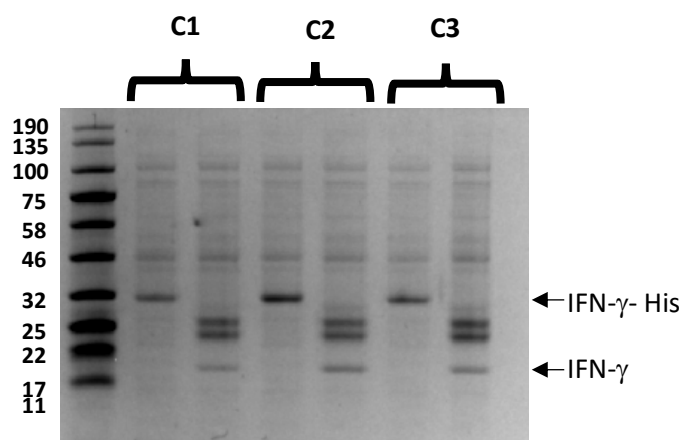


Figura 33. Corte del IFN- γ /His con la enzima TEV. Se colocaron extractos bacterianos provenientes de 3 colonias transformadas diferentes, estos extractos se dejaron cortar por 2 h con la enzima TEV a TA. En la imagen se muestran los extractos totales bacterianos donde se observan las bandas del IFN- γ /His y el IFN- γ cortado, 32 y 20 kDa respectivamente.

Ya establecidas las condiciones de expresión del IFN- γ , se macrocultivaron las bacterias que expresan la proteína. En el punto más alto de la curva de crecimiento bacteriano, se adicionó IPTG para inducir la expresión de IFN- γ y posteriormente se centrifugaron y se lisaron mediante sonicación; el extracto obtenido se ultracentrifugó y el sobrenadante donde estaba contenida la proteína se purificó por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). A partir de la fracción 6 del sobrenadante bacteriano recolectado se observa el enriquecido de la proteína (Figura 34 A).

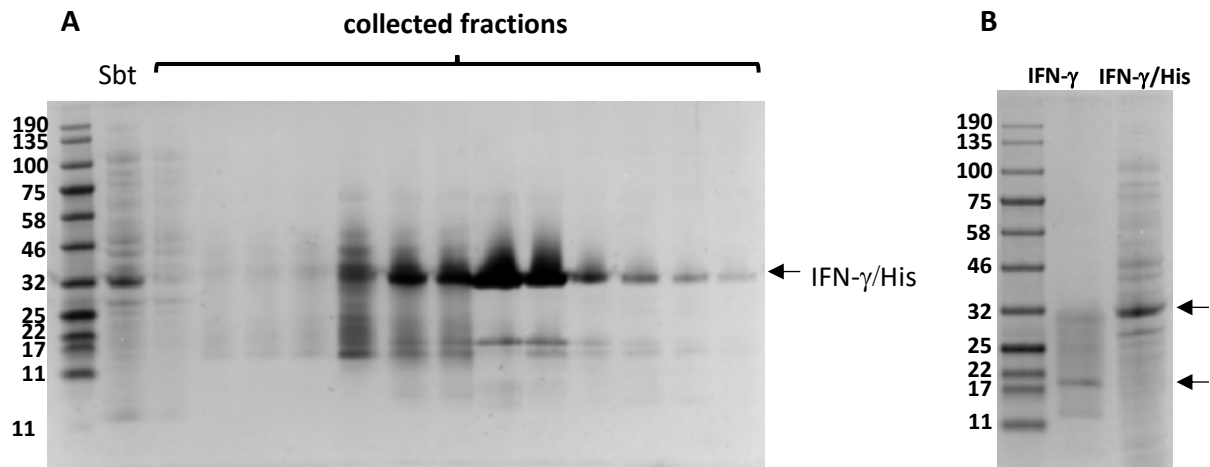


Figura 34. Purificación y corte de IFN- γ / His. A) La purificación se realizó utilizando un gradiente de imidazol, las fracciones del sobrenadante bacteriano (Sbt) fueron recolectadas y cada una se corrió en un gel de SDS-PAGE. B) Corte del IFN- γ /His purificado, se muestra el IFN- γ cortado con la enzima TEV y el extracto total purificado sin cortar. Las cabezas de flecha indican el peso molecular que corresponde tanto a IFN- γ /His como a IFN- γ .

Una vez purificado el IFN- γ , se concentró y se incubó con la enzima TEV esto con la finalidad de romper las colas de histidinas acopladas a la proteína (Figura 34 B), posteriormente se le realizó una nueva purificación por FPLC, y se recolectaron las fracciones de interés, la proteína se concentró hasta 1 ml y se purificó por exclusión molecular (Figura 35). Esta cromatografía nos permitió la elución de proteínas de acuerdo con su tamaño molecular, lo que genera una mejor separación de las proteínas con un alto grado de pureza. Finalmente, el IFN- γ recombinante se usó para distintos fines, incluyendo la preparación de una columna de cromatografía de afinidad.



Figura 35. Purificación del IFN- γ por exclusión molecular El IFN- γ previamente purificado se concentró hasta un volumen de 500 ml y se pasó por una columna de Superdex200 Increase (10/300 mm; GE Healthcare), las fracciones recolectadas fueron concentradas y se usaron para montar una columna de cromatografía de afinidad.

10.10 Se detectó una proteína de unión a IFN- γ por Far Western Blot en extractos de *T. gondii*

Far Western blot (FWb) es una técnica que ha sido usada para observar la interacción entre proteínas por ejemplo la interacción entre un ligando y su receptor (Wu, Li, & Chen, 2007). En esta técnica, se corren las muestras en un SDS-PAGE, se realiza la transferencia del Wb y se incuba con la proteína marcada de interés que puede estar biotinilada, que para nuestro caso fue IFN- γ / biotina.

Con fracciones enriquecidas de películo, se desarrolló la técnica de FWb utilizando IFN- γ /biotina para detectar la proteína de unión en *Toxoplasma*. Las fracciones enriquecidas de películo, sobrenadante y extracto total del parásito se disolvieron en buffer de lisis sin el agente reductor β -mercaptoetanol. Como resultado del FWb, se observó el reconocimiento de una banda de aproximadamente 130 kDa en las tres fracciones colocadas (Figura 36 A), interesantemente se esperaba que en la fracción de películo hubiera una mayor concentración de esta proteína debido a que pensamos que fuera una proteína que se encontrara en la membrana del parásito; sin embargo, la marca más abundante la hallamos en la fracción del sobrenadante y en el extracto total del parásito, por lo que, se tomó la decisión de usar solamente la fracción de extracto total del *Toxoplasma* para los posteriores ensayos. El control negativo que consistió en incubar la membrana con biotina sola, se corrió bajo las

mismas condiciones a fin de descartar que la biotina no se uniera de forma inespecífica a la proteína de 130 kDa y posteriormente, se incubó con avidina-HRP. El resultado se muestra en la figura 36 B, donde se observa que no se marcó ninguna proteína de 130 kDa en nuestro control negativo, esto es indicativo de que precisamente en el complejo IFN- γ / biotina el IFN- γ es el que se une a una proteína de 130 kDa en *T. gondii*. Esta banda de 130 kDa se cortó en el SDS-PAGE y se analizó por espectrometría de masas.

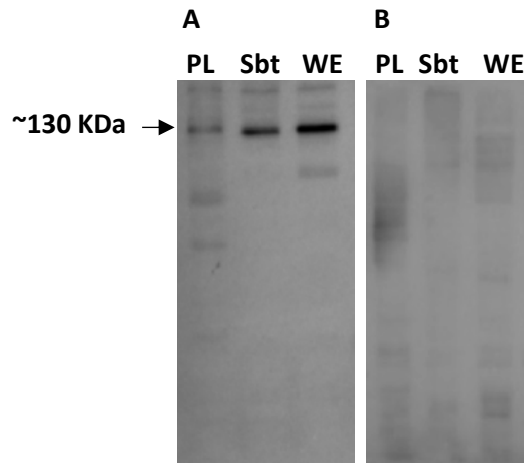


Figura 36. Far Western blot: Detección de proteína de unión a IFN- γ . A) detección de la proteína de unión a IFN- γ en diferentes extractos celulares del parásito, película=PL, sobrenadante= Sbt y extracto total= WE, se colocó la citocina que está unida a biotina y se reveló con avidina acoplada a HRP. B) Control negativo, se corrieron los mismos extractos en las mismas condiciones y se incubó únicamente con biotina, posteriormente se reveló con avidina-HRP.

10.11 La proteína ROP17 tiene similitud con un receptor soluble para IFN- γ y fue detectada por espectrometría de masas

Como un método de identificación de la proteína de *Toxoplasma* que se une a IFN- γ se usó E masas. Primero se corroboró la presencia de la banda en 130 kDa en un gel de PAGE-SDS teñido con Azul de Coomassie y se cortó la banda la cual se procesó para E masas en donde se encontró un total de 485 proteínas, de las cuales la proteína ROP17 fue la única con una similitud del 26 % con el receptor soluble de IFN- γ del virus *Vaccinia*. En la gráfica de la

figura 37 se presenta el total de las proteínas encontradas y la clasificación de cada una respecto a la función con la que está relacionada o en el organelo en el cual se encuentran.

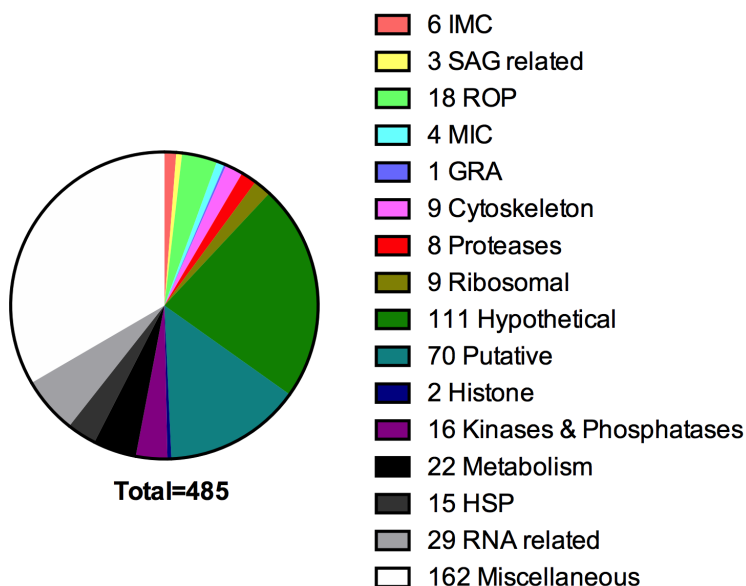


Figura 37. Proteínas encontradas en la banda de 130 kDa. Se recortó la banda de 130 kDa que es donde se encontró la proteína que se unió a IFN- γ por Far Western blot se cortó y se analizó por E masas, encontrando un total de 485 proteínas, dentro de las cuales se identificó a la proteína ROP17. Cada una de ellas se clasificó de acuerdo al organelo donde se encuentran o a la probable función que realizan.

10.12 Cromatografía de afinidad para aislar la molécula de unión a IFN- γ

Calderón y colaboradores (1988), reportaron la purificación del receptor para IFN- γ , a partir de placenta humana utilizando como detergente para su solubilización, octil glucósido y una cromatografía de afinidad de perlas de sefarosa acopladas al anticuerpo contra el receptor. En nuestro trabajo modificamos esta técnica con el fin de lograr la purificación de la proteína de unión en *T. gondii*. Primero partimos de la purificación de parásitos y los incubamos con una concentración de octil glucósido que estuviera cerca de la concentración micelar crítica de la molécula, esto con la finalidad de poder extraer las proteínas de las membranas del parásito y lograr que se mantuvieran lo más intactas posibles. Se probaron distintas condiciones de purificación por cromatografía de afinidad; variando entre IFN- γ e IFN- γ / His

(De este último teníamos mayor cantidad para los ensayos) y variando el pH para la elución. En la figura 38 A se muestra el cromatograma con la elución en condiciones alcalinas; el primer pico es el eluido a pH 9.3, en esta condición se eluyen las proteínas que se pudieran haber pegado de forma inespecífica a la columna y el segundo pico corresponde a la fracción cuando se eluyó a pH 11.5. Cabe mencionar que en condiciones de pH ácido como alcalino, el patrón de elución fue prácticamente el mismo (Figura 38 B) observándose una banda muy abundante de aproximadamente 60 kDa e interesantemente también observamos la banda de 130 kDa en ambas condiciones, cabe mencionar que esta banda se observaba menos abundante en los geles; sin embargo, fue posible observarla. Finalmente, el extracto eluido fue recolectado y se analizó por E masas.

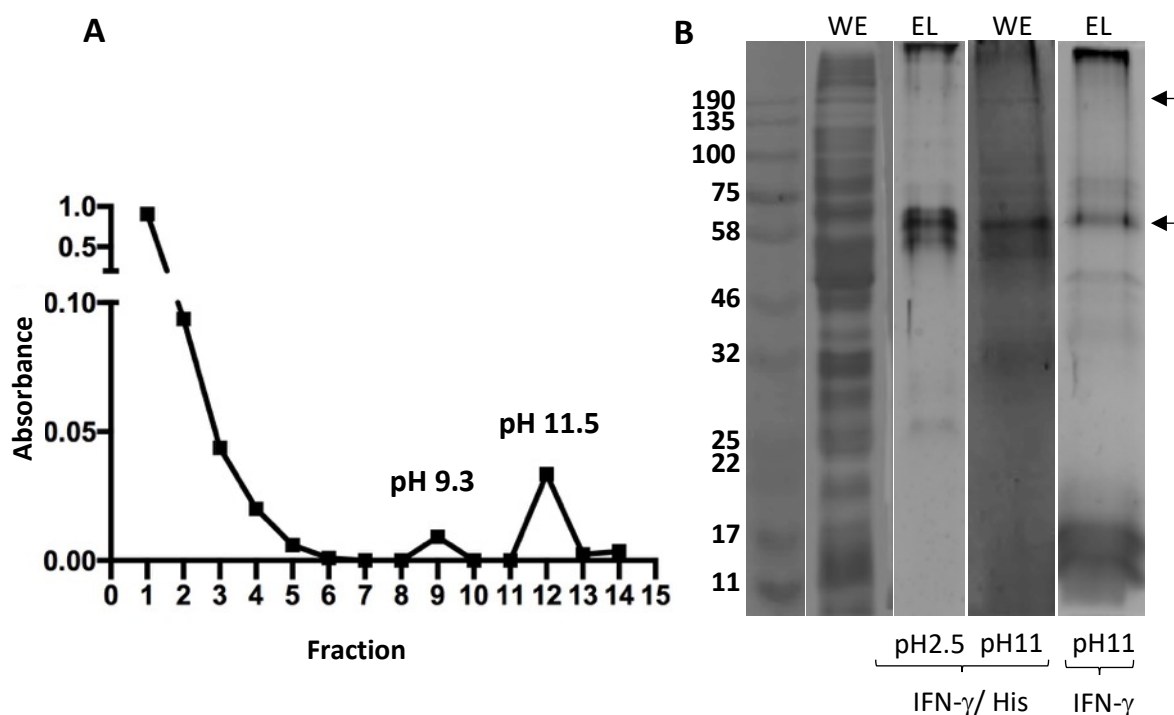


Figura 38. Purificación de la proteína de unión a IFN- γ por columna de afinidad. A) Cromatograma representativo de las distintas fracciones recolectadas y los picos máximos de elución con los buffers usados. La fracción 9 corresponde a la elución con pH 9.3 y la fracción 12 corresponde al pico con pH 11.5. B) SDS-PAGE, se colocó el extracto total de taquizoítos (WE) que se colocó en las columnas de afinidad, (EL) corresponden a las fracciones eluidas para cada experimento a distintas condiciones. Las llaves marcan si la cromatografía se realizó con sefarosa acoplada a IFN- γ / His o a IFN- γ .

10.13 El ensayo de Pull Down evidenció un patrón de purificación similar a la cromatografía de afinidad.

Pull Down es una técnica donde se puede estudiar la interacción entre proteínas permitiendo la purificación de proteínas de unión y la posible identificación de estas (Bell, Engleka, Malik, & Strickler, 2013).

Por lo anterior, se tomó la decisión de realizar un ensayo de Pull Down con el IFN- γ acoplado a la cola de histidinas. Esta característica del IFN- γ acoplado nos permitió unirlo a una columna IMAC con 1 ml de resina His-Trap, estas columnas continene perlas de agarosa previamente equilibradas y unidas a Ni^{2+} , las colas de histidinas del IFN- γ / His quedan unidas al níquel permitiendo que la proteína quede inmovilizada en la columna y de esta manera se crean las condiciones para el ensayo de Pull Down.

El lisado de películo se pasó por la columna, después de esto se eluyó con buffer que contenía imidazol y octil glucósido y la fracción eluida se recolectó, se corrió un SDS-PAGE y se obtuvo el perfil proteico presentado en la figura 39, cabe destacar que con los tres métodos de purificación de la proteína: mediante columna de afinidad con pH ácido y alcalino y con el ensayo de Pull Down, se obtuvo un resultado similar, donde se observa una banda de aproximadamente 130 kDa. Sin embargo, cuando se eluyó la columna, se desprendió el IFN- γ / His junto con las proteínas unidas, como se observa en la figura 39, lo cual dificultó el análisis de masas para la detección de proteínas debido a la alta concentración de IFN- γ presente en el eluido.

En el ensayo de Pull Down, se identificaron bandas entre los 130 kDa y los 60 kDa, estas bandas fueron observadas también en los eluidos de la cromatografía de afinidad, y se detectó una banda más de 30 kDa. Por los dos motivos anteriores se optó por solo utilizar la columna de afinidad con pH alcalino como único método de purificación.

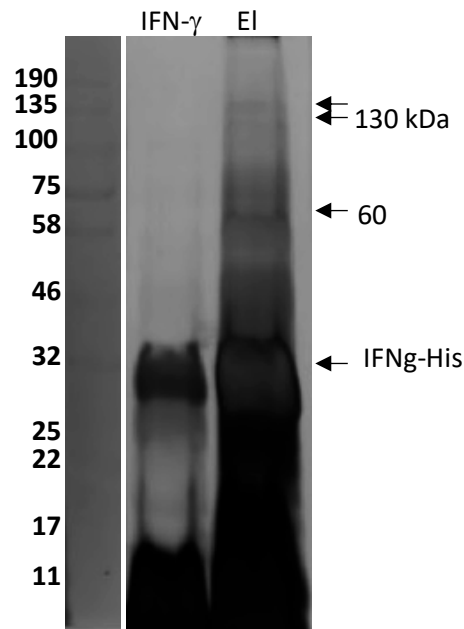


Figura 39. Pull Down para determinar la interacción entre IFN- γ y una proteína de *Toxoplasma*. Los parásitos fueron tratados con octil-glucoído para lisar las membranas y obtener un extracto enriquecido de película. El extracto se pasó por una columna de cromatografía afinidad de sefarosa acoplada a IFN- γ y se eluyó con una concentración creciente de imidazol y octil -glucósido. La fracción obtenida se analizó en SDS-PAGE y se observaron bandas en 130, 60 y 30 kDa aproximadamente.

10.14 ROP17 se detectó por espectrometría de masas en la fracción eluida por cromatografía de afinidad.

La columna de cromatografía de afinidad con IFN- γ acoplado a la sefarosa, fue usada en repetidas ocasiones para obtener la cantidad suficiente de proteína y analizarla por E masas. Se identificaron 452 proteínas las cuales clasificamos de acuerdo con la probable función que cumplen y a su localización (Figura 40). Para estas 452 proteínas, se realizaron análisis bioinformáticos basados en alineamientos con la cadena alfa del receptor para IFN- γ en humanos y con los receptores para IFN- γ de virus, al igual que se realizaron alineamientos con la secuencia hallada de la proteína similar a un receptor en *E. histolytica* y que corresponde a una cinasa de tirosina con un 20 % de identidad con el R α IFN- γ de Humano (Pulido-Ortega et al., 2019). De las proteínas halladas únicamente las proteínas cinasas tenían

similitud con la cinasa de tirosina descrita en *E. histolytica* e interesantemente, de todas las proteínas encontradas, solo la proteína ROP17 presentó cierta similitud 26 % con el RIFN- γ del virus *Vaccinia*.

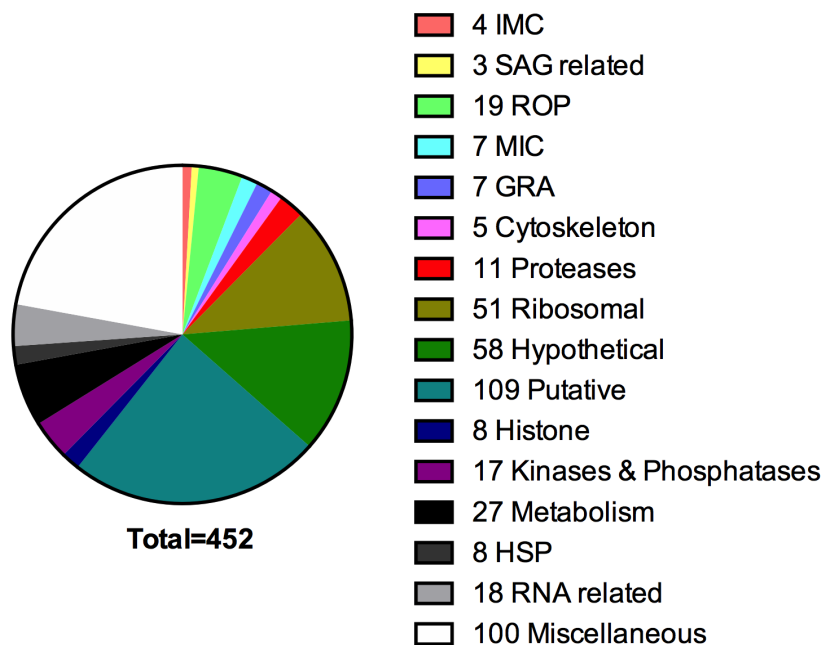


Figura 40. Espectrometría de masas de la fracción eluida por cromatografía de afinidad. La fracción eluida, con pH alcalino, de la columna cromatográfica se corrió en SDS-PAGE y se procesó para E masas. Se encontró un total de 473 proteínas de toda la fracción, las proteínas fueron clasificadas de acuerdo a la localización o probable función de la proteína. ROP17 formó parte de las proteínas halladas.

10.15 ROP17 y el receptor soluble para IFN- γ del virus *Vaccinia* son proteínas que comparten el dominio del RIFN- γ en mamíferos.

La proteína ROP 17 que se detectó en los análisis de masas antes detallados, está catalogada como una proteína cinasa que se encuentra en las roptrías del parásito. Algunas de estas cinasas han asido reportadas por estar involucrada con el enquistamiento de *Toxoplasma* (N. G. Jones et al., 2017) a través de la inactivación de proteínas IRG y GBP que se encuentran en la membrana de la VP evitando que esta pueda se destruida por los lisosomas permitiendo así que se lleve a cabo el enquistamiento de *Toxoplasma*. Con el fin de conocer la similitud

espacial entre ROP17 y la proteína de unión a IFN- γ del virus *Vaccinia*, se realizaron alineamientos en la plataforma del NCBI realizando BLAST protein-protein. Primero se seleccionó la proteína con la que se ejecutaría el Blast, en este primer caso se seleccionó al Receptor de IFN- γ del virus *Vaccinia*, y se seleccionó el organismo contra el que se haría el Blast, *Toxoplasma gondii*, al ejecutarlo en el alineamiento se presentaron dos resultados que corresponden a la proteína ROP17 en dos cepas diferentes, ME49 y TgCatPRC2, ambas con un porcentaje de similitud del 26 %. (Figura 41). En el recuadro rojo con puntillado se observa un dominio putativo conservado del receptor soluble, cuyo dominio coincide con la secuencia de ROP17 que tuvo identidad con el receptor (recuadros amarillos). También se observaron algunos aminoácidos que fueron conservados en ambas secuencias.

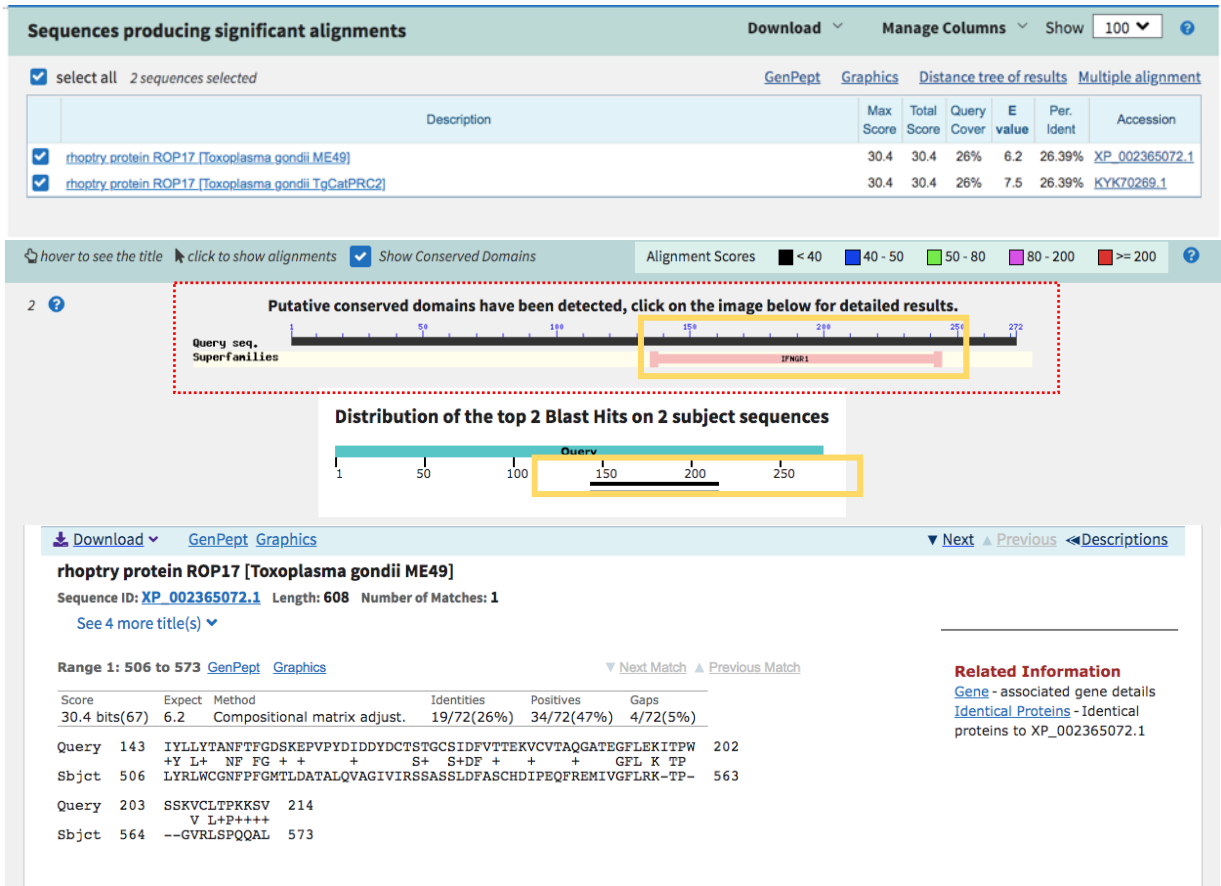


Figura 41. Alineamiento de ROP17 y el RIFN- γ soluble del virus *Vaccinia*. Se tomó la secuencia del virus *Vaccinia* y de nuevo se alineó en el genoma de *Toxoplasma*, se halló que dos proteínas ROP17 de distintas cepas tienen identidad con el receptor del 26 %. Recuadros amarillos muestran la localización de los aminoácidos conservados en el RIFN- γ del virus y el RIFN- γ de mamíferos, y los aminoácidos en donde se halló mayor porcentaje de similitud con el receptor viral. Los recuadros rojos corresponden a la amplificación de la secuencia conservada del virus *Vaccinia*.

Los resultados arrojaron que estas dos proteínas tienen un porcentaje de identidad del 26 %, encontrándose que el sitio conservado del receptor soluble del virus es parecido al RIFN- γ en mamíferos y curiosamente es en este sitio en donde ROP17 conserva aminoácidos con la

secuencia soluble del receptor. Adicionalmente, cuando se realizó un alineamiento más detallado en la plataforma Clustal, que es una herramienta bioinformática que se usa para el alineamiento de secuencias prediciendo su homología, se encontró que el receptor de IFN- γ del virus tiene homología de secuencia con ROP17 y los aminoácidos con mayor similitud están cargados a la región carboxilo terminal, justo en la región donde se encuentra el dominio conservado entre el RIFN- γ del *Vaccinia* y el R1IFN- γ de mamífero (Figura 41 y 42).

En la figura 43, se muestran los aminoácidos del receptor que como se observó en la figura 42 coinciden con el dominio conservado del receptor en mamíferos; los asteriscos marcan alrededor de 40 aminoácidos idénticos entre las dos proteínas además de que muchos otros tienen características similares y aportan cierta identidad entre las proteínas.

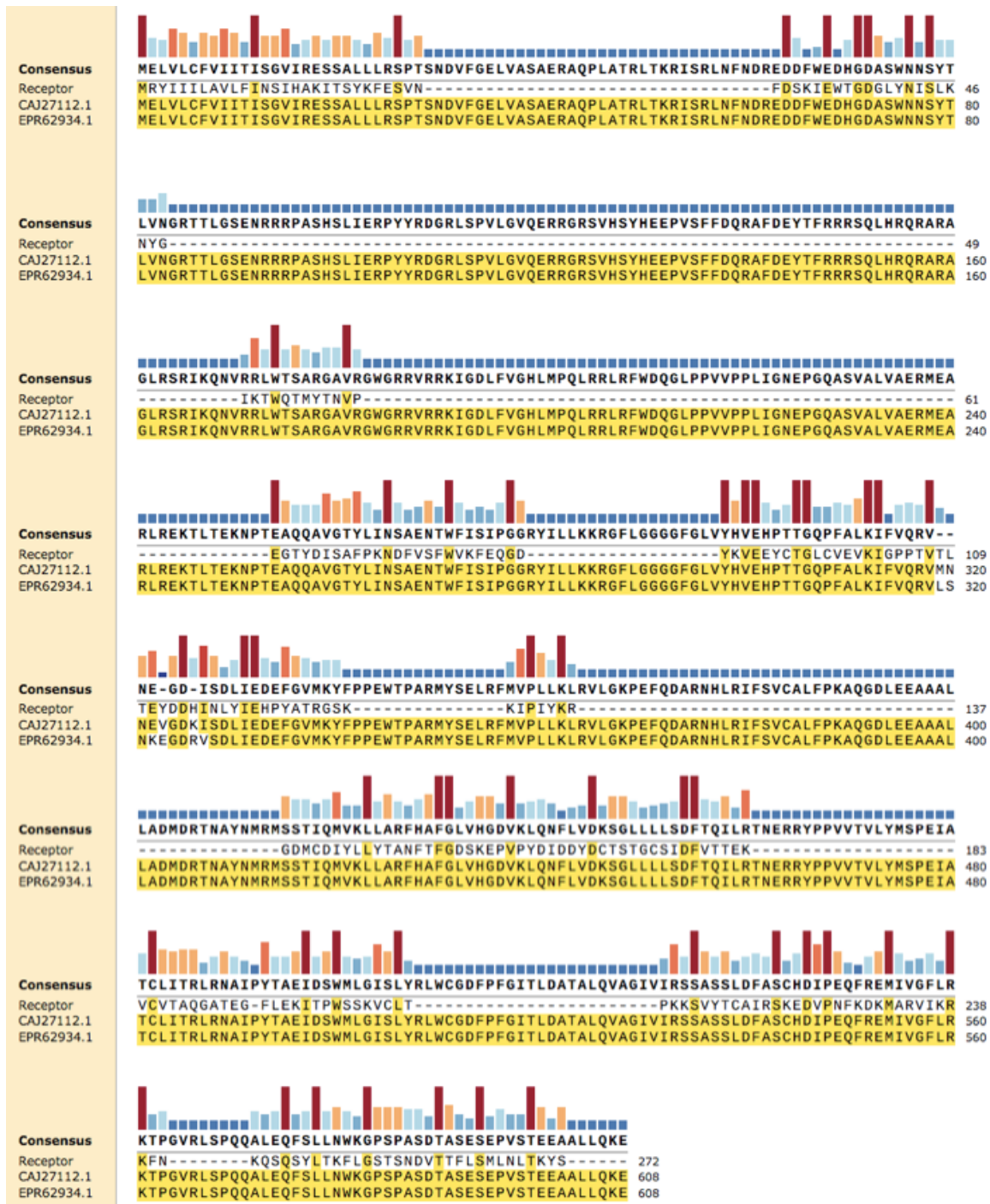


Figura 42. Alineamiento en Clustal de las secuencias de RIFN- γ en *Vaccinia* y ROP17 de *Toxoplasma*. El alineamiento se realizó en la plataforma Clustal tomando las secuencias del receptor soluble del virus *Vaccinia* y ROP17 de *Toxoplasma*. Los aminoácidos resaltados en amarillo corresponden a la secuencia consenso con un umbral del 50%, las barras de

naranja claro a marrón y el alto de cada uno indican la conservación de la secuencia, siendo el color marrón el 100%.

10.16 El modelaje bioinformático predice la interacción entre ROP17 e IFN- γ

Con la finalidad de determinar por métodos bioinformáticos la interacción entre la proteína ROP17 y el IFN- γ humano, se realizó el modelamiento de la estructura terciaria de ROP17 mediante diferentes programas y se analizaron gráficas de Ramachandran para seleccionar la molécula que cumpliera con los parámetros adecuados.

Los programas disponibles para predecir la estructura terciaria de la proteína son: Phyre², RaptorX, SWISS MODEL Y I-TASSER; estos utilizaron como templados las proteínas cristalizadas ROP5C, ROP18 y receptores de cinasas acopladas a proteínas G. Estos programas son los más utilizados y fáciles de usar arrojando resultados que pueden ser analizados con gráficos para determinar la confiabilidad del modelo.

De los distintos programas usados y analizado con los gráficos de Ramachandran, solo dos de ellos, I-TASSER y RaptorX nos permitieron modelar la estructura completa de la proteína ROP17 (Figura 43 A), y probablemente las más acertada de acuerdo con los resultados del análisis con las gráficas, fue el modelo proporcionado por I-TASSER (Figura 43 B). I-TASSER es la plataforma más utilizada para la predicción de estructuras terciarias, esta construye los modelos a partir de estructuras cristalinas molde (Yang & Zhang, 2015).

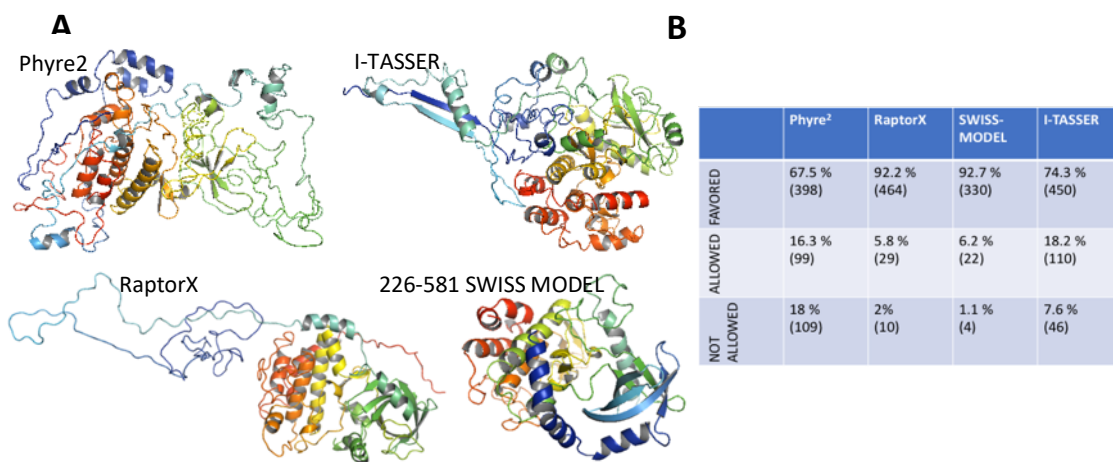


Figura 43. Modelamiento de la proteína ROP17. La secuencia de la proteína se modeló con 4 programas bioinformáticos distintos: Phyre², I-TASSER, RaptorX y SWISS-MODEL,

y estos modelos fueron evaluados con las gráficas de Ramachandan, A) modelos obtenidos con los distintos programas, algunos de ellos solo se obtuvieron parcialmente. B) principales parámetros de las gráficas de Ramachandran con los cuales se evaluaron los modelos predichos.

10.17 IFN- γ interacciona con ROP17

Los ensayos de interacción entre proteínas permiten determinar entre otras cosas, las probabilidades de unión o interacción entre una molécula y otra de acuerdo con las características fisicoquímicas y estructurales de dichas moléculas. Existen muchas plataformas para la predicción de dichas interacciones, unas de ellas es ZDOCK, la cual utiliza el algoritmo Fast Fourier Transform (FFT) para permitir una búsqueda de acoplamiento global eficiente en una cuadrícula 3D, y utiliza una combinación de complementariedad de modelos, electrostática y términos estadísticos potenciales para la puntuación. ZDOCK logra una alta precisión predictiva en los puntos de referencia de acoplamiento proteína-proteína, con > 70 % de éxito (Pierce, Hourai, & Weng, 2011; Pierce et al., 2014).

Por lo anterior utilizamos esta herramienta con la finalidad de determinar si existía alguna probable interacción entre esta molécula ROP17 e IFN- γ .

Nuestro diseño y análisis bioinformático sugiere la existencia de una interacción aparente entre estas dos proteínas (Figura 44 A), observando que ROP17 se une a IFN- γ a través de 21 sitios de contacto, la energía de unión no fue medida en el modelo y desconocemos si las uniones se deben a interacciones por puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas. Además el homodímero de IFN- γ que es la forma fisiológica y como se encuentra habitualmente en el organismo, de acuerdo al modelo, es capaz de unirse con dos moléculas de ROP17 ya que los sitios de unión se encuentran en zonas externas del dímero de IFN- γ y son accesibles para que dos proteínas ROP17 puedan unirse.

Otro dato a destacar es que la unión del IFN- γ con ROP17 es muy parecida a la que mantiene con el R α IFN- γ , es decir, de acuerdo al modelaje, los sitios de unión entre ROP17/ IFN- γ y R α IFN- γ /IFN- γ ocurren aparentemente en las mismas regiones (figura 44 B); por lo que con estos resultados es posible predecir que de la misma forma en que el homodímero del R1IFN-

γ se une a IFN- γ , la molécula ROP17 de acuerdo al modelo podría también formar un homodímero que una al IFN- γ .

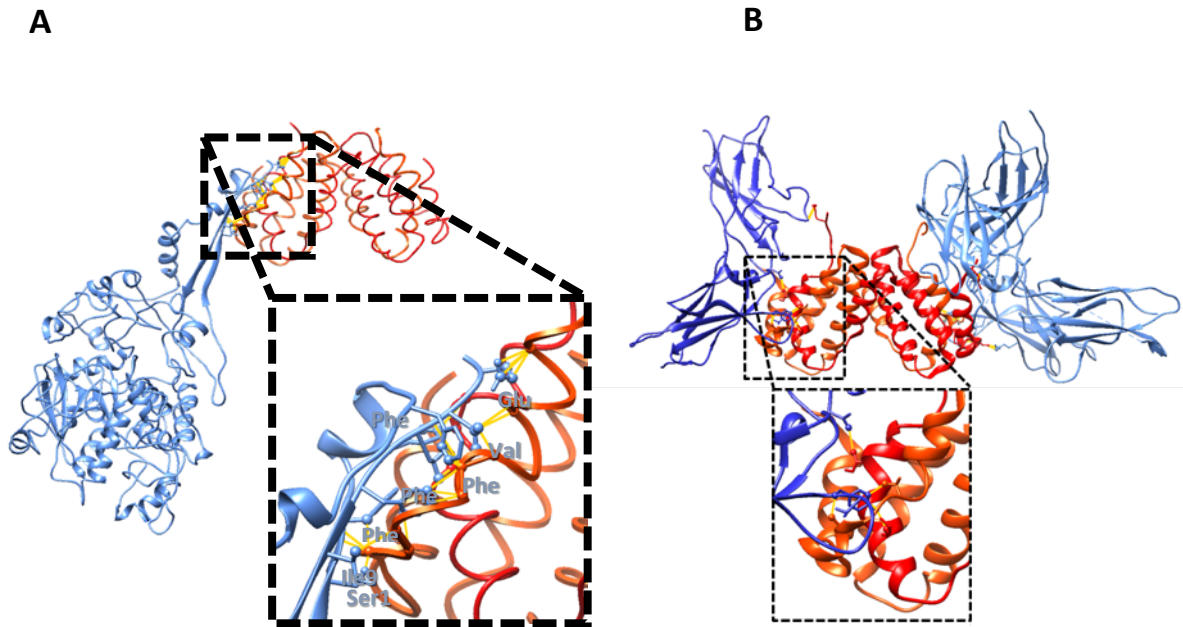
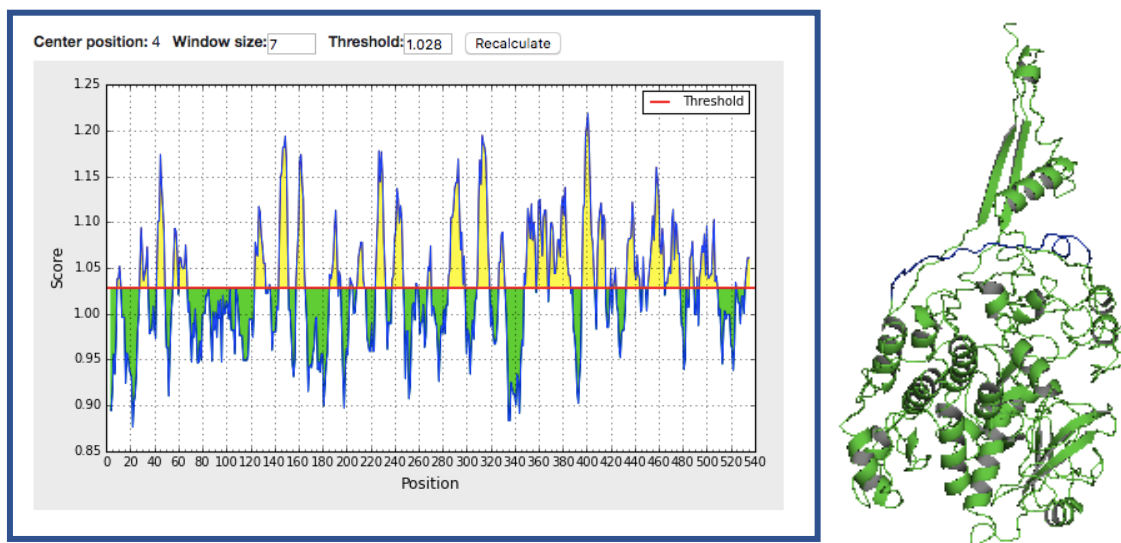


Figura 44. Docking de IFN- γ y ROP17. La secuencia de ROP17 interactuando con IFN- γ . En la imagen se muestra el dímero de IFN- γ que interactúa con varios aminoácidos de la proteína ROP17 de *Toxoplasma*. Las líneas amarillas representan las interacciones entre ambas proteínas.

10.18 Selección de un péptido inmunogénico de la proteína ROP17 para la generación de anticuerpos.

De acuerdo con los resultados observados, la proteína ROP17 es un candidato altamente probable como posible molécula que interactúa con IFN- γ . Con base en lo anterior, se decidió hacer un análisis bioinformático de la proteína ROP17 mediante el uso del software “immune epitope database and analysis resource”, a fin de predecir epítomos inmunogénicos dentro de la estructura secundaria de ROP17 a fin de diseñar péptidos inmunogénicos y accesibles que activaran a células B para la producción de anticuerpos. Los programas que se utilizaron fueron: 1) Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity para determinar la antigenicidad de péptidos y 2) Emini Surface Accessibility Prediction para determinar epítomos accesibles. Se decidió que los péptidos seleccionados fuera tanto accesibles como antigénicos y que estuvieran fuera

del dominio cinasa de la proteína (Figura 45 A, B). Se tomó el modelo obtenido con I-TASSER y se realizó el modelamiento utilizando Pymol. Nuestro objetivo era enfocarnos a la ubicación del péptido inmunogénico, como se muestra en la Figura 45 C, observando que la ubicación del péptido inmunogénico en la estructura terciaria modelada es altamente accesible.



MELVLCFVIITISGVIRESSALLRSPTSNDVFGELVASAERAQPLATRLTKRISRLNFDREDDFWEDHGDAWV
 NSYTLVNGRTTLGSENRRRPASHSLIERPYYRDGRLSPVLGVQERRGRSVHSYHEEPVSFFDQRAFDEYTFRRRS
 QLHRQRARAGLSRIKQNVRRLWRSARGAVGGWGRRVRRKIGDLFVGHLMPLQRRRLRFWDQGLPPVVPPLI
 GNEPGQASVALVAERMEAGLREKALTEKNPTEAQQAVGTYLINS~~A~~ENTWFISSPGGRYILLKRGFLGGGGFG
 LVYHVEHPTTGQPFALKIFVQRMNNEVGDKISDLIEDEFGVMKYFPEWTPARMYSELRFMVPLLKLRVLG
 KPEFQDVRNHLRIYSVCALFPKAQGDLEAVLLADMDRTNAYNIRMSCTIQMVKLLARFHAFELVHGDVKL
 QNFLVDKSGLLLSDFITQILRTNERRYPPVVTVIYMSPEIATCMITRLRNAIPYTPQIDSWMLGISLYRLWCGN
 FPFGMTLDATALQVAGIVIRSSASSLDFASCHDIPEQFREMIVGFLRKTPGVRLSPQQALEQFSLLNWKGPSPA
 SDTASESEPVSTEEAALLQKE

Figura 45. Selección de péptido para la generación de anticuerpos contra ROP17. A) Gráfica que muestra los péptidos con antigenicidad mayor a 1, **B)** Secuencia de aminoácidos de la proteína ROP17, en amarillo son los péptidos catalogados como antigénicos, los péptidos mostrados con rojo son los accesibles, en letras tachadas y en negritas se encuentra el dominio conservado de la proteína y el péptido subrayado fue el seleccionado que según los parámetros cumple con las mejores características de antigenicidad. **C)** Estructura terciaria de ROP17, en rojo se muestra el péptido (Azul) que fue seleccionado para la generación de anticuerpos.

10.19 Los anticuerpos contra ROP17 marcan una banda similar a la encontrada con INF- γ /biotina

El péptido de ROP17 inmunogénico y accesible diseñado por estrategias bioinformáticas, fue sintetizado por la empresa GEN scrip (USA). Este péptido se inoculó en ratones sanos de la cepa BALB/c, con el fin de generar anticuerpos contra la proteína ROP17 de acuerdo al protocolo de inmunización detallado en la sección de “metodos”. Al final de las inmunizaciones, el suero recuperado se evaluó por ELISA, Wb y fluorescencia para evidenciar la presencia de anticuerpos, su título y la localización de la proteína. Cuando se comparó el patrón de reconocimiento por Wb del suero preinmune y del suero inmune de los ratones, se observó un patrón de bandeado inespecífico (Figura 46, llave), que coincide con el presentado por el suero preinmune (SP) del ratón; sin embargo, se detectó una banda específica de aproximadamente 130 kDa en el suero inmune indicando la presencia de anticuerpos contra la molécula ROP17 (Figura 46, flecha).

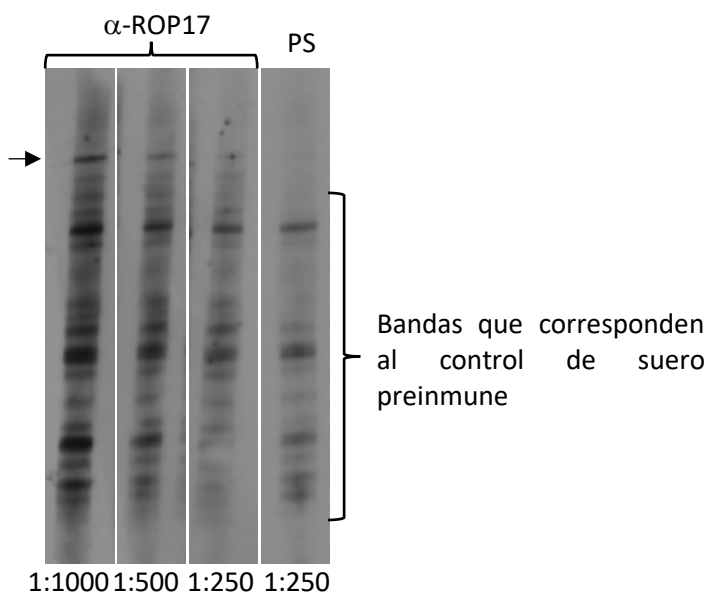


Figura 46. Titulación de anti-ROP17. Se corrió un gel preparativo con extracto total de *Toxoplasma*, la membrana electrotransferida se cortó en tiras y a partir de estas se evaluó el título de anti-ROP17, se utilizaron diluciones 1:250, 1:500 y 1:1000 y el suero preinmune (PS) a 1:250, la flecha indica la banda en 130 kDa que no se observa en el SP.

Posteriormente para evidenciar la marca del anticuerpo, Taquizoítos de *Toxoplasma* extraídos de ratón se fijaron y se permeabilizaron, se colocó el anticuerpo anti-ROP17

observando que este reconocía a una proteína en las roptrías del parásito que se encuentran en la región apical donde también se encuentra el conoide (Figura 47, cabeza de flecha), cabe mencionar que ROP17 es una proteína de las roptrías del parásito, adicionalmente se halló que la marca también se encontraba en lo que aparentemente podría ser la periferia de la membrana (Figura 47, flecha).

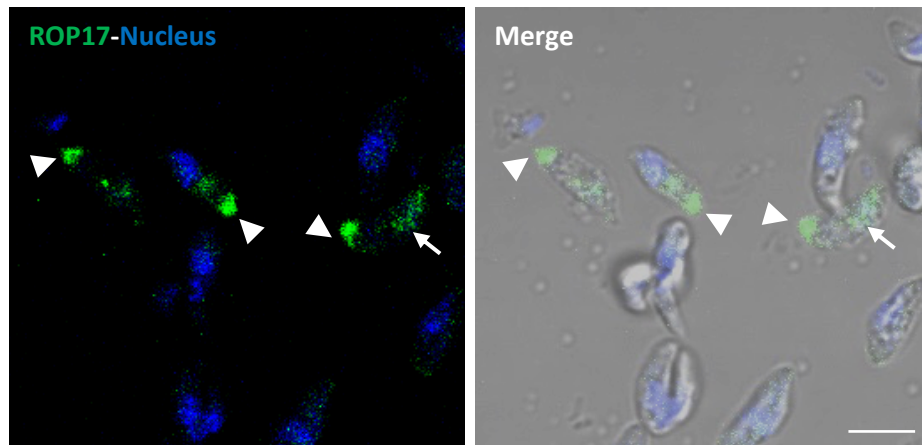


Figura 47. Localización de ROP17 en taquizoítos extracelulares. Imagen de fluorescencia por microscopía confocal de la marca del anticuerpo anti-ROP17 en taquizoítos extracelulares de *Toxoplasma*. Las cabezas de flecha marcan la región apical, donde se encuentra el conoide y las roptrías del parásito y la flecha indica la marca fluorescente en la periferia de *T. gondii*. ROP17=FITC, Núcleo= DAPI y Merge= Contraste de interferencia diferencial + fluorescencia (DIC). Escala = 5 μ m

10.20 La detección con el anticuerpo ROP17 y con IFN- γ biotinilado muestran un patrón de spots similar en geles 2D

Una vez generado y titulado el anticuerpo anti ROP17, se corrieron geles en doble dimensión, los cuales se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo anti-ROP17 y con IFN- γ biotinilado y se revelaron por quimioluminiscencia con ayuda de anticuerpos secundarios y avidina acoplados a HRP, lo anterior con la finalidad de comparar los spots que se reconocen por Wb y FWb. Cuando se usó el anticuerpo para ROP17 se observó un perfil de varios spots (Figura 48 A), este perfil es muy parecido a lo observado en los geles de una dimensión en donde, por debajo de la banda de 130 kDa se observaba un patrón de bandeo que era similar a lo hallado con el suero preinmune; sin embargo, se observa una marca en 130 kDa específica del anticuerpo anti ROP17. En nuestro gel de doble dimensión justo se encontró un triplete de spots en este peso molecular y cuando comparamos con lo hallado en el gel incubado con IFN- γ /biotina se observó la presencia de un patrón de 3 spots en 130 kDa (Figura 48 B) que fue donde inicialmente se observó la banda en los geles de una dimensión. El punto isoeléctrico aparente se encuentra entre el pH 5 y 6. Lo trascendente es que, con dos técnicas y ligandos diferentes, se logró observar un mismo patrón de reconocimiento, la banda de 130 kDa, esto en geles de una y dos dimensiones, y utilizando el IFN- γ / biotina y un anti-ROP17. Estos resultados nos sugieren que muy probablemente se esté reconociendo a la misma proteína con ambas técnicas, en este caso ROP17. Queda pendiente el corte de esos spots e identificación mediante espectrometría de masas que se realizará con el corte de los spots obtenidos a partir de un gel teñido con plata como el que se observa en la figura 48 C en donde se logran ver algunos spots a la misma altura de los hallados en los experimentos anteriores.

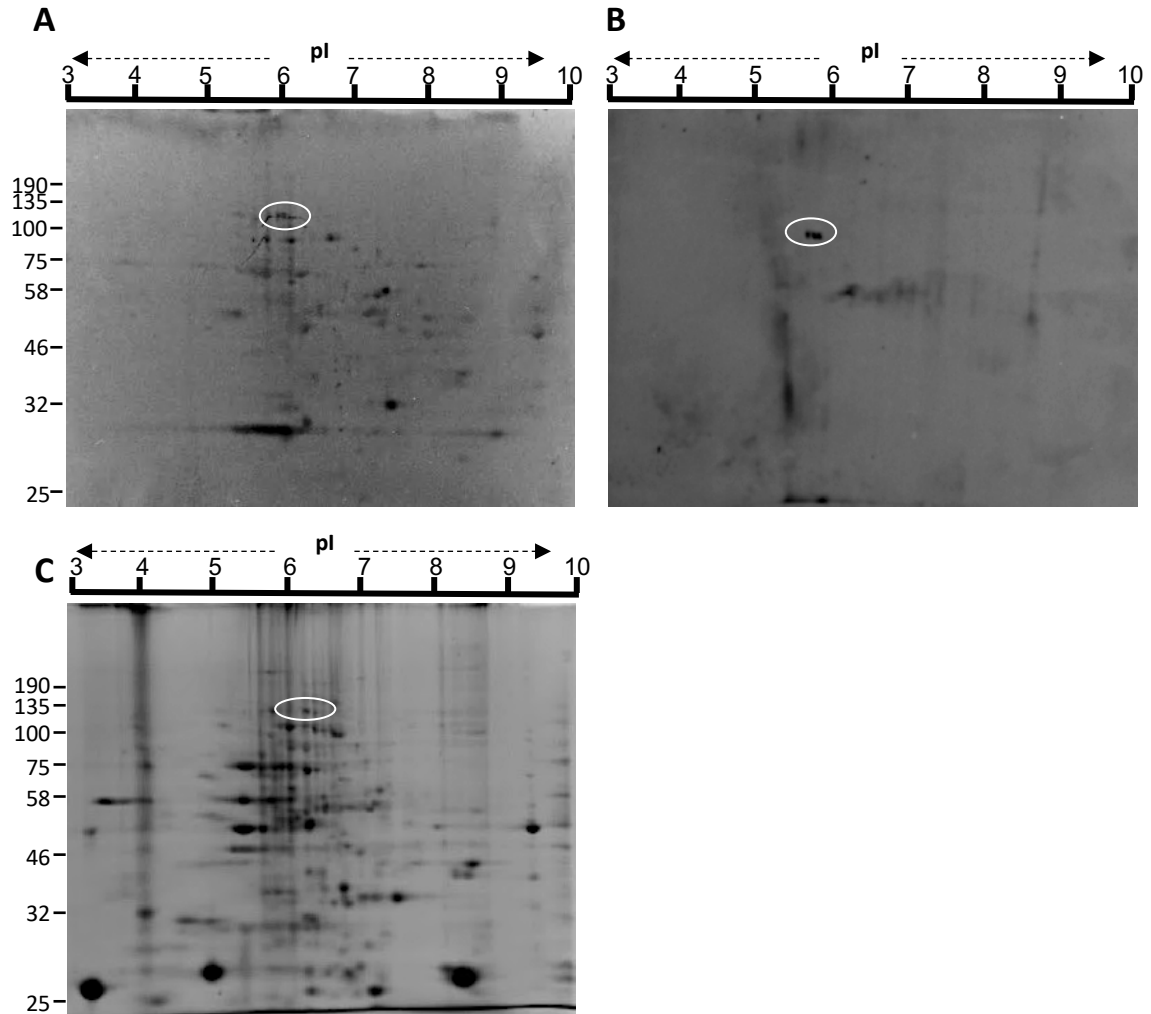


Figura 48. Geles en doble dimensión para determinar la presencia de ROP17. A) Western blot con el anticuerpo de ROP17, B) Far Western blot con IFN- γ / biotina, C) Control de SDS-PAGE del extracto total de taquizoítos teñido con nitrato de plata. El círculo blanco muestra los 3 spots que se hallaron con el anticuerpo ROP17 y con IFN- γ / biotina.

11. Discusión

Toxoplasma gondii, un parásito apicomplexa que invade y prolifera en todo tipo de células nucleadas de mamíferos no acuáticos, es el agente que causa la toxoplasmosis. Este padecimiento en los seres humanos puede producir coriorretinitis, daño en el sistema nervioso central, puede provocar malformaciones en el feto, aborto y en personas inmunocomprometidas, la muerte (Hill & Dubey, 2002; Piao et al., 2018).

La tercera parte de la población mundial se encuentra infectada por este parásito (Esch & Petersen, 2013; Moncada & Montoya, 2012), por lo que se le considera un importante patógeno oportunista; el consumo de alimentos contaminados con esporozoitos y la ingestión de carne mal cocida contaminada con quistes tisulares, son las principales formas de transmisión del parásito.

Cuando *Toxoplasma* se encuentra dentro del organismo infectado, es capaz de proliferar dentro de todas las células nucleadas (English & Striepen, 2019) y cuando este es atacado por el sistema inmune del hospedero se diferencia generando quistes en los tejidos. Estos quistes lo protegen contra el embate de la respuesta inmune y contra la acción de fármacos antixoplásmicos asegurando así la supervivencia del parásito y la transmisión entre las especies, es por esto que es considerado uno de los parásitos más exitosos (Hunter & Sibley, 2012). Por lo anterior el estudio del enquistamiento del parásito juega un papel muy importante para entender los mecanismos a través de los cuales *Toxoplasma* es capaz de prevalecer y ser un importante patógeno hasta nuestros días.

Para poder estudiar el proceso de enquistamiento, así como para obtener quistes en gran cantidad para diversos estudios y determinar la presencia de una molécula de unión a IFN- γ en *Toxoplasma*, fue necesaria la síntesis de IFN- γ recombinante, este nos permitió tener la suficiente cantidad de citocina para todos los ensayos posteriores, la síntesis de este con un nuevo método de ensamble en ausencia de ligasas disminuyó el tiempo de generación del IFN- γ recombinante y nos permitió tener la cantidad suficiente para completar nuestra estrategia experimental, en primer lugar la inducción del esquistamiento del parásito.

El enquistamiento del parásito se ha logrado inducir *in vitro* utilizando fármacos y métodos de estrés que condicionan la supervivencia de *T. gondii*; también se han utilizado citocinas como TNF- α e IFN- γ para inducir el enquistamiento (Sullivan & Jeffers, 2012), sin embargo, solo se ha logrado inducir en ciertas células y con cepas cistogénicas como la cepa tipo II

(Bohne et al., 1993). A la fecha, aún se desconocen los mecanismos que disparan el enquistamiento del parásito a nivel fisiológico; en algunos trabajos se ha sugerido que la respuesta inmune tiene como consecuencia la inducción de laIDO e iNOS que provocan el estrés por inanición en los parásitos y su posterior enquistamiento (Sullivan & Jeffers, 2012). Estas enzimas se inducen cuando IFN- γ se une a su receptor, pero aún no está claro cómo se lleva a cabo el enquistamiento en aquellas células que no poseen un receptor para la citocina. En nuestro laboratorio en los ensayos reportados por Ospina Riaño (Ospina Riaño, 2015), se realizó la caracterización de los efectos de IFN- γ en cultivos celulares invadidos con taquizoítos de la cepa RH, observando que estos al cabo de 6 h comenzaban a secretar la glicoproteína CST1. Esta glicoproteína conforme pasaba el tiempo se observaba confinada alrededor de la VP formada por *T. gondii* al invadir a la célula. Es importante recordar que esta proteína es propia de la pared de los quistes tisulares y es un marcador de enquistamiento o diferenciación de *Toxoplasma* al pasar del estadio de taquizoíto a bradizoíto (Zhang, Halonen, Ma, Wittner, & Weiss, 2001). En los tiempos evaluados desde 6 hasta 72 h se observó un aumento en la expresión de la glicoproteína CST1 lo cual representaba la progresión del enquistamiento del parásito. En este evento, se encontró que la expresión de SAG1 disminuía paulatinamente a la vez que la expresión de BAG1 se incrementaba en el citoplasma de los parásitos, corroborándose así que el proceso de diferenciación del parásito estaba activo. Estos ensayos demostraron que el IFN- γ inducía la conversión de estadio de una cepa que ha sido considerada en la bibliografía como no cistogénica de *Toxoplasma* (Ospina Riaño, 2015); sin embargo, no estaba claro si esto lo hacía a través de un receptor para IFN- γ en la célula hospedera o si lo hacía a través de una interacción directa entre el IFN- γ y un receptor en *Toxoplasma*. En un reporte previo se indicó que cuando IFN- γ se une a su receptor de membrana en células de mamífero infectadas por *Toxoplasma*, se encienden mecanismos que provocan estrés en el parásito por inanición de aminoácidos o por estrés oxidativo (Yarovinsky, 2014). Estudios recientes han evaluado el papel de las proteínas ROP en la respuesta inmune y en el proceso de enquistamiento en donde IFN- γ juega un papel importante a través de la inducción de los IRG fuertemente inducidos por la citocina (Etheridge et al., 2014; N. G. Jones et al., 2017; Li et al., 2019; Pittman & Knoll, 2015). Estos IRG una vez expresados y transportados a la periferia de la VP, son inactivados por las proteínas ROP5, ROP18 y ROP17 permitiendo la supervivencia del parásito (Etheridge et

al., 2014). Además, algunas proteínas ROP regulan la carga de quistes hallados después de la infección (N. G. Jones et al., 2017), lo cual determinaría la prevalencia de *Toxoplasma* durante la vida del organismo infectado. Cabe resaltar, que estas proteínas ROP se activan en respuesta a IFN- γ , sin embargo, aún se desconoce el mecanismo a través del cual sucede, lo mismo ocurre con el enquistamiento, aún se desconoce si sucede por la unión del IFN- γ a su receptor en las células o si el IFN- γ actúa directamente sobre el parásito. Un aspecto muy interesante es que *Toxoplasma* puede invadir todas las células nucleadas y formar quistes en su interior, pero no todas las células expresan un receptor (Valente et al., 1992).

El IFN- γ es una citocina que se libera a consecuencia de la respuesta celular Th1 que es la primera línea de defensa de las células ante la infección por diversos patógenos incluyendo *Toxoplasma* (Lopez-Yglesias, Camanzo, Martin, Araujo, & Yarovinsky, 2019). Esta citocina se ha relacionado en el proceso de enquistamiento de *T. gondii* pero los mecanismos son poco claros (Sullivan & Jeffers, 2012). En las células que no poseen un receptor para la citocina, *Toxoplasma* podría tener la capacidad de censarla cuando se encuentra a nivel extracelular y así disparar los procesos de diferenciación.

La presencia de moléculas receptoras para ligandos propios del organismo con diversas funciones biológicas han sido reportadas previamente en diversos parásitos como *Trypanosoma*, *Trichomonas* y *Entamoeba* parásitos en los cuales se han encontrado receptores para moléculas fisiológicas como la fibronectina (Franco et al., 2002; Talamas-Rohana et al., 1992; Velge et al., 1988). Recientemente se demostró que *Entamoeba* también posee una molécula de unión para INF- γ que al ser activado provoca cambios celulares que participan en la progresión de la amibiasis (Pulido-Ortega et al., 2019). Similarmente, otros agentes patógenos de tipo viral como *Vaccinia* y *Myxoma*, poseen genes que codifican proteínas de unión a citocinas como TNF- α e IFN- γ aunque su función particular permanece aún sin determinarse (Lalani et al., 1997; Lalani & McFadden, 1997; Symons et al., 2002). En el caso del INF- γ , existe un receptor viral soluble el cual se ha propuesto, cumple su función a nivel extracelular uniendo a las moléculas de IFN- γ presentes en el medio, provocando así que la infección viral progrese debido a que el IFN- γ secuestrado por la proteína viral no tiene capacidad de unirse a su receptor en las células infectadas y por lo tanto no se inicia una respuesta inmune efectiva antiviral (Alcami & Smith, 1996a).

Con base en el hecho de que el enquistamiento ocurre en células infectadas que expresan o no el receptor para IFN- γ , se propuso la posibilidad que el mismo parásito pudiera unir directamente a la citocina y activarse para llevar a cabo el proceso de enquistamiento y de esta forma poder hacerlo en todos los estirpes celulares de nuestro organismo independientemente si expresan o no el receptor para IFN- γ . Cuando la célula infectada expresa receptores para IFN- γ , se esperaría que entraran en juego dos procesos bioquímicos, uno el activado en la célula de mamífero y otro en el propio parásito, ambos conducirían entre otras cosas al estrés nutricional u oxidativo para la activación del proceso de enquistamiento.

Efectivamente, observamos que al exponer a los parásitos al IFN- γ seguido de un exhaustivo lavado para eliminar cualquier rastro de IFN- γ , y posterior a la invasión, se inicia un proceso de proliferación y posteriormente de diferenciación en estructuras con propiedades de quistes tisulares. Este proceso se observó desde las 6 h de proliferación intracelular mediante la detección de ciertos marcadores de cistogénesis como fueron la expresión de la glicoproteína CST1 con ubicación en la membrana de la VP, la expresión de BAG1 en el parásito y la desaparición paulatina de la marca de SAG1. Junto con esta expresión diferencial de moléculas, las VPs adquirieron morfologías redondeadas que denominamos “prequistes” a partir de las 48 h, conteniendo un limitado número de parásitos lo que sugiere la disminución en la proliferación. En resultados de nuestro laboratorio usando ácido micolfenólico como inductor de la cistogénesis, se observaron resultados similares tanto en la expresión diferencial de moléculas como en los cambios morfológicos y de proliferación parasitaria (Castro-Elizalde et al., 2018).

Cuando se evaluó si el tiempo de exposición del parásito extracelular al IFN- γ influía en el número de estructuras quísticas encontradas a las 72 h, se encontró una diferencia significativa en el número de prequistes entre los parásitos expuestos por 30 min a la citocina que los expuestos por 4 h, hallando más estructuras quísticas a 4 h de la evaluación. En contraste, los parásitos mantenidos por 4 h en PBS, presentaron un nivel basal de enquistamiento, por lo que muy probablemente el IFN- γ fue la molécula que disparó el proceso de cistogénesis en *T. gondii*. Cuando se incubaron los parásitos con concentraciones crecientes de IFN- γ y se evaluó el enquistamiento en el transcurso del tiempo, se observó que no había una dependencia entre el porcentaje de enquistamiento y las concentraciones de

IFN- γ usadas, pero si se compara la concentración más baja con las dos concentraciones más altas se observa una diferencia evidente, en forma similar a lo reportado por Ospina-Riaño (Riaño, 2015), por lo que de acuerdo a nuestros resultados y con base en la literatura usamos 500 U/ml (Yin et al., 2015). Por otra parte, se observó que después de la inducción con IFN- γ , la expresión de CST1 iba en aumento con respecto al tiempo y la VP adquiría una forma redondeada además, la proliferación de *Toxoplasma* disminuyó a las 72 h en comparación con aquellos cultivos en donde el parásito no se había incubado con IFN- γ . Esta disminución de la proliferación durante el enquistamiento ya había sido previamente reportada (Dimier & Bout, 1997), y se ha sugerido que cuando comienza a diferenciarse el parásito, se disminuye su capacidad para dividirse debido a que ralentiza su metabolismo a consecuencia de la poca capacidad que este tiene de adquirir nutrientes una vez dentro de la estructura quística (Tomavo, 2001). Cuando evaluamos la diferenciación del parásito, pero ahora usando un anticuerpo para SAG1 y evaluando CST1 vimos que la diferenciación del *Toxoplasma* ocurría primero con la expresión y secreción de CST1 hacia la membrana de la VP en las primeras 6 h de proliferación y fue hasta las 48 h cuando la expresión de SAG1 comenzó a disminuir siendo a las 72 h ya indetectable corroborándose así la diferenciación de *T. gondii*. En un reporte previo se evaluó la capacidad del IFN- γ para inducir la diferenciación de *Toxoplasma* aparentemente a través de la unión de la citocina a su receptor en la membrana de las células hospederas (Yarovinsky, 2014). Sin embargo, tal y como se ha descrito en el presente trabajo, se demostró que la citocina era capaz de inducir, por interacción directa con el parásito, el proceso de cistogénesis, lo cual se demostró al interaccionar parásitos con IFN- γ biotinilado con los parásitos y evidenciar la unión por marcaje fluorescente con avidina fluoresceinada, encontrándose la marca ubicada en la membrana plasmática del parásito pero en forma de agregados o parches superficiales discontinuos. Este marcaje se facilitó por la afinidad de la biotina hacia la avidina, la cual es más grande que la de un antígeno por su anticuerpo (Delgadillo et al., 2019). La unión intermolecular fue estable, tal y como se demostró por el ensayo de FWb, encontrándose una única banda de 130 kDa aproximadamente, y que se mantuvo en geles de una y dos dimensiones. Cuando la banda en una dimensión se escindió del gel y se analizó por E. masas, se encontró un gran número de proteínas, pero entre ellas, interesantemente estaba la proteína ROP17, la cual mediante análisis bioinformático se encontró que tiene un 26 % de identidad con el RIFN- γ soluble del

virus *Vaccinia*. Esta proteína ROP17 se ha reportado como una cinasa ubicada en las roptrías del parásito y que aparentemente el parásito la secreta en respuesta a IFN- γ (Etheridge et al., 2014); sin embargo, el mecanismo a través del cual lo hace aún no ha sido estudiado. Se sabe que ROP17 al igual que ROP18 y ROP5 fosforilan a las proteínas IRG o GBP que se encuentran alrededor de la VP evitando la fusión de esta con los fagolisosomas (Etheridge et al., 2014). Por otro lado, hay reportes que indican que otra proteína, la ROP27 interviene en la carga de quistes hallados en cultivo celular pero no se sabe a través de qué mecanismo lo realiza (N. G. Jones et al., 2017). Con base en lo anterior, se puede decir que las proteínas ROP guardan estrecha relación entre lo que ocurre durante la respuesta inmune y la autodefensa y enquistamiento del parásito. Cabe resaltar, que estas proteínas poseen dominios cinasa que además de participar en el enquistamiento, también lo hacen en la internalización del parásito en la célula blanco y la biogénesis de la VP actuando así como factores de virulencia (Peixoto et al., 2010). De acuerdo con los ensayos de docking hechos con ROP17 e IFN- γ , se encontró que las proteínas interactúan mediante enlaces débiles mostrando que el dímero de IFN- γ puede unirse a dos moléculas de ROP17 por lo que esta proteína podría incluso formar un dímero como el R1IFN- γ de mamíferos; sin embargo, a la fecha no hay ningún reporte que mencione que ROP17 tiene la capacidad de formar dímeros. Cuando se montó la cromatografía de afinidad para purificar el receptor, se detectó en los geles teñidos con plata, que aparecían de manera frecuente una banda de 60 kDa y una banda tenue de 130 kDa, esta banda de 60 kDa coincide con el peso molecular teórico de ROP17. Cuando se realizó el Wb para determinar si las proteínas aisladas por cromatografía tenían la capacidad de unir a IFN- γ , no se pudo observar marca, esto bajo ningún método probado, con lo cual llegamos a la conclusión de que probablemente las condiciones de astringencia usadas para la elución de alguna manera modificaban los probables sitios de unión de IFN- γ hacia ROP17. El extracto eluido de varias columnas usando pH básico lo analizamos por espectrometría de masas y encontramos un porcentaje de proteínas muy similar a lo hallado en la banda analizada, interesantemente encontramos que también estaba presente ROP17 por lo que muy probablemente esta haya sido la proteína que en forma de dímero es capaz de unir IFN- γ y en la elución de la columna de afinidad aparece como dos bandas, una muy abundante de 60 kDa y otra de 130 kDa aproximadamente. Para asegurarnos que ROP17 es la proteína que une al IFN- γ , se corrieron geles de doble dimensión y se hicieron ensayos de

Wb con el anticuerpo policlonal contra el péptido de ROP17 e IFN- γ /biotina ambas moléculas obtenidas y diseñada respectivamente en el presente trabajo, también realizamos un ensayo de inmunofluorescencia con taquizoitos extracelulares utilizando el anticuerpo anti-ROP17. El Wb en extractos totales de taquizoitos usando el anticuerpo anti-ROP17, mostró una clara banda de 130 kDa no obstante había un fondo inespecífico que se pudo excluir considerando el fondo del control negativo con el suero preimmune. Esta banda de 130 kDa es aparentemente la misma que la detectada con FWb usando el IFN- γ acoplado a biotina. Cuando se probó el anticuerpo anti-ROP17 o el IFN- γ acoplado a biotina en geles de doble dimensión, en ambos se marcaron 3 spots en el peso de 130 kDa. Además, por inmunofluorescencia confirmamos que el anticuerpo reconoce a ROP17 una proteína de las roptrias, ya que la fluorescencia se encuentra confinada en la región apical del parásito y en pequeños parches de la membrana del parásito; sin embargo, este dato se tiene que corroborar por otra técnica de microscópica como inmunoelectromicroscopía.

Con base en nuestros resultados y en los reportes científicos, se propone que ROP17 además de participar en mantener la integridad de la VP puede ser la proteína que una al IFN- γ y de ahí se inicie el señalamiento transduccional para el proceso de enquistamiento. Asimismo, y de acuerdo con los ensayos ya realizados, esta molécula de roptrias es secretada ya que se encontró más abundante en el sobrenadante que en la fracción de película del parásito. Este proceso de secreción podría darse mediante capping y es por esto que la marca fluorescente se observa muy escasa, además ROP17 al estar en la membrana de los parásitos puede actuar como receptor para IFN- γ y activar la cascada de señalización que tiene como fin el enquistamiento del parásito. Esto se sustenta adicionalmente, ya que se encontró que la proteína STAT-P que no está aún reportada en el genoma de *Toxoplasma*, fue reconocida cuando se utilizó un anticuerpo comercial contra esta (Figura de pSTAT en anexo). Por lo que tenemos evidencia para determinar que *Toxoplasma*, además de tener una proteína (ROP17) que pueda censar al IFN- γ , también podría contar con una maquinaria de señalización parecida a la hallada en mamíferos (Figura de pSTAT en anexo). Vale la pena mencionar que STAT en mamíferos es una proteína de suma importancia en la señalización de IFN- γ (Platanias, 2005), y si está presente en *Toxoplasma* es un importante indicio de que en el parásito podría señalar ante el estímulo por la citocina.

Por lo anterior, si ROP17 tiene la capacidad de unir IFN- γ y como se ha demostrado en algunos estudios, en donde su depleción provoca el alargamiento de la vida en ratones (Li et al., 2019), entonces probablemente esta molécula podría ser de gran interés para realizar ensayos de edición genética tipo CRISPR-Cas9 a fin de eliminarla de *Toxoplasma* y determinar si en estas condiciones esa cepa KO no podría censar la citocina y por ende evaluar su transcendencia en el proceso de enquistamiento.

12. Conclusiones

Los parásitos detectan la presencia del IFN- γ a través de una proteína de membrana, esta proteína puede ser la responsable de la inducción del enquistamiento en *Toxoplasma*, induciendo la expresión de proteínas propias del estadio de bradizoíto como es el caso de la proteína de pared quística CST1. Por otra parte, el tratamiento de los parásitos extracelulares con la citocina reduce la proliferación del parásito, lo cual está relacionado con la etapa de enquistamiento de *Toxoplasma*. La citocina no es capaz de afectar la extrusión del conoide del parásito ni la invasión de este por lo que está no está involucrada en los eventos invasivos del parásito.

Empleando distintos métodos de purificación de la proteína que une a IFN- γ en *Toxoplasma* se halló una proteína ROP17 que tiene similitud con un receptor soluble que une IFN- γ codificado por una familia de virus, esta proteína hace docking con el IFN- γ humano y cuando es detectada por anticuerpos policlonales y en condiciones no reductoras, ROP17 tiene un peso de 130 kDa el mismo que se reporta en los ensayos de Far Western blot. En la literatura se ha reportado que ROP17 es una proteína que en respuesta a IFN- γ fosforila residuos conservados en las proteínas IRG; sin embargo, el mecanismo por el cual *Toxoplasma* induce la secreción de estas proteínas no está descrito y menos se sabe si este puede censar la presencia de IFN- γ y cuáles son las implicaciones en el desarrollo de la Toxoplasmosis, la propuesta de nuestro trabajo responde al cuestionamiento sobre si *Toxoplasma* tiene una proteína de unión a IFN- γ ya que por varias estrategias se observó que es capaz de censar a la citocina.

Además, en este proyecto se logró realizar por vez primera la caracterización del proteoma del aislado de películo encontrándose varias proteínas nuevas no descritas a la fecha.

13. Perspectivas

Realizar ensayos de inmunoelectromicroscopía de ROP17 en *Toxoplasma*.

Corroborar la expresión de STAT en *Toxoplasma* y determinar su papel en el enquistamiento del parásito o en alguna cascada de señalización.

Determinar la localización de ROP17 en ausencia y presencia de IFN- γ .

Determinar si la delección del gen de ROP17 afecta en la formación de quistes de *Toxoplasma gondii*, y estudiar si la presencia de la proteína es determinante en la formación de quistes de los 3 diferentes linajes clonotípicos.

Estudiar si la delección de ROP17 afecta en la proliferación, invasión y egreso de *Toxoplasma*, además de caracterizar fenotípicamente la untraestructura de la cepa KO.

Determinar la cascada de señalización, de la proteína de unión en *Toxoplasma*, en la formación de quistes del parásito.

Sintetizar ROP17 recombinante y sintetizar nuevos anticuerpos policlonales y monoclonales. Con ROP17 recombinante, determinar la afinidad de unión a IFN- γ .

14. Bibliografía

- Alcami, A., & Smith, G. L. (1996a). Receptors for gamma-interferon encoded by poxviruses: implications for the unknown origin of vaccinia virus. *Trends Microbiol*, 4(8), 321-326. doi:10.1016/0966-842x(96)10051-2
- Alcami, A., & Smith, G. L. (1996b). Soluble interferon-gamma receptors encoded by poxviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 19(4), 305-317. doi:10.1016/0147-9571(96)00013-6
- Alcami, A., & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus soluble interferon-gamma receptor is a homodimer. *J Gen Virol*, 83(Pt 3), 545-549. doi:10.1099/0022-1317-83-3-545
- Alvarado-Esquivel, C., Sanchez-Anguiano, L. F., Hernandez-Tinoco, J., Ramos-Nevarez, A., Estrada-Martinez, S., Cerrillo-Soto, S. M., . . . Beristain-Garcia, I. (2018). Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion: a case-control seroprevalence study. *J Int Med Res*, 46(4), 1626-1633. doi:10.1177/0300060518757928
- Bach, E. A., Aguet, M., & Schreiber, R. D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, 15, 563-591. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.563
- Barragan, A., Brossier, F., & Sibley, L. D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol*, 7(4), 561-568. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x
- Bayer, E. A., & Wilchek, M. (1980). The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal*, 26, 1-45. doi:10.1002/9780470110461.ch1
- Bell, M. R., Engleka, M. J., Malik, A., & Strickler, J. E. (2013). To fuse or not to fuse: what is your purpose? *Protein Sci*, 22(11), 1466-1477. doi:10.1002/pro.2356
- Black, M. W., & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(3), 607-623. doi:10.1128/mmbr.64.3.607-623.2000
- Bohne, W., Heesemann, J., & Gross, U. (1993). Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun*, 61(3), 1141-1145.

- Bohne, W., Heesemann, J., & Gross, U. (1994). Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun*, 62(5), 1761-1767.
- Bohne, W., Holpert, M., & Gross, U. (1999). Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology*, 201(2), 248-254. doi:10.1016/S0171-2985(99)80065-5
- Boothroyd, J. C., Black, M., Bonnefoy, S., Hehl, A., Knoll, L. J., Manger, I. D., . . . Tomavo, S. (1997). Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352(1359), 1347-1354. doi:10.1098/rstb.1997.0119
- Boothroyd, J. C., & Grigg, M. E. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol*, 5(4), 438-442.
- Butcher, B. A., & Denkers, E. Y. (2002). Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect Immun*, 70(9), 5216-5224. doi:10.1128/iai.70.9.5216-5224.2002
- Buzoni-Gatel, D., Schulthess, J., Menard, L. C., & Kasper, L. H. (2006). Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol*, 8(4), 535-544. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00692.x
- Calderon, J., Sheehan, K. C., Chance, C., Thomas, M. L., & Schreiber, R. D. (1988). Purification and characterization of the human interferon-gamma receptor from placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(13), 4837-4841. doi:10.1073/pnas.85.13.4837
- Castro-Elizalde, K. N., Hernandez-Contreras, P., Ramirez-Flores, C. J., Gonzalez-Pozos, S., Gomez de Leon, C. T., Mondragon-Castelan, M., & Mondragon-Flores, R. (2018). Mycophenolic acid induces differentiation of *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites into bradyzoites and formation of cyst-like structure in vitro. *Parasitol Res*, 117(2), 547-563. doi:10.1007/s00436-017-5738-x
- Celada, A., & Schreiber, R. D. (1987). Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J Immunol*, 139(1), 147-153.

- Chardes, T., Velge-Roussel, F., Mevelec, P., Mevelec, M. N., Buzoni-Gatel, D., & Bout, D. (1993). Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunology*, *78*(3), 421-429.
- Chen, A. L., Kim, E. W., Toh, J. Y., Vashisht, A. A., Rashoff, A. Q., Van, C., . . . Bradley, P. J. (2015). Novel components of the *Toxoplasma* inner membrane complex revealed by BioID. *MBio*, *6*(1), e02357-02314. doi:10.1128/mBio.02357-14
- Choudhury, G. G. (2004). A linear signal transduction pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase Cepsilon, and MAPK in mesangial cells regulates interferon-gamma-induced STAT1alpha transcriptional activation. *J Biol Chem*, *279*(26), 27399-27409. doi:10.1074/jbc.M403530200
- Collingridge, P. W., Brown, R. W., & Ginger, M. L. (2010). Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology*, *137*(9), 1467-1475. doi:10.1017/S0031182010000259
- Courret, N., Darce, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gatel, D., & Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*, *107*(1), 309-316. doi:10.1182/blood-2005-02-0666
- Dando, C., Schroeder, E. R., Hunsaker, L. A., Deck, L. M., Royer, R. E., Zhou, X., . . . Vander Jagt, D. L. (2001). The kinetic properties and sensitivities to inhibitors of lactate dehydrogenases (LDH1 and LDH2) from *Toxoplasma gondii*: comparisons with pLDH from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, *118*(1), 23-32. doi:10.1016/s0166-6851(01)00360-7
- Daubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K. S., & Schrotten, H. (2001). Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*, *69*(10), 6527-6531. doi:10.1128/IAI.69.10.6527-6531.2001
- David, M., Grimley, P. M., Finbloom, D. S., & Larner, A. C. (1993). A nuclear tyrosine phosphatase downregulates interferon-induced gene expression. *Mol Cell Biol*, *13*(12), 7515-7521. doi:10.1128/mcb.13.12.7515

- de Moura, L., Bahia-Oliveira, L. M., Wada, M. Y., Jones, J. L., Tuboi, S. H., Carmo, E. H., . . . Garrett, D. O. (2006). Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*, *12*(2), 326-329. doi:10.3201/eid1202.041115
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M. A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M. G., . . . Schwarz, R. T. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, *179*(2), 1129-1137. doi:10.4049/jimmunol.179.2.1129
- Del Carmen, M. G., Mondragon, M., Gonzalez, S., & Mondragon, R. (2009). Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol*, *11*(6), 967-982. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01304.x
- Delgadillo, R. F., Mueser, T. C., Zaleta-Rivera, K., Carnes, K. A., Gonzalez-Valdez, J., & Parkhurst, L. J. (2019). Detailed characterization of the solution kinetics and thermodynamics of biotin, biocytin and HABA binding to avidin and streptavidin. *PLoS One*, *14*(2), e0204194. doi:10.1371/journal.pone.0204194
- Diaz-Valencia, J. D., Perez-Yepe, E. A., Ayala-Sumuano, J. T., Franco, E., & Meza, I. (2015). A surface membrane protein of *Entamoeba histolytica* functions as a receptor for human chemokine IL-8: its role in the attraction of trophozoites to inflammation sites. *Int J Parasitol*, *45*(14), 915-923. doi:10.1016/j.ijpara.2015.07.007
- Dimier, I. H., & Bout, D. T. (1997). Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN-gamma-activated human intestinal epithelial cells. *Immunol Cell Biol*, *75*(5), 511-514. doi:10.1038/icb.1997.80
- Dubey, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, *39*(8), 877-882. doi:10.1016/j.ijpara.2009.01.005
- 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. *Clin Microbiol Rev*, *11*(2), 267-299.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol*, *34*(6), 793-813. doi:10.1007/s00281-012-0339-3
- Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O., & Tomavo, S. (2001). Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and

- antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol*, 309(5), 1017-1027. doi:10.1006/jmbi.2001.4730
- English, E. D., & Striepen, B. (2019). The cat is out of the bag: How parasites know their hosts. *PLoS Biol*, 17(9), e3000446. doi:10.1371/journal.pbio.3000446
- Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev*, 26(1), 58-85. doi:10.1128/CMR.00067-12
- Estrada-Figueroa, L. A., Diaz-Gandarilla, J. A., Hernandez-Ramirez, V. I., Arrieta-Gonzalez, M. M., Osorio-Trujillo, C., Rosales-Encina, J. L., Talamas-Rohana, P. (2018). Leishmania mexicana gp63 is the enzyme responsible for cyclooxygenase (COX) activity in this parasitic protozoa. *Biochimie*, 151, 73-84. doi:10.1016/j.biochi.2018.05.016
- Etheridge, R. D., Alaganan, A., Tang, K., Lou, H. J., Turk, B. E., & Sibley, L. D. (2014). The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe*, 15(5), 537-550. doi:10.1016/j.chom.2014.04.002
- Fentress, S. J., Behnke, M. S., Dunay, I. R., Mashayekhi, M., Rommereim, L. M., Fox, B. A., . . . Sibley, L. D. (2010). Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe*, 8(6), 484-495. doi:10.1016/j.chom.2010.11.005
- Ferreira da Silva Mda, F., Barbosa, H. S., Gross, U., & Luder, C. G. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst*, 4(8), 824-834. doi:10.1039/b800520f
- Fischer, D. G., Novick, D., Orchansky, P., & Rubinstein, M. (1988). Two molecular forms of the human interferon-gamma receptor. Ligand binding, internalization, and down-regulation. *J Biol Chem*, 263(6), 2632-2637.
- Foussard, F., Gallois, Y., Tronchin, G., Robert, R., & Mauras, G. (1990). Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. *Parasitol Res*, 76(7), 563-565. doi:10.1007/bf00932561

- Fox, B. A., Gigley, J. P., & Bzik, D. J. (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol*, *34*(3), 323-331. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.001
- Francia, M. E., Dubremetz, J. F., & Morrissette, N. S. (2015). Basal body structure and composition in the apicomplexans *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Cilia*, *5*, 3. doi:10.1186/s13630-016-0025-5
- Franco, E., Manning-Cela, R., & Meza, I. (2002). Signal transduction in *Entamoeba histolytica* induced by interaction with fibronectin: presence and activation of phosphokinase A and its possible relation to invasiveness. *Arch Med Res*, *33*(4), 389-397. doi:10.1016/s0188-4409(02)00368-5
- Gavini, K., & Parameshwaran, K. (2020). Western Blot (Protein Immunoblot). In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., . . . Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*, *157*(2), 798-805.
- Giannone, R. J., Wurch, L. L., Podar, M., & Hettich, R. L. (2015). Rescuing Those Left Behind: Recovering and Characterizing Underdigested Membrane and Hydrophobic Proteins To Enhance Proteome Measurement Depth. *Anal Chem*, *87*(15), 7720-7728. doi:10.1021/acs.analchem.5b01187
- Gibbs, V. C., Williams, S. R., Gray, P. W., Schreiber, R. D., Pennica, D., Rice, G., & Goeddel, D. V. (1991). The extracellular domain of the human interferon gamma receptor interacts with a species-specific signal transducer. *Mol Cell Biol*, *11*(12), 5860-5866. doi:10.1128/mcb.11.12.5860
- Giroux, M., Schmidt, M., & Descoteaux, A. (2003). IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol*, *171*(8), 4187-4194. doi:10.4049/jimmunol.171.8.4187
- Gomez de Leon, C. T., Diaz Martin, R. D., Mendoza Hernandez, G., Gonzalez Pozos, S., Ambrosio, J. R., & Mondragon Flores, R. (2014). Proteomic characterization of the

- subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Proteomics*, 111, 86-99. doi:10.1016/j.jprot.2014.03.008
- Green, D. S., Young, H. A., & Valencia, J. C. (2017). Current prospects of type II interferon gamma signaling and autoimmunity. *J Biol Chem*, 292(34), 13925-13933. doi:10.1074/jbc.R116.774745
- Harding, C. R., Gow, M., Kang, J. H., Shortt, E., Manalis, S. R., Meissner, M., & Lourido, S. (2019). Alveolar proteins stabilize cortical microtubules in *Toxoplasma gondii*. *Nat Commun*, 10(1), 401. doi:10.1038/s41467-019-08318-7
- Haspel, R. L., Salditt-Georgieff, M., & Darnell, J. E., Jr. (1996). The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J*, 15(22), 6262-6268.
- Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*, 8(10), 634-640. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x
- Hunter, C. A., & Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*, 10(11), 766-778. doi:10.1038/nrmicro2858
- Jamieson, S. E., de Roubaix, L. A., Cortina-Borja, M., Tan, H. K., Mui, E. J., Cordell, H. J., . . . Blackwell, J. M. (2008). Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis. *PLoS One*, 3(6), e2285. doi:10.1371/journal.pone.0002285
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2012). Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*, 55(6), 845-851. doi:10.1093/cid/cis508
- Jones, N. G., Wang, Q., & Sibley, L. D. (2017). Secreted protein kinases regulate cyst burden during chronic toxoplasmosis. *Cell Microbiol*, 19(2). doi:10.1111/cmi.12651
- Jung, C., Lee, C. Y., & Grigg, M. E. (2004). The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int J Parasitol*, 34(3), 285-296. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.004
- Katris, N. J., van Dooren, G. G., McMillan, P. J., Hanssen, E., Tilley, L., & Waller, R. F. (2014). The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog*, 10(4), e1004074. doi:10.1371/journal.ppat.1004074

- Khan, K., & Khan, W. (2018). Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. *Parasitol Int*, 67(6), 715-721. doi:10.1016/j.parint.2018.07.004
- Kozak, C. A., Peyser, M., Krall, M., Mariano, T. M., Kumar, C. S., Pestka, S., & Mock, B. A. (1990). Molecular genetic markers spanning mouse chromosome 10. *Genomics*, 8(3), 519-524. doi:10.1016/0888-7543(90)90039-w
- Kushnaryov, V. M., MacDonald, H. S., Sedmak, J. J., & Grossberg, S. E. (1988). The cellular internalization of recombinant gamma interferon differs from that of natural interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 157(1), 109-114. doi:10.1016/s0006-291x(88)80019-6
- Lalani, A. S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D., & McFadden, G. (1997). The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J Virol*, 71(6), 4356-4363.
- Lalani, A. S., & McFadden, G. (1997). Secreted poxvirus chemokine binding proteins. *J Leukoc Biol*, 62(5), 570-576. doi:10.1002/jlb.62.5.570
- Langer, J. A., & Pestka, S. (1988). Interferon receptors. *Immunol Today*, 9(12), 393-400. doi:10.1016/0167-5699(88)91241-8
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., . . . Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*, 27(1), 37-58. doi:10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x
- Li, J. X., He, J. J., Elsheikha, H. M., Chen, D., Zhai, B. T., Zhu, X. Q., & Yan, H. K. (2019). *Toxoplasma gondii* ROP17 inhibits the innate immune response of HEK293T cells to promote its survival. *Parasitol Res*, 118(3), 783-792. doi:10.1007/s00436-019-06215-y
- Ling, Y. M., Shaw, M. H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G. A., Ferguson, D. J., & Yap, G. S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med*, 203(9), 2063-2071. doi:10.1084/jem.20061318
- Lopez-Yglesias, A. H., Camanzo, E., Martin, A. T., Araujo, A. M., & Yarovinsky, F. (2019). TLR11-independent inflammasome activation is critical for CD4+ T cell-derived

- IFN-gamma production and host resistance to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*, 15(6), e1007872. doi:10.1371/journal.ppat.1007872
- Martens, S., & Howard, J. (2006). The interferon-inducible GTPases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 559-589. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104619
- Martorelli Di Genova, B., Wilson, S. K., Dubey, J. P., & Knoll, L. J. (2019). Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biol*, 17(8), e3000364. doi:10.1371/journal.pbio.3000364
- McFadden, G. I., & Yeh, E. (2017). The apicoplast: now you see it, now you don't. *Int J Parasitol*, 47(2-3), 137-144. doi:10.1016/j.ijpara.2016.08.005
- McLeod, R., Boyer, K. M., Lee, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., . . . Toxoplasmosis Study, G. (2012). Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clin Infect Dis*, 54(11), 1595-1605. doi:10.1093/cid/cis258
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., . . . Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 5(5), 607-625. doi:10.3201/eid0505.990502
- Mehlhorn, H., & Frenkel, J. K. (1980). Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol*, 66(1), 59-67.
- Minns, L. A., Menard, L. C., Foureau, D. M., Darche, S., Ronet, C., Mielcarz, D. W., . . . Kasper, L. H. (2006). TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 176(12), 7589-7597. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7589
- Moncada, P. A., & Montoya, J. G. (2012). Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10(7), 815-828. doi:10.1586/eri.12.58
- Mondragon, R., Howe, D. K., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (1998). Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J Parasitol*, 84(3), 639-641.
- Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363(9425), 1965-1976. doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X

- Mossman, K., Upton, C., Buller, R. M., & McFadden, G. (1995). Species specificity of ectromelia virus and vaccinia virus interferon-gamma binding proteins. *Virology*, 208(2), 762-769. doi:10.1006/viro.1995.1208
- Mossman, K., Upton, C., & McFadden, G. (1995). The *myxoma* virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *J Biol Chem*, 270(7), 3031-3038. doi:10.1074/jbc.270.7.3031
- Nagamune, K., Hicks, L. M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E. N., & Sibley, L. D. (2008). Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 451(7175), 207-210. doi:10.1038/nature06478
- Narasimhan, J., Joyce, B. R., Naguleswaran, A., Smith, A. T., Livingston, M. R., Dixon, S. E., . . . Sullivan, W. J., Jr. (2008). Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, 283(24), 16591-16601. doi:10.1074/jbc.M800681200
- Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool*, 34(2), 217-226. doi:10.1111/j.1550-7408.1987.tb03162.x
- Odberg-Ferragut, C., Soete, M., Engels, A., Samyn, B., Loyens, A., Van Beeumen, J., . . . Dubremetz, J. F. (1996). Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol Biochem Parasitol*, 82(2), 237-244. doi:10.1016/0166-6851(96)02740-5
- Pandey, R., & Veeranki, V. D. (2018). Optimizing secretory expression of recombinant human interferon gamma from *Kluyveromyces lactis*. *Prep Biochem Biotechnol*, 48(2), 202-212. doi:10.1080/10826068.2018.1425706
- Peixoto, L., Chen, F., Harb, O. S., Davis, P. H., Beiting, D. P., Brownback, C. S., . . . Roos, D. S. (2010). Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. *Cell Host Microbe*, 8(2), 208-218. doi:10.1016/j.chom.2010.07.004
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 202, 8-32. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x
- Pfefferkorn, E. R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(3), 908-912. doi:10.1073/pnas.81.3.908

- Piao, L. X., Cheng, J. H., Aosai, F., Zhao, X. D., Norose, K., & Jin, X. J. (2018). Cellular immunopathogenesis in primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Parasite Immunol*, *40*(9), e12570. doi:10.1111/pim.12570
- Pierce, B. G., Hourai, Y., & Weng, Z. (2011). Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. *PLoS One*, *6*(9), e24657. doi:10.1371/journal.pone.0024657
- Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B. H., Vreven, T., & Weng, Z. (2014). ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, *30*(12), 1771-1773. doi:10.1093/bioinformatics/btu097
- Pittman, K. J., & Knoll, L. J. (2015). Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol Mol Biol Rev*, *79*(4), 387-401. doi:10.1128/MMBR.00027-15
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, *5*(5), 375-386. doi:10.1038/nri1604
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M. F., Sher, A., & Soldati-Favre, D. (2008). *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe*, *3*(2), 77-87. doi:10.1016/j.chom.2008.01.001
- Pulido-Ortega, J., Talamas-Rohana, P., Munoz-Ortega, M. H., Aldaba-Muruato, L. R., Martinez-Hernandez, S. L., Campos-Esparza, M. D. R., . . . Ventura-Juarez, J. (2019). Functional Characterization of an Interferon Gamma Receptor-Like Protein on *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun*, *87*(11). doi:10.1128/IAI.00540-19
- Radke, J. R., Guerini, M. N., Jerome, M., & White, M. W. (2003). A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, *131*(2), 119-127. doi:10.1016/s0166-6851(03)00198-1
- Ramirez-Flores CJ, Cruz-Miron R, Lagunas-Cortes N, Mondragon-Castelan M, Mondragon-Gonzalez R, Gonzalez-Pozos S, et al. *Toxoplasma gondii* excreted/secreted proteases disrupt intercellular junction proteins in epithelial cell monolayers to facilitate

- tachyzoites paracellular migration. *Cell Microbiol.* 2020. In press. DOI: 10.1111/cmi.13283
- Ramsauer, K., Sadzak, I., Porras, A., Pilz, A., Nebreda, A. R., Decker, T., & Kovarik, P. (2002). p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 12859-12864. doi:10.1073/pnas.192264999
- Riaño, D. A. O. (2015). Caracterización del efecto de interferón- γ en la inducción de la cistogénesis en la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. (M. en C.), CINVESTAV, Ciudad de México.
- Sa, Q., Tiwari, A., Ochiai, E., Mullins, J., & Suzuki, Y. (2018). Inducible nitric oxide synthase in innate immune cells is important for restricting cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brain but not required for the protective immune process to remove the cysts. *Microbes Infect*, 20(4), 261-266. doi:10.1016/j.micinf.2017.12.004
- Sadir, R., Lambert, A., Lortat-Jacob, H., & Morel, G. (2001). Caveolae and clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor. *Cytokine*, 14(1), 19-26. doi:10.1006/cyto.2000.0854
- Saeij, J. P., & Frickel, E. M. (2017). Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole: a role for GBPs, autophagy and host cell death. *Curr Opin Microbiol*, 40, 72-80. doi:10.1016/j.mib.2017.10.021
- Sasai, M., & Yamamoto, M. (2019). Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Mol Med*, 51(12), 156. doi:10.1038/s12276-019-0353-9
- Schreiber, R. D., & Farrar, M. A. (1993). The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Jpn*, 28 Suppl 4, 88-94; discussion 95-86. doi:10.1007/bf02782897
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1(6), 2856-2860. doi:10.1038/nprot.2006.468
- Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R., & Darnell, J. E., Jr. (1992). Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science*, 258(5089), 1808-1812. doi:10.1126/science.1281555

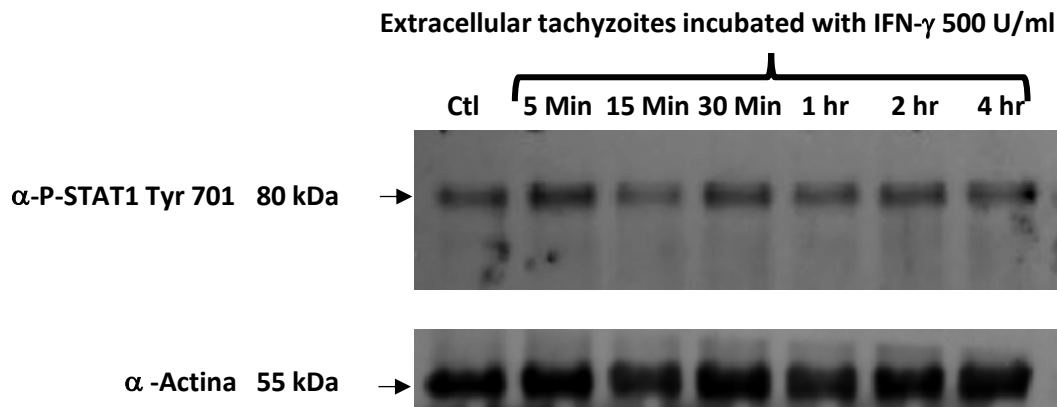
- Smith, G. L., Talbot-Cooper, C., & Lu, Y. (2018). How Does *Vaccinia* Virus Interfere With Interferon? *Adv Virus Res*, *100*, 355-378. doi:10.1016/bs.aivir.2018.01.003
- Soete, M., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1994). Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp Parasitol*, *78*(4), 361-370. doi:10.1006/expr.1994.1039
- Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., & Sibley, L. D. (2003). Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, *299*(5605), 414-416. doi:10.1126/science.1078035
- Sullivan, W. J., Jr., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*, *36*(3), 717-733. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x
- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., & Remington, J. S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, *240*(4851), 516-518.
- Suzuki, Y., Wong, S. Y., Grumet, F. C., Fessel, J., Montoya, J. G., Zolopa, A. R., . . . Remington, J. S. (1996). Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J Infect Dis*, *173*(1), 265-268.
- Symons, J. A., Tschärke, D. C., Price, N., & Smith, G. L. (2002). A study of the *vaccinia* virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence. *J Gen Virol*, *83*(Pt 8), 1953-1964. doi:10.1099/0022-1317-83-8-1953
- Talamas-Rohana, P., Rosales-Encina, J. L., Gutierrez, M. C., & Hernandez, V. I. (1992). Identification and partial purification of an *Entamoeba histolytica* membrane protein that binds fibronectin. *Arch Med Res*, *23*(2), 119-123.
- Taylor, G. A., Feng, C. G., & Sher, A. (2007). Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). *Microbes Infect*, *9*(14-15), 1644-1651. doi:10.1016/j.micinf.2007.09.004
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., . . . Sibley, L. D. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*, *314*(5806), 1776-1780. doi:10.1126/science.1133643

- Tomavo, S. (2001). The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. *Int J Parasitol*, *31*(10), 1023-1031. doi:10.1016/s0020-7519(01)00193-x
- Tomita, T., Bzik, D. J., Ma, Y. F., Fox, B. A., Markillie, L. M., Taylor, R. C., . . . Weiss, L. M. (2013). The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. *PLoS Pathog*, *9*(12), e1003823. doi:10.1371/journal.ppat.1003823
- Tu, V., Mayoral, J., Sugi, T., Tomita, T., Han, B., Ma, Y. F., & Weiss, L. M. (2019). Enrichment and Proteomic Characterization of the Cyst Wall from In Vitro *Toxoplasma gondii* Cysts. *MBio*, *10*(2). doi:10.1128/mBio.00469-19
- Upton, C., Mossman, K., & McFadden, G. (1992). Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by *myxoma* virus. *Science*, *258*(5086), 1369-1372. doi:10.1126/science.1455233
- Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G., & Garotta, G. (1992). Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol*, *22*(9), 2403-2412. doi:10.1002/eji.1830220933
- van Boxel-Dezaire, A. H., & Stark, G. R. (2007). Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma. *Curr Top Microbiol Immunol*, *316*, 119-154. doi:10.1007/978-3-540-71329-6_7
- van den Zypen, E., & Piekarski, G. (1968). [Ultrastructure on endodyogeny in *Toxoplasma gondii*]. *Bol Chil Parasitol*, *23*(3), 90-94.
- van Loon, A. P., Ozmen, L., Fountoulakis, M., Kania, M., Haiker, M., & Garotta, G. (1991). High-affinity receptor for interferon-gamma (IFN-gamma), a ubiquitous protein occurring in different molecular forms on human cells: blood monocytes and eleven different cell lines have the same IFN-gamma receptor protein. *J Leukoc Biol*, *49*(5), 462-473. doi:10.1002/jlb.49.5.462
- Velge, P., Ouaisi, M. A., Cornette, J., Afchain, D., & Capron, A. (1988). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology*, *97* (Pt 2), 255-268. doi:10.1017/s0031182000058467

- Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., & Salemme, F. R. (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, 243(4887), 85-88. doi:10.1126/science.2911722
- Weiss, L. M., Laplace, D., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B., Cali, A., & Wittner, M. (1995). A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol*, 42(2), 150-157. doi:10.1111/j.1550-7408.1995.tb01556.x
- Wen, Z., Zhong, Z., & Darnell, J. E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82(2), 241-250. doi:10.1016/0092-8674(95)90311-9
- Wilchek, M., & Bayer, E. A. (1984). The avidin-biotin complex in immunology. *Immunol Today*, 5(2), 39-43. doi:10.1016/0167-5699(84)90027-6
- Wilmes, S., Beutel, O., Li, Z., Francois-Newton, V., Richter, C. P., Janning, D., . . . Piehler, J. (2015). Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling. *J Cell Biol*, 209(4), 579-593. doi:10.1083/jcb.201412049
- Wohlfert, E. A., Blader, I. J., & Wilson, E. H. (2017). Brains and Brawn: *Toxoplasma* Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle. *Trends Parasitol*, 33(7), 519-531. doi:10.1016/j.pt.2017.04.001
- Wu, Y., Li, Q., & Chen, X. Z. (2007). Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc*, 2(12), 3278-3284. doi:10.1038/nprot.2007.459
- Yahiaoui, B., Dzierszynski, F., Bernigaud, A., Slomianny, C., Camus, D., & Tomavo, S. (1999). Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 99(2), 223-235. doi:10.1016/s0166-6851(99)00019-5
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*, 43(W1), W174-181. doi:10.1093/nar/gkv342
- Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*, 14(2), 109-121. doi:10.1038/nri3598
- Yarovinsky, F., & Sher, A. (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 36(3), 255-259. doi:10.1016/j.ijpara.2005.12.003

- Yin, Q., El-Ashram, S., Liu, H., Sun, X., Zhao, X., Liu, X., & Suo, X. (2015). Interferon-Gamma Release Assay: An Effective Tool to Detect Early *Toxoplasma gondii* Infection in Mice. *PLoS One*, *10*(9), e0137808. doi:10.1371/journal.pone.0137808
- Zhang, Y. W., Halonen, S. K., Ma, Y. F., Wittner, M., & Weiss, L. M. (2001). Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun*, *69*(1), 501-507. doi:10.1128/IAI.69.1.501-507.2001
- Zhao, Y., & Yap, G. S. (2014). *Toxoplasma's* arms race with the host interferon response: a menage a trois of ROPs. *Cell Host Microbe*, *15*(5), 517-518. doi:10.1016/j.chom.2014.05.002

Anexos



Fosforilación de la proteína STAT en taquizoítos de *Toxoplasma* tratados con IFN- γ . Los parásitos aislados fueron purificados e incubados con 500 U/ml de IFN- γ durante distintos tiempos, se lisaron y se corrió un gel SDS-PAGE, se realizó la transferencia de western y se observó la fosforilación de STAT a los distintos tiempos de exposición. Se reveló con el anticuerpo contra actina como control de carga.

Este resultado muestra que a pesar de que en el genoma de *Toxoplasma* no hay reportes de la existencia de una proteína STAT, existe el reconocimiento de un anticuerpo comercial hacia esta proteína en el parásito, el peso molecular aparente de esta proteína en mamíferos es de 80 kDa, lo mismo que se observó en *Toxoplasma*