



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“Evaluación de la distribución y función de las PPasas: soluble (TgPPasa)
y membranal (TgVP1) de *Toxoplasma gondii*, durante la formación del
quiste tisular”**

T E S I S

Que presenta

ING. KARINA ARAUJO RUIZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

Director de la Tesis:

Dr. Ricardo Mondragón Flores

Ciudad de México

AGOSTO 2022

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada de septiembre de 2020 a agosto 2022, con clave: 2020-000026-02NACF y número de CVU 1076911.

El presente trabajo de investigación se realizó 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, con apoyo del proyecto con número 51486 FORDECyT-PRONACES “CIENCIAS DE FRONTERA 2019 CONACyT”, a cargo del Dr. Ricardo Mondragón Flores profesor del Departamento de Bioquímica de esta Institución.

Agradezco al **Dr. Ricardo Mondragón Flores**, por aceptarme en 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 el **Dr. Rogelio Rodríguez Sotres** y el **Dr. Edgar Morales Ríos**, por todas sus importantes aportaciones al proyecto, su apoyo, observaciones y comentarios y por la disposición que siempre mostraron para la asistencia a seminarios.

Agradezco al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)**, Unidad Zacatenco, por las facilidades para obtener el grado y el financiamiento otorgado.

Agradezco al **Colegio de Profesores del Departamento de Bioquímica**, el conocimiento transmitido durante el periodo de maestría y por los aportes en los seminarios departamentales.

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

Agradezco al **Dr. Rogelio Rodríguez Sotres** del departamento de Bioquímica de la UNAM, por el apoyo proporcionado en el uso y manejo del *software* AlphaFold para el modelado de proteínas.

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 al **M. en C. Víctor Hugo Sánchez Vázquez** y al **Biol. Jesús Pablo Gómez Islas** por su valioso apoyo en el uso y manejo del microscopio confocal.

Agradezco a la **I.B. Brenda Yomara García Sánchez** y a la **M.V.Z. Itzel Guadalupe Aguilar López** por su apoyo y enseñanza durante el desarrollo de diferentes técnicas. Por compartir el espacio y la buena convivencia en el laboratorio.

Agradezco a la **Lic. Angélica González Ceja**, asistente administrativo de la coordinación académica, por el apoyo proporcionado en todos los trámites administrativos.

Agradezco a la **Lic. Priscila González Ceja**, asistente secretarial, por todo su apoyo en la cotización y compra de reactivos.

Agradezco al **MVZ Jorge Fernández Hernández** y la **MVZ Antonieta López López**, de la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN, unidad Zacatenco, por el apoyo proporcionado.

En especial agradezco a:

Mis padres **Ma. Victoria Ruiz de la Cruz** y **Moisés Araujo Mendoza** por su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Por ser siempre una oreja conectada al corazón y por ser mi ejemplo de esfuerzo, dedicación e integridad humana.

Mi hermano **Alan Araujo Ruiz** por ser mi apoyo en los momentos difíciles, por su amor y por ser mi ejemplo de determinación.

Mis nuevas amigas y compañeras del laboratorio: **Mónica**, gracias por tu tiempo, ayuda, compañía y sabios consejos. **Brenda**, gracias por siempre estar dispuesta a ayudar, por tu tiempo y por hacer amena la estancia en el laboratorio.

Y muy en especial agradezco a mi esposo, **Marco Antonio Velasco Cárdenas**, por su apoyo y amor incondicional en cada etapa de nuestras vidas, por siempre confiar en mí e impulsarme a ser una mujer en constante cambio.

I. Índice

I. Abreviaturas	1
II. Resumen	3
III. Abstract	4
1. Introducción	5
2. Generalidades	10
2.1. Formas parasitarias de <i>T. gondii</i>	11
2.1.1. Taquizoíto.....	11
2.1.2. Bradizoíto.....	12
2.1.3. Esporozoíto.....	13
2.2. Ciclo de vida.....	13
2.2.1. Vías inmunitarias de la célula hospedero por los efectores de <i>T. gondii</i>	15
2.3. Vacuola parasitófora.....	18
2.4. Quiste tisular.....	20
2.4.1. Enquistamiento <i>in vivo</i>	22
2.4.2. Inducción al enquistamiento <i>in vitro</i>	24
2.5. Cepas clonotípicas de <i>T. gondii</i>	28
2.6. Pirofosfato y pirofosfatasas.....	29
2.6.1. Pirofosfatasas solubles (sPPasas).....	31
2.6.2. Pirofosfatasas integrales de membrana (mPPasas).....	33
2.6.3. Inhibidores de PPasas.....	35
2.6.3.1. NaF como inhibidor de sPPasas.....	37
2.6.3.2. C10 bifosfonato como inhibidor de mPPasas.....	37
3. Antecedentes directos	39
4. Justificación	41
5. Hipótesis	41

6. Objetivo general	41
6.1. Objetivos particulares <i>in silico</i>	41
6.2. Objetivos particulares <i>in vivo</i>	42
7. Estrategia experimental.....	43
8. Métodos	44
8.1. Análisis bioinformático	44
8.2. Diseño de péptidos inmunogénicos	44
8.3. Predicción estructural de la PPasa membranal TgVP1 mediante AlphaFold2.....	45
8.4. Animales.....	45
8.5. Obtención y mantenimiento de la cepa RH de <i>T. gondii</i>	46
8.6. Extracto total de taquizoítos	46
8.7. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	46
8.8. Inmunización de ratones BALB/c con los péptidos inmunogénicos sintetizados y recolección de sueros.....	47
8.9. Determinación semicuantitativa de la inmunoglobulina IgG mediante ELISA	47
8.10. SDS-PAGE.....	48
8.11. Western blot.....	48
8.12. Cultivo celular	49
8.13. Conteo de taquizoítos	49
8.14. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 mediante inmunofluorescencias en parásitos extracelulares de <i>T. gondii</i>	49
8.15. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 mediante inmunofluorescencias en proliferación intracelular de <i>T. gondii</i>	50
8.16. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de <i>T.</i> <i>gondii</i> con IFN- γ	51
8.17. Evaluación de la viabilidad de parásitos extracelulares en presencia de inhibidores de PPasas	52

8.18. Ensayos de invasión celular en presencia de inhibidores de PPasas	52
8.19. Ensayos de proliferación intracelular de <i>T. gondii</i> en presencia de inhibidores de PPasas	53
8.20. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de <i>T. gondii</i> con IFN- γ en taquizoítos pretratados con inhibidores de PPasas	53
8.21. Purificación de quistes cerebrales de la cepa ME49.....	54
8.22. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 mediante inmunofluorescencia en quistes cerebrales de la cepa ME49	55
8.23. Análisis estadístico	55
9. Resultados	56
9.1. Análisis bioinformático de la pirofosfatasa citosólica (TgPPasa)	56
9.2. Análisis bioinformático de la pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1).....	59
9.3. Modelado estructural de la TgVP1 mediante AlphaFold2	63
9.4. Diseño de péptidos inmunogénicos	66
9.4.1 Péptido inmunogénico para la TgPPasa.....	66
9.4.2. Péptido inmunogénico para la TgVP1	68
9.5. Caracterización inmunoquímica de los péptidos diseñados para la TgPPasa y la TgVP1 mediante Wb.....	70
9.6. Expresión de la inmunoglobulina IgG inducida por los péptidos inmunogénicos para la TgPPasa y TgVP1	73
9.7. Distribución de la TgPPasa y TgVP1 en taquizoítos extracelulares de <i>T. gondii</i>	74
9.8. Distribución de la TgPPasa y TgVP1 en la proliferación celular de <i>T. gondii</i>	77
9.9. Inmunolocalización de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de <i>T. gondii</i> con IFN γ	83
9.10. Efecto de los inhibidores de PPasas en la viabilidad de taquizoítos extracelulares	89
9.11. Efecto de los inhibidores de PPasas en el proceso de invasión celular	91

9.12. Efecto de los inhibidores de PPasas en la proliferación celular de <i>T. gondii</i>	93
9.13. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de <i>T. gondii</i> con IFN- γ en presencia de inhibidores de PPasas	94
9.14. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49	99
10. Discusión	101
11. Conclusiones	109
12. Perspectivas.....	109
13. Bibliografía	110
14. Anexos	129
I. Reacciones bioquímicas de liberación del PPi.....	129
II. Preparación de soluciones.....	135
III. Especificidad evaluada en pBLAST para cada péptido inmunogénico diseñado	136

II. Índice de figuras

Figura 1. Vista general de un quiste tisular de la cepa ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figura 2. Información taxonómica del parásito <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Figura 3. Morfología estructural del estadio de taquizoíto y bradizoíto	12
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	15
Figura 5. Regulación de las vías inmunitarias celulares del hospedero derivado de los efectores de la infección de <i>T. gondii</i>	17
Figura 6. Formación de la vacuola parasitófora.	19
Figura 7. Fuentes celulares de IFN- γ durante la infección por <i>T. gondii</i>	23
Figura 8. Expresión de CST1 en VP de taquizoítos expuestos a 200 U/mL de IFN- γ	26
Figura 9. Morfología de quistes inducidos de manera <i>in vitro</i> con ácido micofenólico.	27
Figura 10. Esquema de reacción de las pirofosfatasa	30
Figura 11. Esquema cinético de la sPPasa	32
Figura 12. Estructura cristalizada de la pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Toxoplasma gondii</i> (PDB: 5WRT).	33
Figura 13. Estructura química de C10 bifosfonato.	38
Figura 14. Red de interacciones proteína-proteína de la TgPPasa.....	58
Figura 15. Red de interacciones proteína-proteína de la TgVP1).	62
Figura 16. Estructura tridimensional predicha por AlphaFold2 para la TgVP1.	65
Figura 17. Modelo de la estructura cristalina de la TgPPasa e identificación del péptido inmunogénico diseñado.....	67
Figura 18. Evaluación del péptido diseñado para la TgPPasa.....	67
Figura 19. Modelado predicho para la estructura tridimensional de la TgVP1 e identificación del péptido inmunogénico diseñado.....	69
Figura 20. Evaluación del péptido diseñado para la TgVP1.	70
Figura 21. Reconocimiento inmune de los péptidos sintetizados para la TgPPasa y TgVP1	71
Figura 22. Inmunoblot de la TgPPasa y TgVP1 en extracto total de <i>T. gondii</i>	72
Figura 23. Evaluación de la expresión del isotipo de IgG en sueros preinmunes e inmunes.	73
Figura 24. Distribución de la TgPPasa en taquizoítos extracelulares.	75
Figura 25. Distribución de la TgVP1 en taquizoítos extracelulares.....	76
Figura 26. Distribución de GAP45 en taquizoítos extracelulares.	77

Figura 27. Distribución de la TgPPasa en el proceso de invasión y proliferación intracelular de taquizoítos.....	78
Figura 28. Evaluación de la reactividad del suero preinmune de la TgPPasa en el proceso de proliferación intracelular de taquizoítos.....	79
Figura 29. Distribución de la TgVP1 en el proceso de invasión y proliferación intracelular de taquizoítos.	81
Figura 30. Evaluación de la reactividad del suero preinmune de la TgVP1 en el proceso de proliferación intracelular de taquizoítos.....	82
Figura 31. Distribución de GAP45 en proliferación intracelular de taquizoítos.....	83
Figura 32. Expresión de CST1 a las 48 y 72 h en taquizoítos extracelulares expuestos a 200 U/mL de IFN- γ y posteriormente invadidos en células HEp-2.....	85
Figura 33. Vacuolas parasitóforas positivas a CST1.....	86
Figura 34. Distribución de la TgPPasa durante la inducción al enquistamiento de <i>T. gondii</i> con IFN γ	87
Figura 35. Distribución de la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de <i>T. gondii</i> con IFN γ	88
Figura 36. Viabilidad en parásitos extracelulares tratados con distintas concentraciones de NaF como inhibidor de la TgPPasa.	90
Figura 37. Porcentaje de viabilidad en parásitos extracelulares tratados con distintas concentraciones de C10-Bifosfonato como inhibidor de la TgVP1..	90
Figura 38. Efecto del NaF en la morfología intracelular de los taquizoítos.....	91
Figura 39. Efecto del NaF en la invasividad de los taquizoítos.	92
Figura 40. Efecto del C10-Bifosfonato en la morfología intracelular de los taquizoítos.....	92
Figura 41. Efecto del C10-Bifosfonato en la invasividad de taquizoítos	93
Figura 42. Evaluación de la proliferación celular de <i>T. gondii</i> en taquizoítos tratados con inhibidores de PPasas.....	94
Figura 43. Distribución de la TgPPasa en el enquistamiento de <i>T. gondii</i> inducido con IFN- γ en presencia de NaF.	96
Figura 44. Distribución de la TgVP1 en el enquistamiento de <i>T. gondii</i> inducido con IFN- γ en presencia de C10-Bifosfonato	97
Figura 45. Porcentaje de inducción al enquistamiento con IFN- γ en presencia de NaF.....	98

Figura 46. Porcentaje de inducción al enquistamiento con IFN- γ en presencia de C10-Bifofonato.....	98
Figura 47. Distribución de la TgPPasa y TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49	99
Figura 48. Evaluación de la distribución de la TgPPasa y TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49 en sueros preinmunes	100

III. Índice de tablas

Tabla 1. Antígenos reportados en el proceso de cistogénesis	22
Tabla 2. Secuencia aminoacídica de la TgPPasa.....	33
Tabla 3. Características generales de la TgPPasa	56
Tabla 4. Composición porcentual de aminoácidos en la secuencia de la TgPPasa.....	57
Tabla 5. Probables interacciones de la TgPPasa predichos por STRING.....	59
Tabla 6. Características generales de la pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1).....	60
Tabla 7. Secuencia aminoacídica de la TgVP1	60
Tabla 8. Composición porcentual de aminoácidos en la secuencia de la TgVP1	61
Tabla 9. Probables interacciones de la TgVP1 predichos por STRING.	63

I. ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno (<i>Antigen Presenting Cells</i>)
BAG1	Antígeno de bradizoíto 1
BSA	Albúmina sérica bovina
CST1	<i>Cystatin SN (Type I)</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBA	<i>Dolichos biflorus agglutinin</i> (Lectina DBA)
DMEM	Medio Dulbeco Modificado (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GBP	Proteínas de unión a guanilato (<i>Guanylate Binding Protein</i>)
HEp-2	Células epiteliales humanas de carcinoma de laringe
HFF-1	Células de fibroblastos de prepucio humano
HOSTs	Estructuras tubulares de secuestro del huésped (<i>Host Sequestering Tubulo- structures</i>)
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IEDB	Base de Datos de Epítomos Inmunes (<i>The Immune Epitope Database</i>)
IEM	Inmunolectromicroscopía
IF	Inmunofluorescencia
IMDPH	Inosina Monofosfato Deshidrogenasa (<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>).
IMC	Complejo Membranaral Interno
INF-γ	Interferón gamma
INV	Red intravacuolar (<i>Intravacuolar Network</i>)
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
IRG	GTPasas relacionadas con el sistema inmunitario (<i>Immune system-Related GTPases</i>)
JAK	Janus quinasa
MEM	Medio mínimo esencial
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión (<i>Transmission electron microscopy</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MPA	Ácido micofenólico
MPDH	Inosina monofosfato deshidrogenasa
mPPasa	Pirofosfatasa integral de membrana
MP	Membrana plasmática
MVP	Membrana de la Vacuola Parasitófora
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)

Na⁺/H⁺-mPPasa	Pirofosfatasa unida a la membrana translocadora de Na ⁺ y H ⁺
Na⁺-mPPasa	Pirofosfatasa unida a la membrana que bombea Na ⁺
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
PAF	Paraformaldehído
pBLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local de proteínas (<i>Protein Basic Local Alignment Search Tool</i>)
PBS	Buffer de fosfatos salinos
PBST	Solución buffer de fosfatos con Tween [®] 20
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PFK	Fosfofructoquinasa dependiente de P _i (<i>PPi-dependent phosphofructokinase (PPi-PFK)</i>)
P_i	Fosfato inorgánico
PolyP	Polifosfato
PM	Peso molecular
PPasa	Pirofosfatasa
PP_i	Pirofosfato inorgánico
RB	Cuerpo residual (<i>Residual Body</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopio electrónico de barrido (<i>Scanning electron microscope</i>)
SFB	Suero fetal bovino
sPPasa	Pirofosfatasas solubles
TA	Temperatura ambiente
TBS	Solución buffer de transferencia
TgPPasa	Pirofosfatasa citosólica (TgPPasa)
TgVP1	Pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1)
TMH	Hélices transmembranales (<i>Transmembrane domain</i>)
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF-β	Factor de necrosis tumoral β
TRITC	Tetrametilrhodamina
V-ATPasa	ATPasa vacuolar
VP	Vacuola parasitófora (<i>Parásitophorous Vacuole (PV)</i>)
Wb	Western blot

II. RESUMEN

El parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii* infecta a todos los animales de sangre caliente incluyendo al humano. En condiciones de estrés *T. gondii* se diferencia de taquizoíto a bradizoíto, con la modificación de la vacuola parasitófora (VP) a un quiste tisular. Al interior de los quistes, los bradizoítos pueden persistir en forma latente durante toda la vida del hospedero, desempeñando un papel fundamental tanto en la transmisión, como en la reactivación de este protozoario. Dentro los quistes, los bradizoítos se encuentran rodeados por una pared quística rica en carbohidratos y rodeada por una membrana que aparentemente deriva de la membrana de la vacuola parasitófora (MVP), aunque la composición y función de estas estructuras no se conocen del todo. Las pirofosfatasa inorgánicas (PPasa) participan en el ciclo energético y son esenciales para el crecimiento y la supervivencia de los organismos y se ha reportado que *T. gondii* posee dos PPasas, una pirofosfatasa citosólica (TgPPasa) y una pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1). La TgPPasa regula el nivel citosólico del PPI en el parásito y se está involucrada en la fosfofructo-1-fosfotransferasa (PFK) dependiente de PPI, además, se encuentra estudiada su estructura molecular. Mientras que la TgVP1 se encuentra asociada a la MVP y a los acidocalcisomas. Sin embargo, a la fecha, no se ha reportado la presencia y distribución de las PPasas en el estadio de quiste. Debido a que la membrana quística proviene de la membrana vacuolar, en el presente trabajo se caracterizó la presencia y distribución de las PPasas en el proceso de enquistamiento *in vitro* y, en quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*. Para ello, se diseñaron péptidos inmunogénicos para la TgPPasa y la TgVP1, obteniendo anticuerpos policlonales de ratón. Los sueros inmunes fueron validados mediante inmunoblot, detectando los pesos moleculares correspondientes a los péptidos y a las proteínas nativas a partir de extractos de taquizoítos. Con los sueros inmunes respectivos, se caracterizó la distribución topológica de ambas PPasas por microscopia de fluorescencia y confocal en parásitos extracelulares y en parásitos en proliferación intracelular. También se estudió la distribución de las PPasas en quistes inducidos *in vitro*, por exposición con IFN- γ y en quistes tisulares aislados de cerebros de ratones con encefalitis toxoplásmica. Se encontró en ambos tipos de quistes, a la TgPPasa al interior de los bradizoítos, mientras que la TgVP1 se identificó asociada a la pared quística, muy probablemente a la membrana vacuolar. Además, se evaluó el proceso de enquistamiento, en presencia de inhibidores específicos para ambas PPasas. Se encontró que solo la TgVP1, además de función metabólica descrita, también contribuyó en el proceso de enquistamiento de *T. gondii*.

III. ABSTRACT

The obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* infects all warm-blooded animals including humans. Under stress conditions *T. gondii* differentiates from tachyzoite to bradyzoite, with modification of the parasitophorous vacuole (PV) to a tissue cyst. Within the cysts, bradyzoites can persist latently throughout the life of the host, playing a key role in both transmission and reactivation of this protozoan. Within the chitins, bradyzoites are surrounded by a cystic wall rich in carbohydrates and surrounded by a membrane apparently derived from the membrane of the parasitophorous vacuole (PVM), although the composition and function of these structures are not fully understood. Inorganic pyrophosphatases (PPases) are involved in the energy cycle and are essential for the growth and survival of organisms and *T. gondii* has been reported to possess two PPases, a cytosolic pyrophosphatase (TgPPase) and a membrane proton translocating pyrophosphatase (TgVP1). TgPPase regulates the cytosolic level of PPi in the parasite and is involved in PPi-dependent phosphofructo-1-phosphotransferase (PFK), and its molecular structure has been studied. While TgVP1 is associated with MVP and acidocytosomes. However, to date, the presence and distribution of PPases in the cyst stage has not been reported. Since the cystic membrane is derived from the vacuolar membrane, the present work characterized the presence and distribution of PPases in the cyst stage *in vitro* and in cysts of *T. gondii* strain ME49. For this purpose, immunogenic peptides were designed for TgPPase and TgVP1, obtaining mouse polyclonal antibodies. Immune sera were validated by immunoblotting, detecting the molecular weights corresponding to the peptides and native proteins from tachyzoite extracts. With the respective immune sera, the topological distribution of both PPases was characterized by fluorescence and confocal microscopy in extracellular parasites and in intracellularly proliferating parasites. We also studied the distribution of PPases in cysts induced *in vitro*, by exposure with IFN- γ and in tissue cysts isolated from brains of mice with toxoplasmic encephalitis. In both types of cysts, TgPPase was found inside the bradyzoites, while TgVP1 was identified associated with the cystic wall, most likely the vacuolar membrane. In addition, the encystment process was evaluated in the presence of specific inhibitors for both PPases. It was found that TgVP1 alone, in addition to the metabolic function described, also contributed to the *T. gondii* encystment process.

1. INTRODUCCIÓN

La diferenciación de *Toxoplasma gondii*, es un proceso obligado como parte de las distintas etapas de su ciclo de vida entre la célula hospedero y el propio parásito (Sibley *et al.*, 2009). Este protozoo posee un complejo apical que le permite invadir y proliferar en todas las células nucleadas de organismos de sangre caliente, por lo que es clasificado como un parásito Apicomplexa y su ciclo de vida incluye tanto la reproducción sexual como la asexual. (Hunter & Sibley, 2012). Presenta tres diferentes estadios que están relacionados con el desarrollo de la infección: a) los taquizoítos, una forma altamente invasiva y proliferativa localizada dentro de vacuolas parasitóforas (VP); b) los bradizoítos, una forma proliferativa lenta, presente en quistes tisulares y c) los esporozoítos, una forma presente en ooquistes maduros (Cruz-Mirón *et al.*, 2021).

En la invasión celular, los parásitos de *T. gondii* realizan movimientos de deslizamiento basados en actina-miosina sobre la membrana de la célula hospedero. La adhesión del parásito en la membrana de la célula hospedero, está regulada por la secreción de proteínas a partir de los micronemos (adhesinas) y su respectivo reconocimiento, a través de receptores en la célula hospedero. Durante la invasión, el parásito invagina la membrana plasmática (MP) de la célula hospedero creando una VP, para lo cual, requiere la secreción, temporalmente coordinada de proteínas desde los micronemos y las roptrias (proteínas RON); (Fox *et al.*, 2019). Una vez instalada dentro de la célula hospedero, la VP es rodeada por los filamentos intermedios y los microtúbulos de la célula hospedero, al interior de la VP, el parásito secreta el contenido de los gránulos densos (GRA y GRA-like) permaneciendo solubles dentro de la VP o incorporándose a las membranas de la red intravacuolar (IVN), a la membrana de la vacuola parasitóforas (MVP), al citoplasma o al núcleo de la célula hospedero (Fox *et al.*, 2019).

Como resultado de la proliferación del parásito en el organismo, se excretan/secretan componentes del parásito que son detectados por el sistema inmunitario de defensa del hospedero, generando la activación de una respuesta inmune con la producción de anticuerpos (no protectores) así como la activación de células T, con liberación de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), entre otras. La presencia de IFN- γ es detectada, mediante un mecanismo aun no descrito, por los taquizoítos intracelulares activando su diferenciación a la forma del bradizoíto y generando un quiste tisular (Cruz-Mirón, 2021). El quiste tisular es una estructura redondeada rígida, rica en carbohidratos que genera una cubierta tipo quitinosa resistente a los ataques por cualquiera de los mecanismos

efectores de la respuesta inmune tanto celular como molecular, así como al efecto de fármacos anti-parasitarios. El parásito vive en forma de bradizoíto al interior del quiste tisular, en los diferentes tejidos, por prácticamente toda la vida del hospedero.

A partir del estudio ultraestructural del desarrollo y formación de quistes tisulares de *T. gondii* en cerebro de ratones, se dilucido que la pared del quiste tisular se desarrolla como parte de una adaptación del revestimiento de la VP con estructuras tubulares por debajo de la pared quística (Ferguson & Hutchison, 1987). Actualmente se ha reportado que los quistes están rodeados por la MVP altamente modificada, y una capa interna con apariencia esponjosa y de mayor grosor que aparentemente es la pared del quiste y que estos componentes son importantes para la supervivencia de los quistes durante la transmisión, así como dentro del sistema nervioso central del hospedero (Tomita *et al.*, 2021). Sin embargo, las interacciones proteicas y el flujo de información entre la MVP y la pared quística con respecto a los bradizoítos en latencia al interior del quiste tisular, es un tema aun no descrito, aunque se han realizado análisis proteómicos para evidenciar las proteínas involucradas en estas regiones, por lo que se ha reportado que las proteínas asociadas a la MVP, secretadas por los gránulos densos como GRA5 y GRA7, regulan la maduración de la pared del quiste tisular de *T. gondii* (Guevara *et al.*, 2020). Con el fin de conocer la organización intravacuolar de los quistes tisulares, en nuestro grupo de trabajo, se procesaron quistes cerebrales de la línea ME49 mediante ultramicrotomía (Hernández-Contreras, 2012). A partir de los cortes evaluados mediante microscopia electrónica de transmisión (MET), se observaron bradizoítos completamente desorganizados presentes tanto en forma transversal como longitudinal, embebidos en una matriz quística (Hernández-Contreras, 2012). La pared quística presentó un grosor no uniforme de aproximadamente 400 nm, en el cual se encontró una capa delgada electrodensa y una capa interna con apariencia esponjosa y de mayor grosor (**Fig. 1**). Asociado a la cara externa de la pared se encontraron pequeñas vesículas de origen desconocidos de un tamaño promedio de 200 nm de diámetro (**Fig. 1**). Además, la matriz quística presenta un arreglo fibroso y vesicular que permite un cierto movimiento intraquístico de los parásitos.

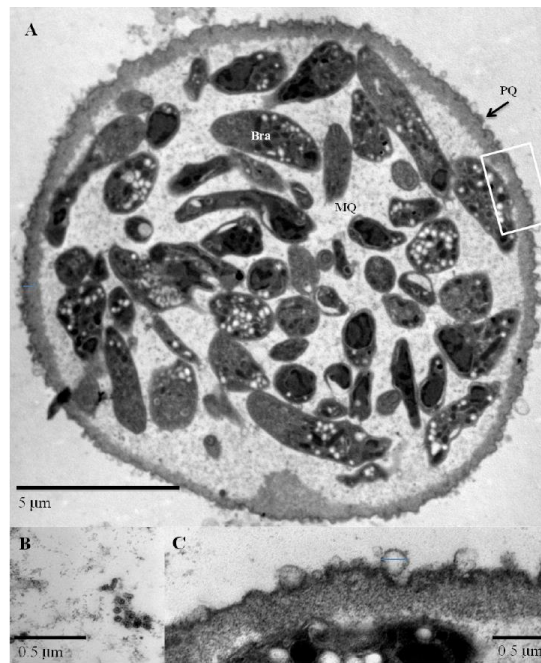


Figura 1. Vista general de un quiste tisular de la cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*. **A)** Corte ultrafino de quiste tisular, bradipozoitos (Bra), matriz quística (MQ) y la pared quística (PQ). **B)** Amplificación de matriz quística con estructuras vesiculares. **C)** Amplificación de la pared quística con vesículas asociadas. Las escalas están indicadas en cada imagen. Tomado de Hernández-Contreras (2012).

Los trabajos realizados para inducir a la cistogénesis *in vitro* de *T. gondii*, han ayudado a establecer métodos confiables para evaluar los cambios morfológicos y moleculares que sufre el parásito. En un reporte de nuestro grupo de trabajo, Castro-Elizalde *et al.* (2018) logró inducir la cistogénesis *in vitro* en parásitos intracelulares desde las 12 horas de proliferación mediante el tratamiento previo de taquizoitos extracelulares con ácido micofenólico (AMF). Los resultados demostraron que el AMF indujo la transformación de la VP en una estructura quística, en cuyo interior se alojan los parásitos y que tiene características estructurales similares a los quistes cerebrales del modelo de encefalitis murino. En este estudio, la glicoproteína CST1, presente en la pared quística, pudo ser identificada mediante la lectina de *Dolichos biflorus* (lectina DBA) acoplada a fluorocromos. Así mismo, se determinó que, durante el enquistamiento del parásito, se modifica la organización del citoesqueleto de microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios de vimentina, así como la organización de los orgánulos del hospedero como lo son las mitocondrias y el núcleo, para favorecer la formación de la nueva estructura quística. Adicionalmente, también se determinó que la membrana de la vacuola sufre modificaciones en las prolongaciones que se asocian con

el núcleo (Cruz-Mirón, 2021). Los estudios realizados en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la VP es una estructura que sirve como andamiaje para la construcción de la pared del quiste tisular de *T. gondii* y que a partir de la pared quística se llevan a cabo procesos de excreción/secreción. A la fecha, se desconoce la participación de las pirofosfatasa (PPasas) en el estadio de quiste tisular. Sin embargo, se conoce que *T. gondii* posee dos PPasas, una PPasa inorgánica de tipo I (TgPPasa) (Jamwal *et al.*, 2017) y una pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1) (Rodrigues *et al.*, 2000).

Las PPasas catalizan la hidrólisis del pirofosfato (PPi) a fosfato inorgánico (Pi), en presencia de cationes divalentes, frecuentemente Mg^{2+} (Heinonen, 2001). Se trata de una reacción exergónica que puede ser subsecuente a varias transformaciones bioquímicas desfavorables o poco favorables en energía, como la replicación del DNA, la síntesis de proteínas y el metabolismo de los lípidos (Maeshima, 2000). Las pirofosfatasa inorgánicas translocadoras de protones (H^+ -PPasas) son proteínas integrales de membrana (mPPasas) que se han estudiado ampliamente en plantas superiores, en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Drozdowicz *et al.*, 2000; Pérez-Castiñeira *et al.*, 2002) y, en algunos patógenos humanos como *Trypanosoma cruzi* (Scott *et al.*, 1998). En el caso de plantas, se ha identificado el funcionamiento de las H^+ -PPasas en condiciones de estrés por privación de agua, nutrientes, frío y salinidad (Zhang *et al.*, 2011). En bacterias y arqueas las H^+ -PPasas generan una fuerza iónica motriz para la síntesis de ATP y se han identificado en los procesos de transporte, especialmente durante el estrés y en condiciones de baja energía (García-Contreras *et al.*, 2004). Las H^+ -PPasas actúa en paralelo con la ATPasa translocadora de protones (H^+ -ATPasa) y otros transportadores y canales para garantizar la acidez y funcionalidad de organelos celulares como las vacuolas (Maeshima, 2000) y los acidocalcisomas en protozoarios donde se incluye *T. gondii* y en donde se ha propuesto el estudio de la H^+ -PPasa como una prometedor diana farmacológica contra parásitos protozoarios que afectan al humano (Docampo *et al.*, 2005; Luoto *et al.*, 2011). Los descubrimientos de abundantes reservas de polifosfato (PolyP) y de enzimas especializadas como las mPPasas, que hidrolizan el PPi en diversos parásitos y plantas, ha llevado a proponer que los enlaces fosfoanhídros de alta energía del PPi o del PolyP pueden servir como importantes fuentes de energía alternativas o complementarias en situaciones de estrés (McIntosh & Vaidya, 2002)

Dado que la TgVP1 se encuentra en la VP y que la vacuola es el origen de la pared quística, el estudio de los posibles cambios de la TgVP1 durante la formación del quiste tisular, su

contribución fisiológica a la función, así como, su participación en la viabilidad de los parásitos dentro de la estructura quística, son fenómenos biológicos de interés para nuestro grupo, ya que, permitirían ampliar el conocimiento sobre la biología de *T. gondii*. Adicionalmente, se tiene interés en la función que tendría la TgPPasa en los bradizoítos al interior del quiste tisular. Además, la evaluación de inhibidores específicos de las PPasas, podrían ser útiles para investigar el papel fisiológico de las enzimas en *T. gondii* y sus características bioquímicas y desde el punto de vista farmacológico, ser utilizadas en el tratamiento contra parasitosis causadas por: *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* y *T. gondii* (Hirono *et al.*, 2003). Aunque no se ha estudiado previamente el papel de las mPPasas en el proceso de enquistamiento de *T. gondii*, es probable que estas enzimas se encuentren desempeñando un papel fundamental en la pared quística como reservorios de energía o como parte de los componentes de la MVP, como en el caso de plantas en donde cumplen un papel importante como reservorios de energía durante periodos de latencia.

2. GENERALIDADES

T. gondii es la única especie del género *Toxoplasma* (**Fig. 2**). El nombre de la especie proviene de *Ctenodactylus gondii*, roedor del cual fue aislado por primera vez *T. gondii*. Otros parásitos incluidos en el orden Eucoccidiorida incluyen a *Isospora*, *Eimeria*, *Neosporum* y *Sarcocystis* (Galván-Ramírez & Mondragón-Flores, 2001).

Información taxonómica:

Nombre: *Toxoplasma gondii*

Posición taxonómica:

Linage: *Eukaryota*

Reino: Protista

Phylum: Apicomplexa

Super phylum: Alveolata

Super grupo: Sar

Clase: Conoidasida

Subclase: Coccidia

Orden: Eucoccidiorida

Suborden: Eimeriorina

Familia: Sarcocystidae

Género: *Toxoplasma*

Especie: *Toxoplasma gondii*

Figura 2. Información taxonómica del parásito *Toxoplasma gondii* (Schoch *et al.*, 2020).

T. gondii posee una única mitocondria, núcleo, un películo constituido por la membrana plasmática y el complejo membranal interno, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, apicoplasto, organelos de excreción/secreción y acidocalcisomas. Los acidocalcisomas son organelos ácidos con una membrana de 8 nm de espesor que en su interior albergan una alta concentración de fósforo (P) presente en forma de P_{Pi} y PolyP, calcio (Ca²⁺) y otros elementos como magnesio (Mg²⁺), potasio (K⁺), zinc (Zn²⁺), hierro (Fe²⁺), sodio (Na⁺) e incluso protones (H⁺) por lo que al ser observados por microscopía electrónica son identificados como organelos electrodensos (Docampo *et al.*, 2005). El descubrimiento de que las membranas de los acidocalcisomas contienen varias bombas e intercambiadores, se reportó inicialmente en tripanosomátidos y después de su identificación, los acidocalcisomas se encontraron en varios microorganismos incluyendo *T. gondii* (Moreno & Zhong, 1996), *Plasmodium* spp. (Luo *et al.*, 1999), el alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Ruiz *et al.*, 2001), la ameba *Dictyostelium*

discoideum (Marchesini *et al.*, 2002) en bacterias (Seufferheld *et al.*, 2004) y en plaquetas humanas (Ruiz *et al.*, 2004), lo cual indica que estos organelos se han conservado desde las bacterias hasta los seres humanos (Docampo *et al.*, 2005).

2.1. Formas parasitarias de *T. gondii*

Este patógeno presenta tres estadios que, como ya se ha comentado, están relacionados con el desarrollo de la infección.

2.1.1. Taquizoíto

Llamado así en referencia al termino griego *Ταχύτης* (que se translitera como tachýtis) y que significa “velocidad”, es el estadio que se distingue de los demás debido a su alto índice de replicación. Este parásito tiene forma de media luna y mide $\sim 2 \times 6 \mu\text{m}$ con un extremo anterior que termina en punta y un extremo posterior redondeado (**Fig. 3**) (Dubey *et al.*, 1998). Posee un complejo membranal interno (IMC) que en su conjunto forman el películo del parásito y organelos de secreción/excreción como los micronemos, que participan en el proceso de adhesión a la célula hospedero; las roptrias, que participan en el proceso de invasión y los gránulos densos, que participan en la formación de la VP. También cuenta con un complejo apical que incluye al conoide y al anillo apical y otros organelos funcionales incluyendo los acidocalcisomas (Chen *et al.*, 2015; Moreno & Zhong, 1996). Los taquizoítos, con su forma característica de media luna, se encuentra al interior de la VP en una organización intravacuolar en forma de roseta. Por lo tanto, la VP es el nicho de proliferación celular de taquizoítos (Castro-Elizalde *et al.*, 2018).

Estudios recientes sobre el citoesqueleto (Díaz-Martin *et al.*, 2022), revelaron que la naturaleza invasiva de los taquizoítos de *T. gondii* está estrechamente relacionada con las propiedades de su citoesqueleto, ya que está constituido por un grupo de componentes estructurales y dinámicos que desempeñan un papel clave durante la infección, como lo son las nanofibras, las cuales permiten la asociación entre el anillo apical polar y el conoide.

2.1.2. Bradizoíto

El término griego *βραδύς* (transliteración: *vrady's*) significa “lento” y se refiere a la etapa de replicación lenta de *T. gondii*, haciendo alusión a la etapa de proliferación lenta de los bradizoítos dentro del quiste tisular (Dubey *et al.*, 1998; Sullivan & Jeffers, 2011). Estructuralmente, los bradizoítos difieren de los taquizoítos, ya que el núcleo se encuentra situado hacia la parte posterior del parásito y las roptrias se observan más alargadas y electrodensas (**Fig. 3**), con un tamaño de $\sim 1,5 \times 7 \mu\text{m}$ (Mayoral *et al.*, 2020). Además, los bradizoítos en comparación con los taquizoítos, contienen un número mayor de gránulos de amilopectina y micronemos (Francia & Striepen, 2014). 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, BAG1 se encuentra en el citoplasma y se sintetiza en la etapa temprana de la diferenciación de *Toxoplasma* (**Fig. 3**); (Rivera Fernández & Mondragon Flores, 2010).

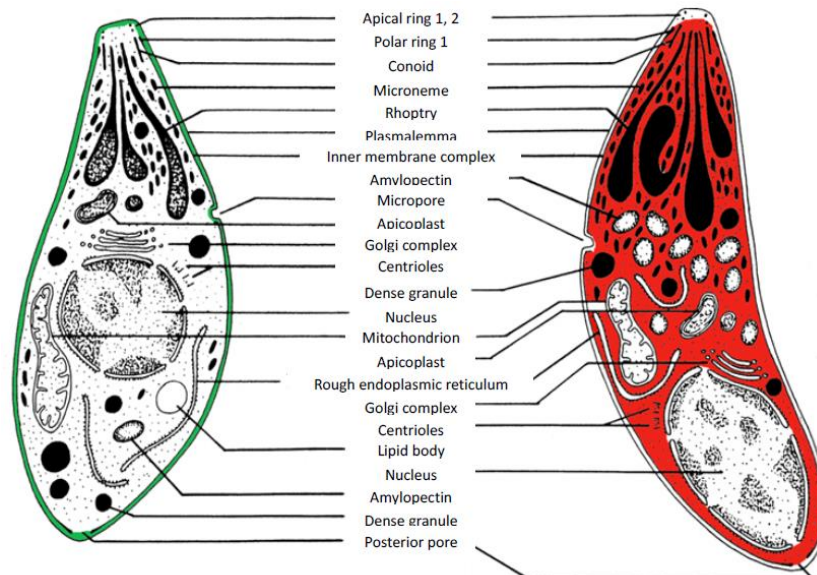


Figura 3. Morfología estructural del estadio de taquizoíto y bradizoíto. Se muestran los organelos presentes en el estadio de taquizoíto y bradizoíto, siendo: la localización del núcleo, el número de gránulos de amilopectina, micronemos y el tamaño de las roptrias, algunas de las principales diferencias estructurales que se observan en cada fase. La marca color verde en la periferia del taquizoíto, indica la localización de la proteína SAG1 la cual no se sintetiza en bradizoítos. En color rojo se encuentra representada la localización la proteína BAG1 en el estadio de bradizoíto. Tomado y modificado de Dubey *et al* (1998)

El bradizoíto es la forma crónica de infección de *Toxoplasma* y puede permanecer enquistado durante toda la vida en el hospedero sin que se dispare una respuesta inflamatoria (Torrey & Yolken, 2013). 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). Se cree que los bradizoítos persisten dentro de su hospedero durante la infección crónica mediante ciclos repetidos de ruptura de quistes tisulares, infección de nuevas células del hospedero y formación de nuevos quistes tisulares (Mayoral *et al.*, 2020).

2.1.3. Esporozoíto

El ooquiste inmaduro no infectivo se libera en las heces de los gatos infectados con *T. gondii*, los cuañes esporulan en el medio ambiente bajo condiciones adecuadas de humedad (40 a 60 % Hr) y temperatura (15 a 28 °C) en un lapso de 1 a 5 días, adquiriendo una forma ovoide con un tamaño de ~10 a 12 μm y conteniendo 8 esporozoítos infectivos. El esporozoíto es similar estructuralmente al taquizoíto, excepto por una mayor presencia de micronemos, roptrias y diversos componentes propios de esta forma parasitaria (Dubey *et al.*, 1998; Frenkel *et al.*, 1970; Gómez de León *et al.*, 2014).

2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* incluye la reproducción sexual y asexual del parásito. El desarrollo sexual sólo tiene lugar en los miembros de la familia Felidae como hospederos definitivos, mientras que la propagación asexual del parásito puede llevarse a cabo en una amplia gama de hospederos intermediarios, incluidos los seres humanos, animales de granja y todos aquellos animales de sangre caliente (**Fig. 4**). La reproducción sexual de *T. gondii* comienza en el intestino de los félidos al ingerir presas que alberguen quistes tisulares (Frenkel *et al.*, 1970). Tras la ingesta, los bradizoítos se liberan de los quistes, penetran en las células epiteliales del intestino delgado y se replican mediante varias rondas de merogonía durante 3 a 7 días (Dubey *et al.*, 2017). Tras la proliferación asexual intracelular, los merozoitos se diferencian en gametos masculinos (micro) y femeninos (macro) mediante gamogonía. Los microgametos se desplazan sobre la membrana celular a través de sus flagelos para fecundar a los macrogametos maduros.

La fusión de los micro y macrogametos forma un cigoto, que posteriormente se convierte en un ooquiste resistente al medio ambiente con una pared densa. Los ooquistes excretados en el medio ambiente por los felinos esporulan y forman dos esporoquistes, con cuatro esporozoítos cada uno (Dubey *et al.*, 1998) que son altamente infecciosos para los hospederos intermedios (Torrey & Yolken, 2013).

Los tres estadios infecciosos de *T. gondii* son: el taquizoíto, caracterizado por su rápida replicación, alta motilidad e infectividad, alojado al interior de las células infectadas en una 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 (Castro-Elizalde *et al.*, 2018).

La capacidad de *Toxoplasma* para cambiar entre el estadio de taquizoíto de rápida multiplicación (fase aguda de la infección) y la forma de quiste tisular latente que contiene bradizoítos (fase crónica de la infección); (**Fig. 4**), le permite al parásito propagarse en una amplia gama de hospederos (Min. Zhang *et al.*, 2013).

Como se muestra en la **figura 4**, los seres humanos pueden infectarse con *T. gondii* al ingerir carne cruda contaminada con quistes tisulares o por la ingesta de ooquistes en agua contaminada o en vegetales mal lavados; una vez dentro del organismo, *T. gondii* invade a las células epiteliales del intestino y se diferencia en el estadio de taquizoíto (Dubey *et al.*, 1998). Los taquizoítos pueden atravesar la barrera ocular, la barrera hematoencefálica, llegar al corazón, atravesar la placenta y afectar el crecimiento y desarrollo del feto o incluso inducir al aborto. (Hunter & Sibley, 2012). La toxoplasmosis en los seres humanos es particularmente preocupante en pacientes inmunocomprometidos y en mujeres en edad fértil que no han adquirido inmunidad contra este parásito, ya que, durante el embarazo, puede transmitirse al feto a través de la placenta (toxoplasmosis congénita). Las consecuencias de la toxoplasmosis congénita van desde: retraso mental, convulsiones, ceguera o muerte del neonato (Sullivan y Jeffers, 2011).

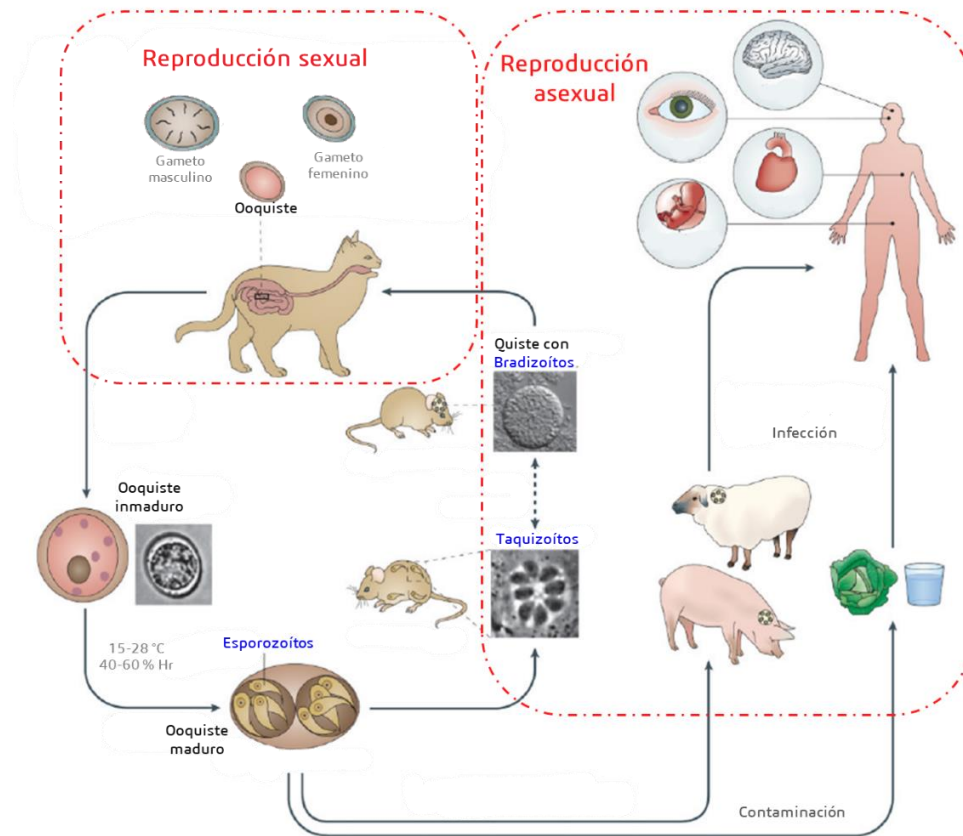


Figura 4. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. La replicación sexual de *T. gondii* se lleva a cabo en el hospedero definitivo (gato), dando inicio en el intestino de los felinos cuando ingieren presas que albergan quistes tisulares. Después de la replicación en los enterocitos del intestino (proceso conocido como merogonía), se forman gametos masculinos y femeninos dentro de la célula hospedero. La fusión de los gametos da lugar a la formación de ooquistes diploides que se desprenden en las heces del gato. Los ooquistes desprendidos en el medio ambiente esporulan en condiciones adecuadas de temperatura y humedad para constituir dos esporoquistes que contienen cuatro esporozoítos cada uno. Los ooquistes son capaces de sobrevivir en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo y pueden contaminar los alimentos y el agua, proporcionando una vía de infección para los hospederos intermediarios. En el hospedero intermediario se produce la replicación asexual. La infección aguda se caracteriza por taquizoítos de rápida replicación que se diseminan por todo el cuerpo. La diferenciación a bradizoítos dentro de quistes tisulares, conduce a una infección crónica. Tomado y modificado de Hunter y Sibley (2012).

2.2.1. Vías inmunitarias de la célula hospedero por los efectores de *T. gondii*

T. gondii posee tres organelos secretores principales: los micronemos que secretan a las proteínas MIC involucradas en la adhesión a la célula hospedera, las roptrias que secretan a las proteínas ROP y los gránulos densos que secretan las proteínas GRA. Las proteínas ROP se secretan directamente en el citosol de la célula hospedero en el momento de la invasión. ROP16 activa los factores transductores y activadores de la transcripción (STAT) STAT6 y STAT3

para aumentar las respuestas antiinflamatorias tipo macrófago M2 (**Fig. 5**). El complejo de ROP17, ROP18 y ROP5 se dirige a la MVP, donde antagonizan las proteínas de defensa del hospedero, las GTPasas relacionadas con el sistema inmunitario (IRG) y las proteínas de unión a guanilato (GBP); (Etheridge *et al.*, 2014; Matta *et al.*, 2021).

En la adhesión al hospedero, participan las proteínas MIC2, MIC3 y MIC4 secretadas por los micronemos, mientras que MIC6 y MIC8 funcionan como moléculas de escolta. Posteriormente, se produce la secreción de las proteínas ROP en las proximidades de la membrana del hospedero, como estrategia para facilitar la entrada del parásito, el cual se ubicará dentro de una vesícula endocítica que posteriormente se transformará en una VP naciente (Ramírez-Flores *et al.*, 2020). Por otra parte, las proteínas GRA se secretan después de la invasión desde el interior de la VP (Cygan *et al.*, 2020). GRA15 reside en la MVP, donde activa el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), el cual es un complejo proteico que controla la transcripción del DNA. GRA15 también es detectado por el inflammasoma NLRP3 que se encuentran principalmente en macrófagos, monocitos, células dendríticas, el inflammasoma está formado por un sensor de tipo NOD (NLR), la proteína adaptadora asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasas (ASC), y la proteasa caspasa-1, para impulsar la secreción de interleucinas (IL- β), dando lugar a la respuesta inflamatoria (Gov *et al.*, 2013; Matta *et al.*, 2021) (**Fig. 5**). Otras proteínas GRA se exportan más allá de la MVP pasando por un complejo proteico MYR1, MYR2 y MYR3 (denominadas así por su efecto sobre la regulación de c-Myc en el hospedero), en un proceso que también depende de ROP17, una proteína cinasa de serina/treonina que fosforila proteínas del hospedero (Cygan *et al.*, 2020). Los GRA exportados suelen pasar al núcleo de la célula hospedero donde alteran la transcripción. GRA16 y el regulador génico inductor de EZH2 asociado a *Toxoplasma* E2F4 (TEEGR) o el inductor de la ciclina E del hospedero (HCEI) activan la transcripción de los genes del hospedero para el crecimiento y el metabolismo celular que, a su vez, también apoyan el crecimiento del parásito. Mientras que GRA24 activa la p38 MAPK para aumentar la respuesta inmunitaria protectora (Matta *et al.*, 2021).

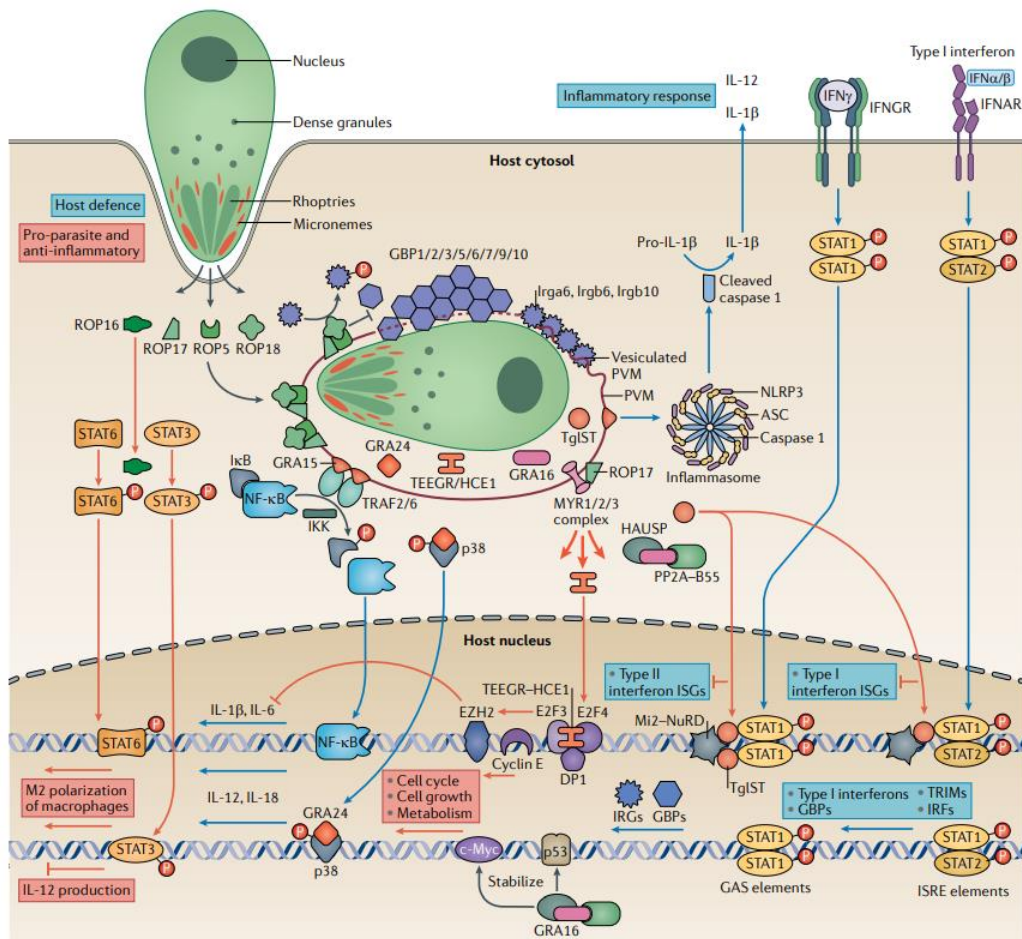


Figura 5. Regulación de las vías inmunitarias celulares del hospedero derivado de los efectores de la infección de *T. gondii*. Durante la invasión de la célula hospedero, *T. gondii* excreta/secretora proteínas efectoras a partir de los micronemos (MICs), las roptrias (ROPs) y los gránulos densos (GRAs) para establecer un nicho intracelular dentro de la vacuola parasitófora. Estas proteínas secretoras también tienen un papel clave en la modulación de las respuestas inmunitarias del hospedero activando distintas vías de señalización. Tomado de Matta *et al* (2021).

Los interferones de tipo I (IFN α , IFN β) se unen a los receptores de la superficie celular (**Fig. 5**) y dan lugar a la fosforilación por la Janus quinasa (JAK) de los factores 1 y 2 del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT). Los heterodímeros STAT1-STAT2 fosforilados forman un complejo con el factor 9 regulador de IFN (IRF-9) y se dirigen al núcleo, donde se unen a los elementos de respuesta estimulado por interferón (ISRE) en la parte superior de los genes regulados (Platanias, 2005). Del mismo modo, la participación de los receptores de interferón de tipo II (IFN- γ) da lugar a la fosforilación de STAT1 para formar homodímeros que reconocen secuencias activadas por γ (GASs) en la parte superior de los genes regulados. El inhibidor de la transcripción STAT1 de *T. gondii* (TgIST) es un efector

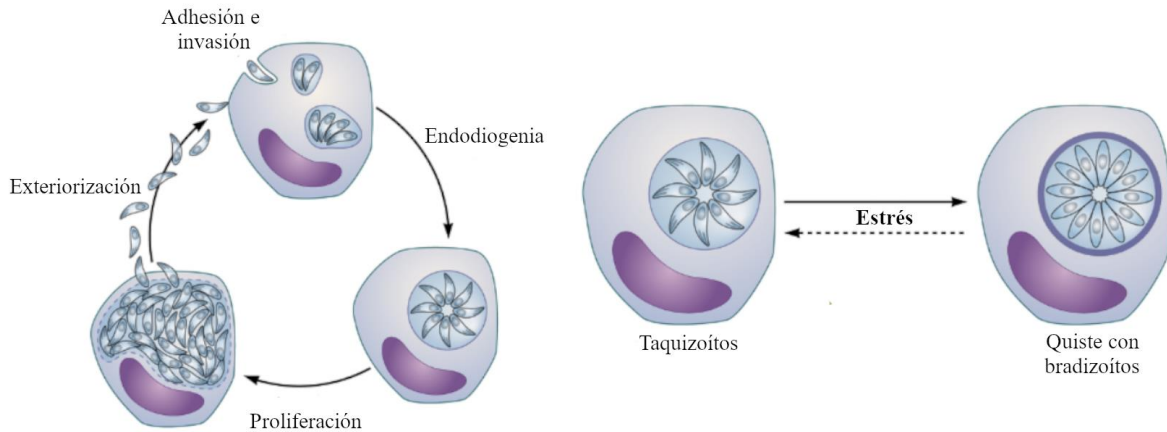
central del parásito que bloquea la transcripción regulada por STAT1 para inhibir la expresión de los genes estimulados por el interferón de tipo I (interferón- α/β (IFN α/β)) y de tipo II (IFN- γ) y por tanto proporciona una protección global contra las defensas del hospedero (Matta *et al.*, 2021).

2.3. Vacuola parasitófora

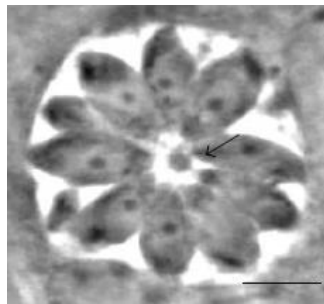
La invasión de la célula hospedero por *T. gondii* implica la acción concertada de la secreción de proteínas junto con la motilidad activa (**Fig. 6**), la adhesión a la célula y la invasión, todo ello impulsado por el citoesqueleto de actina-miosina del parásito (Sibley, 2010). Durante la invasión, el parásito invagina la membrana plasmática de la célula hospedero para generar la VP en la que se replicará, esto a partir de la secreción de proteínas de los organelos secretores como micronemos, roptrias y gránulos densos que participan en la adhesión, invasión y formación de la VP, respectivamente (Fox *et al.*, 2019). Una vez formada la VP, las proteínas GRA provenientes de los gránulos densos son: a) son secretadas en el espacio intravacuolar, permaneciendo algunas de ellas como proteínas solubles residentes, b) algunas se insertan en la MVP, en la que algunas de estas proteínas se organizan para formar poros para la adquisición de nutrientes de la célula hospedero; c) otras se organizan en una IVN, en la que GRA1, GRA2 y GRA6 participan activamente y d) otras proteínas GRA se dirigen al núcleo de la célula hospedero para modificar la reprogramación de la misma. GRA1, que es secretada en forma soluble, se asocia periféricamente a la IVN mientras que GRA2 se secreta dentro de vesículas liberadas desde la membrana del parásito y GRA6 estabiliza la IVN de nanotúbulos y de alguna manera limita la presentación del antígeno y reduce la respuesta de las células CD8 (Carlos. Ramírez-Flores *et al.*, 2019)

La membrana que delimita la VP se forma en el momento de la invasión a partir de los componentes de la membrana de la célula hospedero y de los productos secretados por el parásito (**Fig. 6b**); una vez instalada dentro de la célula hospedero, la VP se asocia con los filamentos intermedios y los microtúbulos de la célula (Halonen & Weiss, 2013). Adicionalmente, se presenta la asociación de las mitocondrias y el retículo endoplásmico de la célula hospedero con la MVP (Sinai & Joiner, 2001) y la formación de invaginaciones de la membrana, basadas en microtúbulos del hospedero, denominadas estructuras tubulares de secuestro del huésped (HOSTs por *Host Sequestering Tubulo- structures*) que funcionan como

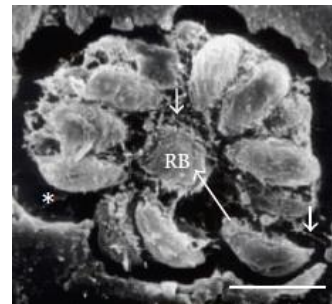
conductos para la adquisición de nutrientes desde el citoplasma del hospedero hasta el lumen de la VP (Mordue *et al.*, 1999). La MVP puede tener una transformación posterior en la pared celular de un quiste tisular intracelular (Castro-Elizalde *et al.*, 2018). Sin embargo, las funciones precisas de la mayoría de estas proteínas GRA siguen sin determinarse.



a



b



c

Figura 6. Formación de la vacuola parasitófora. **a)** Durante la infección de *T. gondii*, los taquizoítos invaden la célula hospedero y forman la vacuola parasitófora (VP). El parásito se replica exponencialmente mediante endodiogenia dentro de la VP lo que lleva a la lisis de la célula y a la exteriorización de los parásitos. El estrés inmunológico obliga a los taquizoítos que se encuentran en la VP a diferenciarse en quistes tisulares que albergan el estadio de bradizoíto. Modificado de Zhang *et al* (2013). **b)** Micrografía por contraste de fases mostrando una roseta de taquizoítos intravacuolares, señalando con la flecha el cuerpo residual. **c)** Micrografía SEM-Tanaka de una roseta, el asterisco (*) indica la periferia del VP. Escala= 5µm Tomado de Muñiz-Hernández *et al* (2011).

Los taquizoítos utilizan una forma única de división celular asexual en la VP conocida como endodiogenia (**Fig. 6a**), en la que se forman dos células hijas al interior de una célula madre, esto ocurre mediante una mitosis especializada de división del núcleo y los organelos dentro del citoplasma de la célula madre (Blader *et al.*, 2015). Cada endodiogenia ocurre entre 6 y 8 h y continúa sucesivamente dentro de la célula madre hasta alcanzar entre 32 y 64 progenies por vacuola, lo que lleva a la sobresaturación y ruptura de la célula hospedero, completando así una ronda del proceso del ciclo lítico (Striepen *et al.*, 2007). Después de la tercera división, los taquizoítos se organizan en rosetas alrededor del cuerpo residual (RB por *Residual Body*), el cual posee un diámetro de $1.43 \mu\text{m} \pm 1.0 \mu\text{m}$ (**Fig. 6b y c**). La zona de interacción entre el RB y el extremo posterior de los taquizoítos ha sido reportada en nuestro grupo de trabajo (Muñiz-Hernández *et al.*, 2011).

La VP alberga únicamente a los taquizoítos y evita la acidificación y fusión con los lisosomas, funcionando como un filtro molecular permitiendo el paso bidireccional de moléculas menores a 15 kDa (Min. Zhang *et al.*, 2013).

2.4. Quiste tisular

Durante el ciclo de vida de *T. gondii*, los taquizoítos se diferencian en bradizoítos para formar los quistes tisulares que serán albergados en todos los tejidos del hospedero infectado, pero predominantemente en el sistema nervioso central y los músculos (Dubey, 1998). El quiste tisular está limitado por una pared gruesa que se forma aparentemente a partir de la membrana de la VP y que contiene los bradizoítos. Un quiste tisular inmaduro puede medir desde $5 \mu\text{m}$ de diámetro y contener dos bradizoítos mientras que un quiste maduro puede medir de 50 a $70 \mu\text{m}$ de diámetro y albergar de 1,000 a 2,000 bradizoítos en su interior (Castro-Elizalde, 2015; Mayoral *et al.*, 2020).

El quiste se compone principalmente de la pared y la matriz quísticas. La pared es rica en carbohidratos como la N-acetil galactosamina y N-acetilglucosamina y se encuentra cargada negativamente, además, posee $\sim 0.5 \mu\text{m}$ de grosor y una permeabilidad que permite el intercambio de moléculas de hasta 10 kDa. Aunque la pared quística puede ser destruida por pepsina o tripsina, los organismos intraquísticos son resistentes a los jugos gástricos del hospedero (pepsinaHCl); (Dubey, 2020). Además, presenta una glicoproteína denominada CST1 utilizando la lectina DBA acoplada a FITC, con ubicación abundante en la pared quística,

y que ha sido ampliamente utilizada como un monitor de la pared del quiste tisular, incluyendo nuestro grupo de trabajo (Castro-Elizalde *et al.*, 2018), otra proteína de abundante concentración en la pared es GRA5 y en menos proporción GRA1, GRA3 y GRA6 (Dzierszinski *et al.*, 2004; Mayoral *et al.*, 2020). Proteínas como MAG1, MCP4, BCP1 y varias proteínas de gránulos densos también se han localizado en la pared del quiste (Tu *et al.*, 2020).

La matriz intraquística está compuesta por dos fases, una compacta y rígida y otra más esponjosa. Estas dos fases de la matriz intraquística presentan un material filamentososo y vesicular, esto determinado por el tamaño que presentan las vesículas ya que las pequeñas oscilan entre 50 y 140 nm de diámetro mientras que las grandes presentan una cobertura densa en su superficie externa y miden entre 250 y 700 nm de diámetro (Lemgruber *et al.*, 2011).

El enquistamiento está reconocido como un evento central en la patogénesis, la persistencia y la transmisión de la toxoplasmosis. Estudios realizados *in vivo* han demostrado que el tamaño del quiste tisular depende de su madurez, el tipo de célula hospedero y del método citológico utilizado para hacer la medición (Tu *et al.*, 2019). El quiste en miocitos es 2 a 3 veces más grande que aquellos en células neurales. Mediciones hechas en quistes extraídos de cerebros mostraron un crecimiento uniforme las primeras 10 semanas, después de las cuales se presenta variabilidad en tamaño, debido a una segunda generación de quistes tisulares. El quiste puede alcanzar hasta 60 μm de diámetro y contener unos 60,000 bradizoítos. El tamaño de los quistes puede variar dependiendo de la cepa de *T. gondii* (Dubey *et al.*, 1998). En cerebro, no suelen pasar de los 70 μm de diámetro y generalmente tienen una forma esférica, mientras que en tejido muscular pueden llegar a medir hasta 100 μm y son ovoides (Dubey, 2020).

La identificación de estadios por reconocimiento de antígenos específicos es una herramienta utilizada para evaluar las modificaciones que sufre *T. gondii* durante el proceso de cistogénesis ya que aparte de CST1, otros antígenos, mostrados en la **tabla 1**, pueden ser empleados como monitores durante la cistogénesis.

Tabla 1. Antígenos reportados en el proceso de cistogénesis

Nombre del antígeno	Localización reportada por inmunofluorescencia
BAG1 (hsp30)	Citoplasma
BAG5	Citoplasma
BSR4 (p36)	Superficie
SAG4	Superficie
MAG1	Matriz
P21/p21	Superficie
P43/p34	Superficie
CST1	Pared quística

2.4.1. Enquistamiento *in vivo*

Como resultado de la proliferación del parásito en el organismo, se excretan-secretan componentes del parásito que son detectados por el sistema inmunitario de defensa del hospedero, generando la activación de una respuesta inmune con la producción de anticuerpos (no protectores) así como la activación de células T con liberación de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α); (**Fig. 7**). El IFN- γ es una citocina fundamental en la respuesta inmunitaria que tiene numerosas actividades biológicas, entre ellas: la activación de macrófagos y células *natural killer* (NK), la inducción de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y la inhibición de la respuesta celular de tipo II; siendo las células NK y los linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) las principales fuentes de IFN- γ (Filisetti y Candolfi, 2004).

El IFN- γ es reconocido por un único receptor, el Receptor para Interferón-gamma (RIFN-g), el cual se encuentra en la mayoría de los tejidos del organismo; como consecuencia de la unión del IFN- γ a su receptor ocurren diversos eventos que tienen como única finalidad la atenuación de la toxoplasmosis. Se ha descrito en macrófagos que al unirse el IFN- γ a su receptor se estimula la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y al óxido nítrico sintasa inducible (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 de *T. gondii*, modificando la VP en un quiste tisular (Yarovinsky, 2014). Por otra parte, 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* detecta la presencia de óxido nítrico que es altamente tóxico y tiene la capacidad de destruir al parásito e inducir la producción de quistes (Sa *et al.*, 2018). La presencia de IFN- γ es detectada por los taquizoítos intracelulares activando su diferenciación a la forma del bradizoíto, generando un quiste tisular (**Fig. 7**). El quiste tisular es una estructura redondeada rígida, rica en carbohidratos que genera una cubierta tipo quitinosa, resistente a cualquiera de los mecanismos efectores de la respuesta inmune tanto celular como molecular, así como al efecto de fármacos anti-parasitarios (Cruz-Mirón *et al.*, 2021).

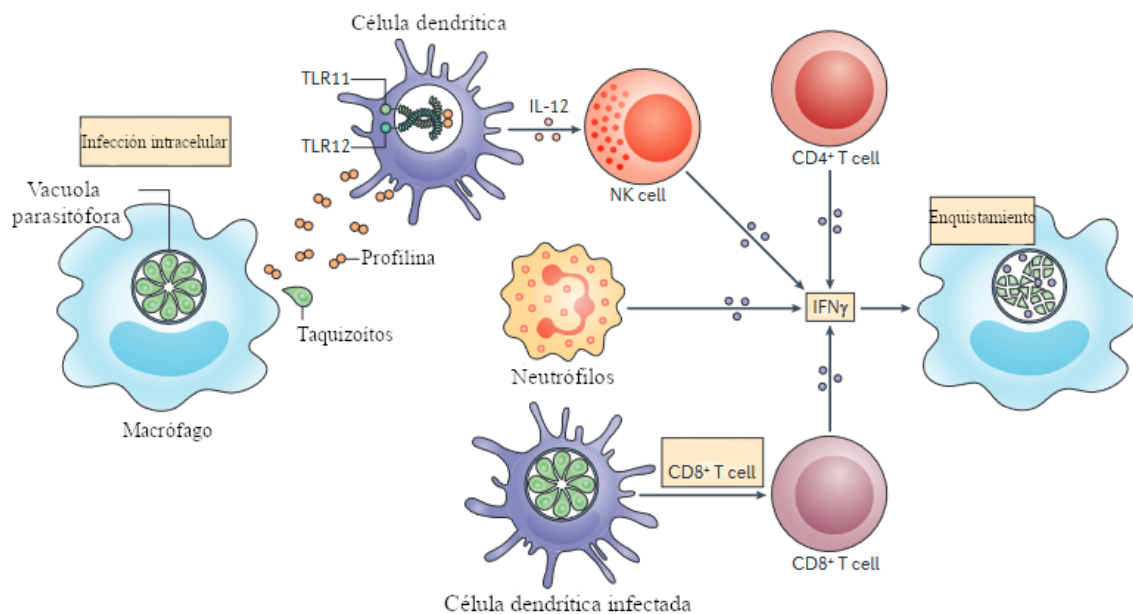


Figura 7. Fuentes celulares de IFN- γ durante la infección por *T. gondii*. El interferón- γ (IFN- γ) es crucial para la supervivencia durante la infección por *Toxoplasma gondii*. La producción de esta citocina por parte de las células NK depende del reconocimiento de la profilina de *T. gondii* por parte de las células dendríticas regulado por el receptor TLR11. Tanto el IFN- γ derivado de las células T CD4⁺ como de las células T CD8⁺ son esenciales para la resistencia a *T. gondii* durante la fase crónica de la infección. Los neutrófilos constituyen una importante fuente innata de IFN- γ que al ser detectado por la vacuola parasitófora limita la replicación del parásito e induce la formación de quistes. Tomado y modificado de Yarovinsky (2014).

Otra molécula que ha sido reportada como atenuante de 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 coestimuladora 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 (Sa *et al.*, 2018; Sullivan & Jeffers, 2011).

2.4.2. Inducción al enquistamiento *in vitro*

Se han reportado diversas estrategias experimentales para inducir el enquistamiento de *T. gondii* de manera *in vitro*, todas consisten en mantener al parásito extracelular bajo condiciones de estrés. Se han utilizado diferentes líneas celulares como células Vero, fibroblastos de prepucio humano (HFF-1), macrófagos murinos, neuronas de rata, astrocitos y microglía las cuales se han invadido con parásitos de diferentes cepas de *T. gondii* como RH, ME49, NTE, PLK, VEG, algunas cepas exóticas como: COUG, CAST, GPHT, MAS, FOU (Ferreira Da Silva *et al.*, 2008) así como, células epiteliales humanas de carcinoma de laringe (HEp-2) con la cepa RH (Castro-Elizalde *et al.*, 2018).

Algunas de las estrategias experimentales que se han utilizado para inducir el enquistamiento (Sullivan & Jeffers, 2011), consisten en mantener a las células infectadas con *T. gondii* en condiciones de estrés, tales como: cultivo celular en condiciones de pH alcalino (8.0 a 8.2), aunque en esta condición, la célula hospedero se ve afectada por las condiciones del medio, limitando así la caracterización de los cambios celulares. Por otra parte, la exposición de parásitos de *T. gondii* en condiciones de estrés inducido por intoxicación con nitroprusiato de sodio, es otro método empleado que actúa como fuente de óxido nítrico exógeno (NO), inhibiendo las proteínas involucradas en la cadena respiratoria de la única mitocondria de *T. gondii*; sin embargo, esto podría afectar la viabilidad del parásito (Fox *et al.*, 2019). La temperatura también es utilizada como una estrategia para la inducción *in vitro* de la cistogénesis, la cual consiste en mantener a las células no infectadas por 2 h a 34 °C para adquirir tolerancia térmica. Posteriormente, se genera un choque térmico al colocar las células a 37 °C por 2 h y es en este punto en donde se realiza la infección con taquizoítos extracelulares. Transcurrido el tiempo de la infección, el cultivo es mantenido a 43 °C de 12 a 48 h y finalmente regresadas a 37 °C. Bajo estas condiciones se ha reportado que a partir de las 48 h es posible observar estructuras quísticas similares a la línea ME49. Sin embargo, la eficiencia y reproducibilidad del método es bajo (Soête *et al.*, 1994).

El estrés nutricional también puede inducir el enquistamiento del parásito, la limitación de nutrientes como arginina bloquea la replicación de *T. gondii* y dispara la diferenciación a bradizoítos y la formación de quistes, esto debido a que *T. gondii* carece de la enzima necesaria para sintetizar arginina *de novo* y requiere por lo tanto incorporar este aminoácido de la célula hospedero para su propio metabolismo (Fox *et al.*, 2019). La exposición a fármacos antiparasitarios y compuestos químicos como la pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, espiamicina, hidronaftoquinonas y macrólidos de nueva generación, afectan la replicación del parásito e inducen la cistogénesis (Ribeiro *et al.*, 2017).

La presencia de la citocina IFN- γ en el cultivo celular infectado, es otro método empleado que limita la replicación del parásito e induce la formación de quistes de manera *in vitro*, debido a la disminución de arginina (R) y triptófano (W) e induciendo la producción de óxido nítrico (Sinai & Joiner, 2001; Soète & Dubremetz, 1996). En nuestro grupo (Cruz-Mirón, 2021), recientemente se encontró que la exposición de taquizoítos extracelulares con IFN- γ y posterior infección celular, dispara el proceso de enquistamiento (**Fig. 8**).

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 de manera *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 en conjunto con una 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).

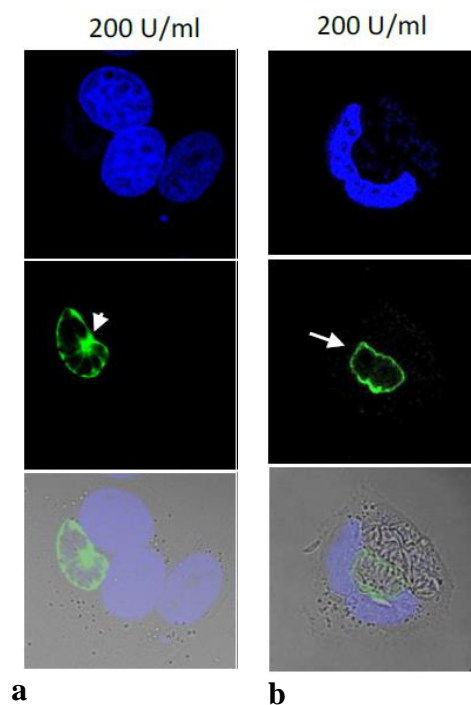


Figura 8. Expresión de CST1 en VP de taquizoítos expuestos a 200 U/mL de IFN- γ . Se muestra la expresión de CST1 a las **a)** 48 h de proliferación. **b)** 72 h de proliferación. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. Los núcleos de las células HEp-2 se encuentran teñidos con DAPI en color azul. El enquistamiento fue monitoreado por la expresión de CST1, detectado con la lectina de *D. biflorus*-FITC. Tomado de Cruz-Mirón (2021).

La inhibición de la síntesis *de novo* de los nucleótidos de purina también es un importante inductor del enquistamiento en *T. gondii*. En un reporte previo de nuestro grupo, Castro-Elizalde *et al* (2018) lograron inducir la cistogénesis *in vitro* en parásitos intracelulares desde las 12 horas de proliferación (**Fig. 9**), mediante el tratamiento de taquizoítos extracelulares con MPA. El MPA es un fármaco utilizado en clínica como un potente inmunosupresor que bloquea la síntesis *de novo* de purinas en los linfocitos al inhibir a la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). Este compuesto es derivado de la fermentación del hongo *Penicillium stoloniferum* y especies relacionadas, a los cuales se les han atribuido varias propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antitumorales, antipsoriásicas, antirreumáticas e inmunosupresoras. En *T. gondii*, se han encontrado dos isoformas de la IMPDH y se demostró que son esenciales para el metabolismo de purinas en el parásito que se sabe, es auxótrofo para los nucleótidos de purina y es dependiente de la ruta de salvamento (Castro-Elizalde *et al.*, 2018).

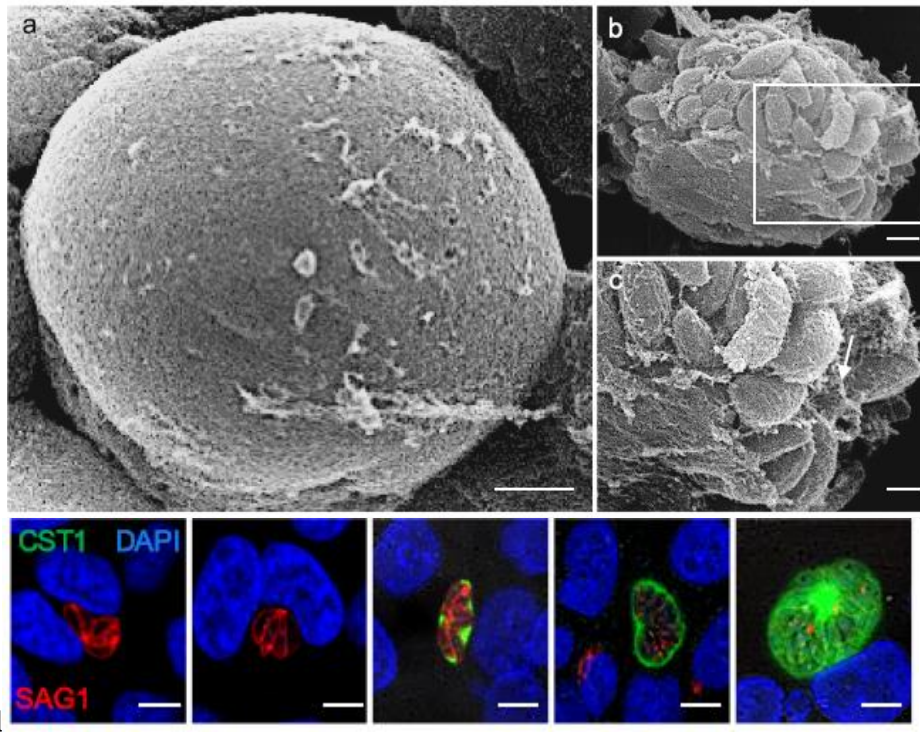


Figura 9. Morfología de quistes inducidos de manera *in vitro* con ácido micofenólico. **a)** Morfología de un quiste obtenido después de 10 días de proliferación de taquizoítos extracelulares pretratados con MPA barra= 2 μm . **b y c)** quiste sin pared quística mostrando las disposiciones intravacuolares de los parásitos barra= 1 μm . **a, b y c)** corresponden a micrografías SEM. **d)** Coexpresión de CST1/SAG1 y BAG1/SAG1 durante la formación de estructuras tipo quiste. Micrografías confocal en células HEP-2 invadidas por taquizoítos extracelulares pretratados con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MPA. Tomado de Castro-Elizalde *et al* (2018).

Recientemente se completó una caracterización del proteoma de la pared del quiste de *Pru* $\Delta\text{ku}80 \Delta\text{hxgprt}$ (*Pru*) utilizando espectrometría de masas de fragmentos de membrana de la pared del quiste inmunoprecipitados *in vitro* (Tu *et al.*, 2019). Este análisis dio lugar a un inventario de proteínas de la pared del quiste no descritas anteriormente (CST2/GRA50, CST3/GRA51, CST4, CST5/GRA52, y CST6/GRA53), lo que reveló que CST2 desempeña un papel en la virulencia del parásito. La identificación de otras proteínas de la pared del quiste ha proporcionado más información sobre la composición de la pared del quiste; sin embargo, aún se desconoce si estas proteínas son importantes para la formación de la pared del quiste y cómo lo son. Además, las interacciones moleculares de los componentes de la pared quística siguen sin estar claras (Tu *et al.*, 2020).

2.5. Cepas clonotípicas de *T. gondii*

T. gondii tiene una poblacional inusual que comprende tres linajes clonales, denominados 1, 2 y 3, que se encuentran ampliamente extendidos en Norteamérica y Europa (Sibley & Ajioka, 2008). Recientemente, se ha descrito un cuarto linaje clonal y las cepas de este genotipo (denominado haplotipo 12) parecen ser más comunes en los animales silvestres que en los domésticos en Norteamérica (Khan *et al.*, 2011). Las cepas de *T. gondii* son mucho más diversas en otras regiones, especialmente en América del Sur, donde los distintos linajes no clonales muestran una evidencia mucho mayor de interacción (Behnke *et al.*, 2020). La estructura global de la población de *T. gondii* se ha comparado recientemente utilizando una variedad de métodos de tipificación en donde analizaron ~950 cepas independientes agrupándolos en 16 haplogrupos que comprenden 6 clados principales (Su *et al.*, 2012).

Sin embargo, existen tres tipos de cepas clonotípicas de *T. gondii* mayormente empleadas en nuestro grupo, las cuales presentan distinto nivel de virulencia y algunas de ellas son productoras de quistes:

- La cepa RH corresponde a la población clonotípica de tipo I, la cual presenta un alto grado de virulencia y tiene rápida diseminación y proliferación. Anteriormente se había reportado que era una cepa no formadora de quistes (Selseleh *et al.*, 2013). Sin embargo, nuestro grupo demostró que esta cepa puede producir estructuras quísticas a partir de la inducción con ácido micofenólico (Castro-Elizalde *et al.*, 2018) y con inducción a partir de IFN- γ (Cruz-Mirón, 2021).
- La cepa ME49 corresponde a la cepa clonotípica de tipo II que se caracteriza por poseer una baja virulencia y se ha reportado como una cepa formadora de quistes tisulares en ratones inoculados vía oral. Las cepas tipo II son las comúnmente asociadas con toxoplasmosis humana (Kim & Weiss, 2004; Sibley *et al.*, 2009). En cultivo celular, puede mantenerse como taquizoítos, aunque su crecimiento es muy lento y con una muy baja invasividad. Debido a la dificultad de su mantenimiento *in vitro*, es poco utilizada en ensayos de proliferación y cistogénesis *in vitro* (Sibley *et al.*, 2009). Esta cepa se utilizó en el presente trabajo con el fin de conocer la distribución de las PPasas en quistes tisulares obtenidos de cerebro de ratón.
- La cepa PRUGNIAUD (PRU), corresponde a una población clonotípica del tipo III de *Toxoplasma* que se caracteriza por poseer baja virulencia y una lenta replicación. Esta cepa ha sido ampliamente reportada con una alta predisposición al enquistamiento *in vivo* e *in*

vitro. Su capacidad invasiva, aunque limitada, es superior a la de la cepa ME49 en condiciones de cultivo *in vitro* a pH de 8.2 (Soête & Dubremetz, 1996).

2.6. Pirofosfato y pirofosfatasa

El pirofosfato inorgánico (PPi) es el compuesto químico más simple que contiene una unión fosfoanhídrido de alta energía. Debido a la alta afinidad del PPi por el Mg^{2+} ($\log K_s = 6.0$) y dado que la concentración de este catión es relativamente alta en el citosol. La forma mayoritaria del PPi probablemente se encuentra formando un complejo 1:1 con este metal (Canfield *et al.*, 2005). La concentración de PPi en células animales tiende a ser baja (0.1 y 2 mM), mientras que, en el citoplasma de células vegetales se encuentran entre 0.2 a 0.3 mM (Weiner *et al.*, 1987), lo que también es cierto para sistemas bacterianos y de levadura. Por otra parte, se ha reportado que, en mitocondrias, donde hay mayor contenido de PPi, la concentración oscila en ± 0.2 mM, en vacuola ± 2.2 μ M y en cloroplastos menos de 1 μ M (Takeshige & Tazawa, 1989). Estos valores de PPi, son comparables a los de otros intermediarios del metabolismo energético, tales como el ATP (2 a 10 mM); (Kajander *et al.*, 2013; Rea & Poole, 1993).

El PPi es un metabolito omnipresente en las células, catalogado como un subproducto del anabolismo que puede ser generado por diversas reacciones biosintéticas (Heinonen, 2001), como: **1)** Activación de ácidos carboxílicos ($ATP + R-COO + \text{CoenzimaA} \rightarrow R-CO-CoenzimaA + AMP + PPi$); **2)** Síntesis de aminoacil-tRNA ($ATP + \text{un aminoácido} + tRNA \rightarrow \text{aminoacil-tRNA} + AMP + PPi$); **3)** Síntesis de coenzimas: biosíntesis de NAD ($ATP + \text{deamidoNAD}^+ + \text{amoníaco} \rightarrow \text{NAD}^+ + AMP + PPi$ o $ATP + \text{deamidoNAD}^+ + \text{L-glutamina} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{L-glutamato} + AMP + PPi$); **4)** Síntesis de fosfoenolpiruvato en la fotosíntesis C4 ($ATP + \text{piruvato} + \text{ortofosfato} \rightarrow \text{PEP} + AMP + PPi$); **5)** Activación del sulfato ($ATP + \text{sulfato} \rightarrow \text{APS} + PPi$); **6)** Síntesis de pirofosfato *de novo* mediante la síntesis de PPi utilizando la fuerza motriz de protones ($2 \text{ ortofosfato} \rightarrow \text{PPi} + \text{H}_2\text{O}$); entre otras reacciones, mostradas en el **anexo I**. Sin embargo, la acumulación en grandes cantidades del PPi es tóxica para las células, probablemente porque un alto nivel de PPi es desfavorable para las reacciones que generan este compuesto. (Farquharson, 2018). Un mecanismo común para regular los niveles de PPi es la hidrólisis catalizada por las PPasas (McIntosh & Vaidya, 2002).

En diversos microorganismos, la ruta de glucólisis incluye reacciones dependientes de PPi. Por ejemplo, en algunas bacterias, la vía glucolítica principal requiere enzimas, como la fosfofructo-1-fosfotransferasa (PFK) y la piruvato-fosfato dicinasa (PPDK), que acoplan la reacción de hidrólisis de PPi para favorecer las reacciones que catalizan. Aparentemente, la glucólisis dependiente de PPi es una ruta alternativa en bacterias fermentadoras ante situaciones donde los niveles de ATP son bajos (Heinonen, 2001). Sin embargo, también se ha encontrado en varios parásitos apicomplejos, como *T. gondii* y *Cryptosporidium parvum*, la expresión de la PFK, que consume PPi para impulsar la fosforilación de la fructosa-6-fosfato (Yang *et al.*, 2022a). *T. gondii* utiliza el PPi en lugar del ATP como donante de energía en al menos dos reacciones: en la PFK y en la translocación de H⁺ en acidocalcisomas con la pirofosfatasa vacuolar translocadora de protones (V-H⁺-PPasa) (Pace *et al.*, 2011).

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), las PPasas son enzimas con actividad de hidrolasa (EC 3.6.1.1) que catalizan la hidrólisis del pirofosfato celular, de acuerdo con la siguiente reacción: PPi ↔ 2Pi (IUBMB, 2021). La energía de disociación del enlace fosfoanhídrido hidrolizado durante la síntesis de PPi (**Fig. 10**), aumenta el carácter exergónico de este proceso en comparación con la reacción de producción de ortofosfato, debido a la sobreestabilización del PPi por uno o dos cationes de Mg²⁺ que interactúan de manera eficiente con el PPi, formando complejos 1:1 y 1:2, respectivamente.

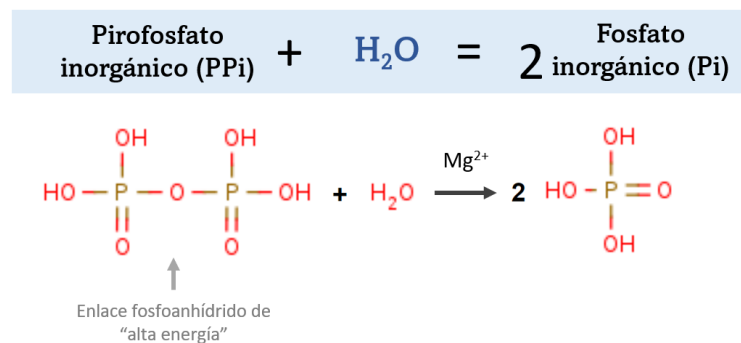


Figura 10. Esquema de reacción de las pirofosfatasas. Se muestra la hidrólisis reversible del enlace fosfoanhídrido del PPi

Las PPasas requieren del ion Mg^{2+} para su funcionamiento y son clasificadas en tres grupos independientes de acuerdo con su función, estructura y actividad catalítica: Familia I, Familia II y pirofosfatasas integrales de membrana (mPPasas). Las Familias I y II son pirofosfatasas solubles (sPPasas) no relacionadas evolutivamente (Holmes *et al.*, 2019). Aunque su actividad enzimática es común a las sPPasas, las mPPasas son muy diferentes ya que, la estructura y secuencia de esta familia de proteínas no están relacionadas (Serrano *et al.*, 2007). Además, las subunidades de la Familia I y de las mPPasas poseen un solo dominio, mientras que las PPasas de la Familia II tienen dos dominios por subunidad (Jamwal *et al.*, 2017).

La ubicación de las PPasas es otra característica que las distingue, mientras que las PPasas de la Familia I y II son citosólicas, las mPPasas están insertadas en la MP. Estas proteínas funcionan como bombas iónicas primarias que acoplan la hidrólisis del PPi al movimiento de H^+ y/o Na^+ a través de la membrana y, por lo tanto, generan un potencial de membrana que contribuye a una serie de funciones celulares, como la regulación y energización de organelos tales como los acidocalcisomas y la vacuola (Kajander *et al.*, 2013).

En el caso de *T. gondii*, se ha reportado la presencia de dos PPasas, una PPasa soluble de la Familia I, denominada TgPPasa (Jamwal *et al.*, 2017; Pace *et al.*, 2011) y una H^+ -PPasa denominada pirofosfatasa vacuolar translocadora de protones (V- H^+ -PPasa) (Rodrigues *et al.*, 2000).

2.6.1. Pirofosfatasas solubles (sPPasas)

Las sPPasas se han identificado en procariotas y en el citosol de diversos eucariotas, incluyendo animales, plantas y células fúngicas (Kieber & Signer, 1991; Sivula *et al.*, 1999). Las sPPasas comprenden dos familias, denominadas I y II. Las PPasas de la Familia I suelen encontrarse en la mayoría de los eucariotas, arqueas y bacterias, mientras que las enzimas de la Familia II se encuentran en algunas bacterias, arqueas y eucariotas primitivas. Estas dos familias se distinguen en primer lugar por su cofactor de activación: las PPasas de la Familia I utilizan principalmente Mg^{2+} como cofactor, mientras que las PPasas de la Familia II trabajan con el Mn^{2+} como cofactor (Daouda *et al.*, 2017).

Los miembros de cada familia muestran homología en la secuencia de aminoácidos, pero no existe homología entre las familias. Las PPasas de la Familia I son dímeros o hexámeros de

subunidades idénticas, mientras que todas las PPasas de la Familia II son homodímeros (Zyryanov *et al.*, 2004).

Las sPPasas dependientes de Mg^{2+} hidrolizan el PPi a Pi, la energía del enlace anhídrido se pierde en forma de calor (Primo *et al.*, 2019). El esquema cinético de la catálisis de las sPPasa, mostrado en la **figura 11**, implica la unión del sustrato a un complejo preformado con el Mg^{2+} (EM₂), la ruptura del enlace P-O (E_{n+2}PP) por el ataque directo del agua y la disociación gradual de dos moléculas de fosfato (EM_{n+2}P₂); todos estos pasos son fácilmente reversibles, lo que permite la formación de una cantidad considerable de PPi unido a la enzima (EM_{n+2}PPi) y es a partir de la enzima y el Pi, que se explica el rápido intercambio de oxígeno entre el isótopo oxígeno-18 [¹⁸O]Pi y [¹⁶O] del agua catalizado por la sPPasa (Baykov *et al.*, 2000). Lo anterior con respecto al descubrimiento realizado en 1958 por Cohn quien reportó que la pirofosfatasa inorgánica catalizaba un rápido intercambio de oxígenos de ortofosfato inorgánico con oxígenos de agua, es decir, un intercambio Pi + HOH (Janson *et al.*, 1979).

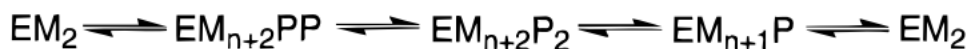


Figura 11. Esquema cinético de la sPPasa. E= enzima; M= Mg^{2+} ; PP= PPi

T. gondii posee un a sPPasa denominada TgPPasa, la cual es una enzima que contiene dos iones Mg^{2+} en su sitio activo, coordinados en dos motivos de unión (M1 y M2) por Asp190, Asp195 y Asp227 (Jamwal *et al.*, 2017). El monómero posee una estructura $\alpha\beta$ (**Fig. 12**). La estructura de esta enzima se encuentra cristalizada y corresponde a 235 aa, iniciando en V74 y terminando en E308, resaltado en color gris en la secuencia mostrada en la **tabla 2**. La estructura molecular fue obtenida por el método de difracción de rayos X con una resolución de 2.35 Å (Jamwal *et al.*, 2017). El contenido de la macromolécula corresponde a 53,67 kDa en peso de la estructura y se encuentra depositada PDB con el ID: [5WRT](#).

La TgPPasa regula el nivel citosólico del PPi en el parásito ya que *T. gondii* puede utilizar el PPi en lugar del ATP como donante de energía en la reacción PFK y en la pirofosfatasa vacuolar translocadora de protones (TgVP1); (Pace *et al.*, 2011).



Figura 12. Estructura cristalizada de la pirofosfatasa inorgánica soluble de *Toxoplasma gondii* (PDB: 5WRT). Se observa la conformación homodimérica. Tomada de PDB.

Tabla 2. Secuencia aminoacídica de la TgPPasa

Tipo	Secuencia	Longitud
PPasa soluble		
Tipo I		
>5WRT Chain	1 MQSAPLASSVGAASGDSVVSPLLPCGGPRRNLFRRFFAS	381 aa (235 aa estructura cristalizada)
s A,	40 SRSESSLGAADGTKAAEKAPSAEASGDGAAGGGDVYRRLV	
B Soluble	80 SGTEGEKDFRVLLSKKSGERLSPWHDIPLFPNGRDARPLL	
inorganic	120 FNMVVEIPKNTRRKMEMQLRPLPFTPIMQDLKKDGLREYA	
pyrophospha	160 STLYWNYGAFPTWEDPREPGGREVFHARGDGDPLDVVEI	
tase Toxopl	200 GSEVLPVGGVVPVKVLGALAMIDGGELDWKVLAIREGDPL	
asma gondii	240 FSQLNSVADVERLCRGVVPGIREWFRWYKLPTDNVQNQFG	
	280 HDEAALPAADAERVVYRAHEHYLRLLSEEHEGEVEEAGEAV	
	320 RKEDEKESHREQEARGRNVAVYIETKERPPATGEAPADARQ	
	360 RETETKAGEKGEHVVRKQKLWLP	
(5811)		

2.6.2. Pirofosfatasa integradas de membrana (mPPasas)

Los gradientes electroquímicos de iones H^+ y Na^+ son utilizados por los organismos para impulsar la producción de ATP y translocar sustancias a través de las membranas. Estos gradientes son mantenidos por transportadores primarios y secundarios de H^+ y Na^+ que consumen energía química o luminosa. Las mPPasas son bombas primarias que acoplan la translocación de H^+ o Na^+ a la hidrólisis del PPi (Luoto, *et al.*, 2013a).

Las mPPasas son el único grupo de PPasas integrado en la membrana, poseen entre 15 y 17 hélices transmembranales (TMH) por subunidad de ~70-81 kDa, seis de los TMH forman el sitio catalítico en el lado citosólico (Holmes *et al.*, 2019; Kellosalo *et al.*, 2012). Las mPPasas

son menos abundantes que las PPasas solubles, pero siguen estando presentes casi todos los reinos de la vida, exceptuando los hongos y los animales multicelulares (Kajander *et al.*, 2013).

Durante la catálisis, la enzima se une al sustrato, bombea los iones al interior de la célula en contra de un gradiente electroquímico y, posteriormente, hidroliza la molécula de pirofosfato. Este mecanismo proporciona a la célula una reserva de energía esencial durante situaciones de estrés. Se ha reportado la relevancia de las mPPasas en el caso de plantas, en la tolerancia al estrés, la maduración del fruto y en el impulso de la eficiencia energética (Lin *et al.*, 2012). También, han sido motivo de estudio en el caso de parásitos protozoarios, por lo que son clínicamente relevantes como posibles objetivos farmacológicos y de interés biotecnológico (Holmes *et al.*, 2019). En eucariotas como *Arabidopsis thaliana*, las mPPasas se localizan en las membranas del aparato de Golgi (Mitsuda *et al.*, 2001), en las vacuolas en el caso de *Vigna radiata* (Gaxiola *et al.*, 2007) en los acidocalcisomas en el caso de protistas como *T. cruzi* (Moreno & Docampo, 2009), *T. gondii* (Rodrigues *et al.*, 2000) y *Plasmodium berghei* (Marchesini *et al.*, 2000) y en la membrana celular interna de bacterias como *Bacteroides vulgatus* (Luoto *et al.*, 2013b). Los acidocalcisomas son orgánulos globulares con una membrana de 8 nm de grosor, contienen una matriz electrodensa con altas concentraciones de compuestos de fósforo dentro de su estructura en forma de PPi y PolyP (Docampo *et al.*, 2005). Son reservorios de Ca^{2+} y otros cationes como: Mg^{2+} , Na^{2+} , K^+ , Zn^{2+} y Fe^{2+} su membrana contiene una serie de bombas (Ca^{2+} -ATPasa, V- H^+ -ATPasa, V- H^+ -PPasa), intercambiadores de cationes (Na^+/H^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) y canales (acuaporinas) (Moreno & Docampo, 2009).

Las mPPasas son completamente diferentes a las PPasas solubles y se pueden clasificar según su ion específico a bombear (Na^+ / H^+ o ambos) y su activación dependiente o independiente de K^+ (Daouda *et al.*, 2017). Las PPasas membranales son bombas de iones que se encuentran mayoritariamente en plantas, algas, algunos protozoos, bacterias y arqueas (Kajander *et al.*, 2013). Producen reacciones reversibles que acoplan la energía de hidrólisis de la PPi y el protón (H^+ -mPPasas) o el sodio (Na^+ -mPPasas). Además, las Na^+ , H^+ -mPPasas requieren Na^+ para su actividad hidrolítica y de transporte y se activan con K^+ (Luoto, *et al.*, 2013).

Las mPPasas que bombean H^+ , también suelen denominarse PPasas vacuolares porque se localizan preferentemente en compartimentos vacuolares, como las vacuolas de las plantas (Maeshima, 2000) y los acidocalcisomas de las bacterias (Seufferheld *et al.*, 2004) y de los protistas (Docampo & Moreno, 2011). A diferencia de las H^+ -ATPasas vacuolares multisubunitarias (V- H^+ -ATPasas), las H^+ -PPasas forman homodímeros (Maeshima, 2000) y

se dividen en subfamilias dependientes e independientes del K^+ (Liu *et al.*, 2014). Se ha reportado que la membrana de los acidocalcisomas de algunos parásitos, pertenecientes al orden de los tripanosomátidos, como *T. cruzi* (Scott *et al.*, 1998), *Leishmania donovani* (Rodrigues *et al.*, 1999b) y *T. brucei* (Rodrigues *et al.*, 1999a), poseen una pirofosfatasa vacuolar translocadora de protones (V- H^+ -PPasa (EC 3.6.1.3)), una enzima descrita también en plantas, que utiliza exclusivamente PPi como fuente de energía para catalizar la translocación electrogénica de H^+ desde el citosol al lumen de la vacuola, generando una diferencia de pH ácido en el interior (ΔpH) y una diferencia de potencial eléctrico positiva en el interior ($\Delta \Psi$) y que se emplea para energizar una amplia gama de procesos de transporte secundarios, acoplados al $\Delta \Psi$ y/o ΔpH (Rea & Poole, 1993).

En el caso de *T. gondii*, Rodrigues *et al.* (2000) demostraron que los taquizoítos poseen una V- H^+ -PPasa (TgVP1) con características comunes a las enzimas de los tripanosomátidos y de las plantas. Además, recientemente se ha reportado un organelo multivesicular post-Golgi en los taquizoítos de *T. gondii*, denominado vacuola vegetal (PLV) o compartimento vacuolar (VAC). Este organelo pudo ser identificado con anticuerpos contra proteínas con similitud a las bombas y canales vacuolares de las plantas, como una H^+ -PPasa sensible al K^+ (TgVP1), y una acuaporina similar a la del tonoplasto (TgAQP1). Esta última enzima se ha identificado como de importancia para la supervivencia del parásito bajo estrés extracelular y la preparación para la invasión de las células del hospedero (Liu *et al.*, 2014). Sin embargo, la TgVP1 como bomba translocadora de H^+ , no ha sido identificada en la formación del quiste tisular y tampoco en quistes aislados de cerebro.

Por otra parte Drozdowicz *et al* (2003), clonó el gen TgVP1 (TgME49_248670) y la versión modificada pudo expresarse funcionalmente en levadura. La caracterización bioquímica de la TgVP1 se realizó utilizando fracciones purificadas de *T. gondii* enriquecidas en la enzima (Miranda *et al.*, 2010).

2.6.3. Inhibidores de PPasas

Una propiedad que distingue a las mPPasas, independientemente de si son transmembranales o vacuolares es su alta sensibilidad a la inhibición competitiva por el 1,1-difosfonato, aminometilendifosfonato (AMDP) y su relativa insensibilidad a la inhibición irreversible por fluoruro a diferencia de las sPPasas (Baykov *et al.*, 1993). El AMDP es un compuesto que

pertenece a los bifosfonatos, los cuales se caracterizan por un carbono metileno substituido con dos átomos de fosforo oxidados. La estructura resultante, P-C-P, tiene dos grupos fosfato unidos por enlaces fosfoéter no hidrolizables. El átomo de carbono central puede albergar además dos sustituyentes adicionales mediante enlaces covalentes con otro elemento, como el carbono, el oxígeno, el nitrógeno, el azufre o un halógeno, dando lugar a una enorme variedad de compuestos, que pueden variar mucho en cuanto a reactividad y química (Ghosh *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2005). Se han estudiado varios bifosfonatos, como el pamidronato, el alendronato, el tiludronato, el risedronato, el etidronato, el clodronato y el ibandronato; establecido como terapias eficaces en el tratamiento de trastornos de la resorción ósea, como la osteoporosis y la enfermedad de Paget, así como el mieloma y las metástasis óseas (Russell *et al.*, 1999). Los fosfonatos y bifosfonatos son análogos químicamente con estabilidad ante los fosfatos y pirofosfatos. Los bifosfonatos, son especialmente útiles como inhibidores de las enzimas implicadas en las vías de biosíntesis de isoprenoides, inhibiendo el transporte de protones y la hidrólisis del PPI. (Park *et al.*, 2021). Estos fármacos más recientemente se han evaluado como potentes agentes antiparasitarios (Eubank & Reeves, 1982; Ghosh *et al.*, 2004).

Partiendo del hallazgo de que las mPPasas son sensibles a la inhibición por el AMDP tanto en células vegetales como bacterianas fotosintéticas (Drozdowicz *et al.*, 2003), varios investigadores han demostrado que este compuesto inhibe el crecimiento de parásitos como *P. falciparum* (Mcintosh *et al.*, 2001), *T. gondii* (Rodrigues *et al.*, 2000). y *T. cruzi* (Urbina *et al.*, 1999). El potencial para el desarrollo de derivados farmacológicos de este compuesto o de agentes alternativos específicos para inhibir las mPPasas es de gran interés en parásitos intracelulares.

Por otra parte, las sPPasa son una de las pocas enzimas inhibidas con concentraciones micromolares (μM) de flúor (F^-) por lo que ha sido empleado como un monitor del PPI (Baykov *et al.*, 1992). Este ion ha sido probado en otras sPPasas como en el caso de la PPasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Y-PPase) y en la PPasa de *Escherichia coli*, observado una disminución instantánea (tiempo medio <1 s) de la actividad después de la adición de flúor a la enzima (Baykov *et al.*, 1992). El ion F^- también ha sido estudiado como un veneno enzimático, que induce estrés oxidativo, trastornos hormonales y neurotoxicidad en el ser humano (Strunecka & Strunecky, 2020).

2.6.3.1. NaF como inhibidor de sPPasas

El fluoruro de sodio (NaF) es el reactivo comúnmente utilizado en la inhibición de sPPasas y ha demostrado inhibir la actividad de la luciferasa de luciérnagas en un 80 % utilizando 10 mM de NaF para inhibir su sPPasa (Eriksson *et al.*, 2001). En el caso de *T. gondii*, se ha demostrado que 2 mM de NaF inhibe la hidrólisis de PPi en homogenado de taquizoítos (Rodrigues *et al.*, 2000).

La capacidad del NaF para inhibir a las sPPasas se debe a la habilidad del ion F⁻ para ocupar el sitio de la molécula de agua, activada para realizar el ataque nucleofílico del fósforo, en una reacción de hidrólisis que semeja una reacción de sustitución nucleofílica 2 (SN₂) (Wu *et al.*, 2021). Como resultado de la ocupación, se forma un derivado de monofluorofosfato de magnesio en el sitio activo, que se mantiene fuertemente retenido e impide la compleción del ciclo catalítico (Heikinheimo *et al.*, 2001).

2.6.3.2. C10 bifosfonato como inhibidor de mPPasas

En sus primeros trabajos, Eubank & Reeves, (1982) descubrieron que los bifosfonatos, análogos hidrolíticamente estables del PPi, tenían actividad contra *E. histolytica*, y propusieron que estos compuestos inhibían la PFK dependiente del PPi del parásito. Posteriormente, se dieron a conocer otros resultados sobre *E. histolytica* utilizando varios bifosfonatos que contienen nitrógeno. Ahora se sabe que estos compuestos son potentes inhibidores de la enzima PPasa (Ghosh *et al.*, 2004).

En el caso de *T. gondii*, se han estudiado la actividad de 60 tipos bifosfonatos como inhibidores del crecimiento del parásito de manera *in vitro* con el fin de identificar posibles compuestos antiparasitarios (Ling *et al.*, 2005). El C10 bifosfonato (C10-bisphosphonate) pertenece a los bifosfonatos. Posee una larga cadena de carbonos y ha sido reportado como un inhibidor de la esfingomielinasa ácida y como una opción de tratamiento para las enfermedades pulmonares inflamatorias, la fibrosis quística y la aterosclerosis (Roth *et al.*, 2009); (**Fig. 13**). Este compuesto interactúa con los iones metálicos divalentes y forma complejos bidentados. Los bifosfonatos son un inhibidor de la farnesil difosfato (FDP) sintasa citosólica (geranil difosfato (GDP) y geranilgeranil difosfato (GGDP) sintasa y de la vía del isopreno. Además, tienen

funcionalidad antimicrobiana y ha sido reportado como inhibidor en el crecimiento de *E. histolytica* y *P. falciparum* (Eubank & Reeves, 1982; Ghosh *et al.*, 2004).

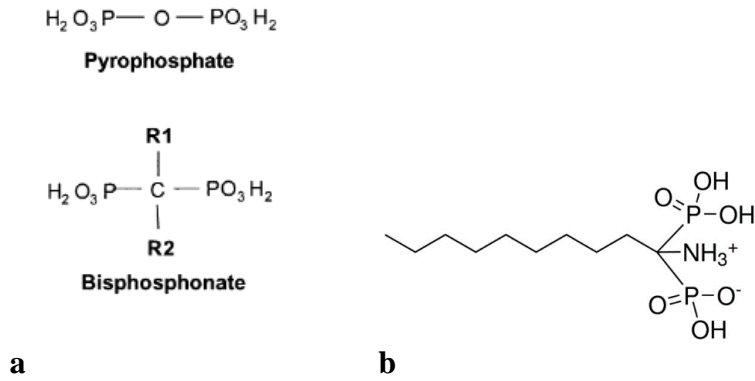


Figura 13. Estructura química de C10 bifosfonato. a) Comparación de pirofosfato y la estructura general del bifosfonato. **b)** Estructura química de C10 bifosfonato.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

T. gondii, poseen dos PPasas, una V-H⁺-PPasa denominada TgVP1, con características similares a las enzimas de los tripanosomátidos y de las plantas (Pace *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2000) y de la cual solo se conoce su secuencia aminoacídica y algunas características generales de las mPPasas. Además, posee una TgPPasa que regula los niveles citosólicos de PPi en el parásito, cuya estructura atómica se encuentra dilucidada cristalográficamente (Jamwal *et al.*, 2017).

La distribución de las PPasas se ha reportado en el citoplasma de taquizoítos extra e intracelulares en el caso de la TgPPasa (Pace *et al.*, 2011). Sin embargo, la distribución de la TgVP1 se encuentra asociada a los acidocalcisomas en parásitos extracelulares, de acuerdo con Moreno & Zhong (1996); Rodrigues *et al.* (2000) y han sido identificadas con una distribución en vacuolas y en la superficie celular a partir de anticuerpos policlonales específicos para una V-H⁺-PPasa previamente probados en células vegetales y que genera reacción cruzada con la V-H⁺-PPasa de tripanosomátidos (Rodrigues *et al.*, 2000).

La translocación de H⁺ a través de las membranas actualmente es de interés, debido a que la ubicación de las mPPasas ha ayudado a proponer fármacos antiparasitarios, ya que, hasta el momento, no se ha reportado la presencia de las mPPasas en células humanas (Folgueira *et al.*, 2021; Valueva *et al.*, 2020).

Como parte de los fármacos evaluados como inhibidores de mPPasas, los derivados de bifosfonatos han demostrado inhibir la actividad de la TgVP1 de *T. gondii* sin efectos apreciables a la célula hospedero (Rodrigues *et al.*, 2000). Y en el caso de la TgPPasa, el NaF, inhibe la hidrólisis de PPi (Szabo & Oldfield, 2001).

Durante el ciclo de vida de los parásitos protozoarios ocurren transiciones entre huésped, hospedero y entornos intracelulares y extracelulares, lo que significa que la célula protozoaria debe sobrevivir y adaptarse en distintas condiciones (Castro-Elizalde *et al.*, 2018). De acuerdo con Holmes *et al.* (2019), en términos de la función de las mPPasas, el cambio más relevante que sufren los parásitos es la diferencia en la presión osmótica que las células experimentan en los diferentes entornos.

El principal mecanismo para regular la presión osmótica interna implica a los acidocalcisomas debido a las bombas presentes en su membrana en donde se encuentra la Ca²⁺-ATPasa, la V-H⁺-ATPasa y la V-H⁺-PPasa e intercambiadores Na⁺/H⁺ y acuaporinas (Docampo & Moreno,

2011). Estudios de knock-down y knock-out en *T. brucei* (Lemercier *et al.*, 2002) *T. gondii* (Liu *et al.*, 2014), y *P. falciparum* (Zhang *et al.*, 2018) han demostrado que las mPPasas son necesarias para mantener la acidificación de los acidocalcisomas, la virulencia parasitaria y el crecimiento *in vitro* del estadio asexual de los parásitos.

Actualmente se ha logrado inducir el enquistamiento de la cepa RH por dos métodos, inducción *in vitro*, mediante MPA (Castro-Elizalde *et al.*, 2018) y mediante IFN- γ (Cruz-Mirón, 2021), por lo que se tienen estandarizados dichos métodos.

4. JUSTIFICACIÓN

Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la VP es una estructura que sirve como andamiaje para la construcción de la pared del quiste tisular de *T. gondii*. A la fecha, se desconoce la distribución y la función de las PPasas en el estadio de quiste tisular.

Dado que TgVP1 se encuentra en la VP, el estudio de los posibles cambios de la TgVP1 durante la formación del quiste tisular y su función son de interés para el conocimiento de la biología de *T. gondii*.

Además, puesto que *T. gondii*, posee también una pirofosfatasa citosólica (TgPPasa), es de interés aportar información sobre su participación en el proceso de enquistamiento.

5. HIPÓTESIS

Las pirofosfatasa citosólica (TgPPasa) y membranal translocadora de protones (TgVP1), están relacionadas en la formación del quiste tisular de *Toxoplasma gondii*.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función y la distribución de la TgPPasa y la TgVP1 en el enquistamiento de *Toxoplasma gondii* inducido por IFN- γ *in vitro* y en quistes aislados de cerebro.

6.1. Objetivos particulares *in silico*

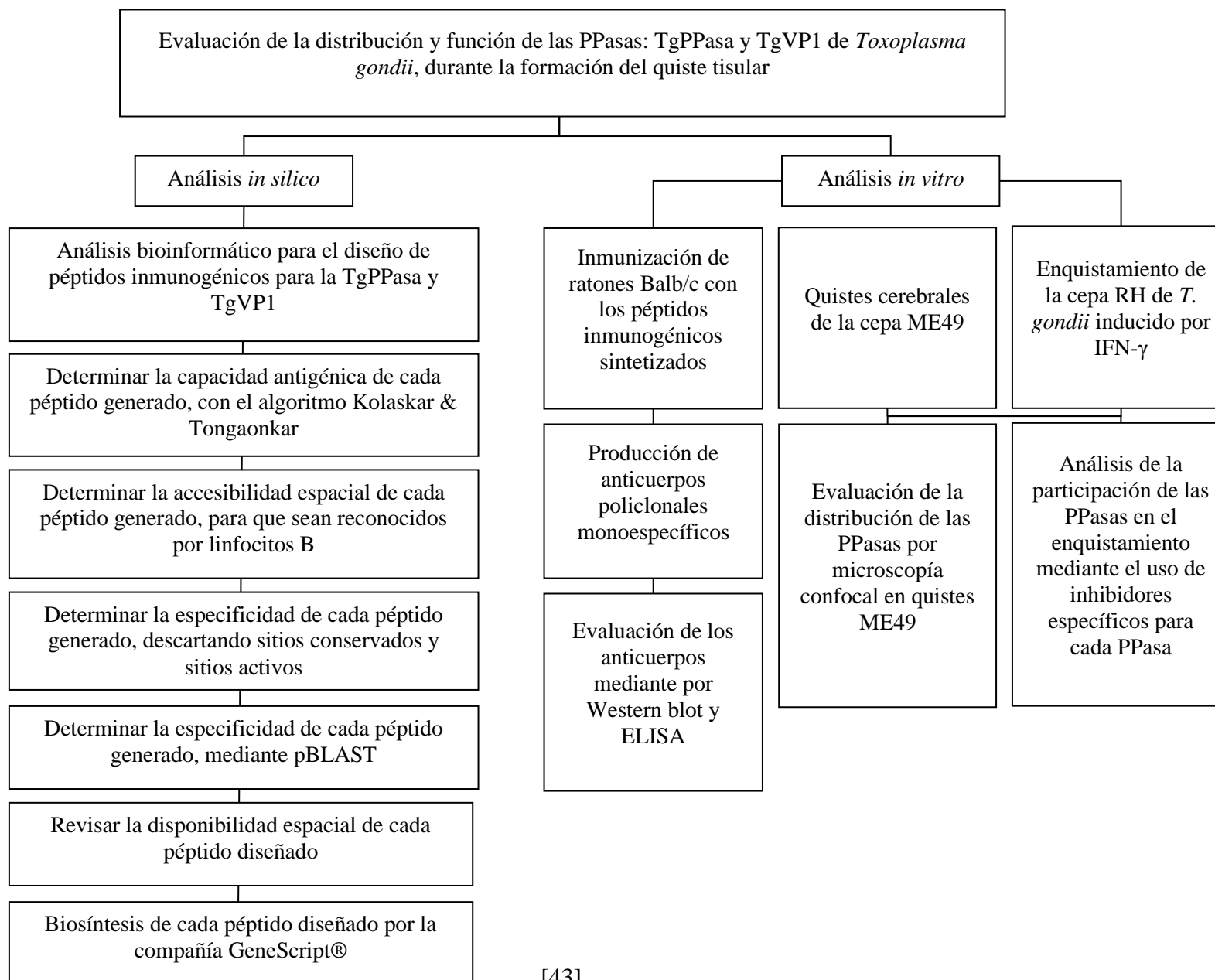
1. Realizar el análisis bioinformático de las secuencias proteicas de la TgPPasa y la TgVP1 de *T. gondii*, con el fin de diseñar péptidos inmunogénicos que nos permitan generar anticuerpos específicos
2. Determinar la capacidad antigénica de cada péptido generado, para ser reconocidos por linfocitos B.
3. Determinar la especificidad de cada péptido generado, descartando sitios conservados, sitios activos y mediante pBLAST con respecto a *Mus musculus*, *Homo sapiens* y *T. gondii* con el fin de evitar reacciones inespecíficas.
4. Revisar la disponibilidad espacial de cada péptido mediante modelado tridimensional.
5. Realizar un modelo estructural de la TgVP1 mediante AlphaFold2.

6.2. Objetivos particulares *in vivo*

1. Inmunizar ratones Balb/c con los péptidos inmunogénicos sintetizados para la TgPPasa y la TgVP1, con el fin de generar y obtener anticuerpos policlonales monoespecíficos.
2. Evaluar los anticuerpos policlonales mediante Western blot y ELISA.
3. Evaluar la distribución de la TgPPasa y TgVP1 por microscopia de fluorescencia y confocal, en taquizoítos y células invadidas
4. Evaluar la presencia de la TgPPasa y TgVP1, mediante microscopia de fluorescencia y confocal en quistes inducidos por IFN- γ .
5. Evaluar la presencia de la TgPPasa y TgVP1, mediante microscopia de fluorescencia y confocal en quistes de la cepa ME49 aislados de cerebros de ratones infectados.
6. Realizar el análisis de la participación de las PPasas en el enquistamiento inducido por IFN- γ , mediante el uso de inhibidores específicos para la TgPPasa y TgVP1.

..

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MÉTODOS

8.1. Análisis bioinformático

La búsqueda de secuencias aminoacídicas se realizó en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por *National Center for Biotechnology Information* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y en la base de recursos informáticos sobre el *Toxoplasma* (ToxoDB por *Toxoplasma Informatics Resources* <https://toxodb.org/toxo/app>).

La clasificación de las enzimas pirofosfatasas (PPasas) se realizó en el servidor web InterPro (Blum *et al.*, 2021). Para el análisis de parámetros fisicoquímicos como el peso molecular (PW), el punto isoelectrico (pI), composición de aminoácidos, promedio de hidrofobicidad e índice alifático, se empleó el servidor web ProtParam de ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005). Las características funcionales de las enzimas se obtuvieron de la base de datos de UniProt (Bateman *et al.*, 2021).

Las interacciones proteína-proteína se determinaron con el *software* STRING (<https://string-db.org/>).

8.2. Diseño de péptidos inmunogénicos

Para el diseño de los péptidos inmunogénicos se utilizó la Base de Datos de Epítomos Inmunes (IEDB) (<https://www.iedb.org/>) con la herramienta de predicción de epítomos de células B y los métodos *Emini Surface Accessibility Prediction* (Emini *et al.*, 1985) y Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) para determinar la accesibilidad y antigenicidad, respectivamente. Se obtuvieron varias secuencias peptídicas con distinto grado de antigenicidad por lo que se realizó una comparación de las secuencias predichas, con el fin de determinar los péptidos exclusivos para la PPasa membranal TgVP1 y la PPasa citosólica TgPPasa.

La especificidad de cada péptido generado se determinó descartando sitios conservados y sitios activos de cada proteína. Adicionalmente, se verificó la especificidad mediante *protein* BLAST (pBLAST) para descartar reacción cruzada de los péptidos con respecto a ratón (*Mus musculus*), humano (*Homo sapiens*) y *T. gondii*. La disponibilidad espacial de cada péptido diseñado fue verificada con respecto a la estructura terciaria con el *software* PyMOL

(Mooers, 2020). La predicción conformacional de los epítomos para que fueran reconocidos por linfocitos B fue verificada con el *software* Disco Tope 2.0 (Kringelum *et al.*, 2012).

Las secuencias candidatas para la producción de Ac se sintetizaron con cuatro MAP's en el extremo C-terminal. La secuencia de cada péptido se envió a sintetizar con la compañía GenScript® (USA).

8.3. Predicción estructural de la PPasa membranaral TgVP1 mediante AlphaFold2

La predicción estructural de la TgVP1 (*V-type H(+)-translocating pyrophosphatase* VP1 de *Toxoplasma gondii* (ID: B6KH90), se realizó a partir de una Red Neuronal, con base en un alineamiento múltiple de secuencias (MSAs *Multiple Sequence Alignments*), calculando los patrones de covarianza entre los residuos de la secuencia con el *software* AlphaFold2, producido por *DeepMind*TM, usando MMseq2 (Mirdita *et al.*, 2022; Varadi *et al.*, 2022). Las estructuras 3D fueron visualizadas con el programa PyMOL (Mooers, 2020).

En el caso de la estructura terciaria de la TgPPasa [*Inorganic pyrophosphatase (Toxoplasma gondii)*] (5WRT) se tomó de la base de datos PDB (Jamwal *et al.*, 2017).

8.4. Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c para el mantenimiento de la cepa RH de *T. gondii*.

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL6 para el mantenimiento y extracción de quistes cerebrales de la cepa ME49 de *T. gondii*.

Los ratones fueron mantenidos en la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN en condiciones de temperatura, humedad y ventilación regulada, de acuerdo con la norma oficial mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999)”. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV.

8.5. Obtención y mantenimiento de la cepa RH de *T. gondii*

El mantenimiento de la cepa RH de *T. gondii* se realizó en ratones macho BALB/c, mediante la inoculación intraperitoneal con 5×10^6 taquizoítos en PBS pH 7.2 estéril (para la preparación de soluciones ver el **anexo II**). Después de cuatro días después de la infección, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se inoculó PBS en la cavidad peritoneal para recuperar el líquido peritoneal rico en taquizoítos. La suspensión se centrifugó a 1,700 rpm x 10 min, y el pellet de parásitos se resuspendió en PBS. Los taquizoítos se purificaron por filtración a través de una membrana de policarbonato de 5 μm de poro (Milipore, Bedford MA) con el fin de eliminar los macrófagos.

Durante todo el proceso para el mantenimiento de la cepa RH de *T. gondii*, se emplearon las medidas 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 realizó de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

8.6. Extracto total de taquizoítos

Se solubilizaron 200×10^6 taquizoítos purificados en buffer de lisis. Posteriormente, la muestra se sonicó a 40 Hz por 4 veces durante 30 seg (Procesador Ultrasónico GE 130PB Cole-Parmer, Vernon Hills, USA). El extracto total fue mantenido a 4 °C para su uso inmediato y a -20 °C para su resguardo.

8.7. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Se preparó una curva estándar a partir de una solución stock de albumina de 1 mg/mL, se realizaron concentraciones crecientes de albumina sérica bovina (BSA) de 5 hasta 50 $\mu\text{g/mL}$ en PBS. En una placa de ELISA de 96 pozos se colocaron, por triplicado, 10 μL de cada concentración de la curva y de las muestras problema, posteriormente, se agregaron 200 μL de solución Bradford (1 mL de solución de Bradford más 4 mL de agua bidestilada). Se registró la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca (Micro Plate Reader S80XR, BioRad). La curva de calibración se graficó para conocer la concentración proteica de la muestra.

8.8. Inmunización de ratones BALB/c con los péptidos inmunogénicos sintetizados y recolección de sueros

Se trabajó con dos grupos de ratones BALB/c, cada grupo constó de tres ratones. Un grupo fue inmunizado con el péptido diseñado para TgPPasa y el otro grupo fue inmunizado con el péptido diseñado para la TgVP1; en ambos casos, las inmunizaciones se realizaron con 50 µg de su respectivo péptido inmunogénico vía intraperitoneal con PBS estéril y Titer Max como adyuvante. Se realizaron cuatro inmunizaciones con un intervalo de 14 días entre cada una, tres inmunizaciones intraperitoneales y una inmunización intravenosa por la cola. Cinco días después de la última inmunización se realizó el sangrado en blanco y se determinó el título de anticuerpos IgG.

Previo a las inmunizaciones se realizó un sangrado preinmune. La sangre preinmune e inmune se incubaron a 37 °C por 30 min y posteriormente fueron centrifugados a 2,000 *rpm* por 10 min. Los sueros recolectados preinmunes e inmunes fueron mantenidos a 4 °C durante todo su uso. A partir de los sueros se realizó la caracterización inmunoquímica de cada PPasa.

8.9. Determinación semicuantitativa de la inmunoglobulina IgG mediante ELISA

En placas de ELISA de 96 pozos se colocaron 100 µL (1 µg/pozo) del antígeno correspondiente a cada PPasa (TgPPasa y TgVP1) en buffer de carbonatos. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron con PBST (PBS pH 7.2 + Tween 20 al 0.05%). Posteriormente, se realizó el bloqueo con 100 µL de leche descremada al 5 % en PBST por 30 minutos a 37 °C.; transcurrido el tiempo, las placas se lavaron PBST. Se colocaron 100 µL de los sueros preinmunes e inmunes correspondientes, en dilución 1:100 en PBST; las placas se incubaron a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron con PBST y se colocó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP de ratón (Sigma-Aldrich) dilución 1:5000 y se incubaron las placas por 2 h a TA en agitación constante. Se lavaron las placas con PBST y se colocaron 100 µL de solución de revelado en cada pozo, se incubó hasta observar un cambio de color a amarillo. La reacción se detuvo agregando 100 µL de ácido sulfúrico 2N. Finalmente, se realizó la lectura de la longitud de onda (λ) en un espectrofotómetro modelo 680 XR (Bio-Rad) a 490 nm.

Los valores obtenidos de absorbancia para cada PPasa fueron extrapolados con respecto a una curva estándar de IgG que se realizó a la par de cada PPasa evaluada. Se empleó el suero de referencia IgG de ratón (Bethyl. No. Cat. RS10-101, lote 6) con valor asignado de acuerdo con la hoja técnica de IgG = 9.5 mg/mL. Los valores fueron reportados en µg/mL.

Para la preparación de soluciones ver el **anexo II**.

8.10. SDS-PAGE

Los patrones electroforéticos del ET se visualizaron mediante SDS-PAGE en geles al 7.5 % de acrilamida-bis acrilamida. El gel se tiñó con azul de Coomassie R-250. Las imágenes de los geles se digitalizaron en un foto-documentador (EZ Imager, BioRad, Hercules, CA, USA), mediante el programa Image™ Lab Software Versión 4.1 (BioRad, Hercules, CA, USA).

8.11. Western blot

Para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos contra las PPasas, 200 µg de ET se hirvieron por 5 min, posteriormente el volumen de ET se colocó en un gel de poli(acrilamida) al 10 % y se corrió a 80 V por 20 min y 100 V por 40 min en una cámara Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). El marcador de peso molecular empleado fue Blue Prestained Protein Standard, Broad Range (11-190 kDa) P7718 NEB®. Posteriormente, el gel se colocó en buffer de transferencia por 5 min y se transfirió en cámara semi húmeda a una membrana de nitrocelulosa durante 60 min a 200 mA. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 6 % en TBST durante 2 h, posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios preinmunes e inmunes de cada PPasa (dilución 1:150) por 2 h a TA y a 4 °C toda la noche. Se hicieron lavados exhaustivos con TBST en agitación constante. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a HRP (dilución 1:7 000) por 2 h a TA y finalmente se realizaron lavados con TBST. La membrana se reveló utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL-Plus (GE Healthcare, UK).

Para la preparación de soluciones ver el **anexo II**.

8.12. Cultivo celular

La línea celular HEp-2 (células epiteliales humanas de carcinoma de laringe) (HEp-2, ATCC-CCL 23), se mantuvo en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, penicilina 20 U/mL y estreptomycin 20 µg/mL, incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Las células se cultivaron mediante pases consecutivos en frascos de cultivo celular de 25 cm² (Corning™) 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 80 % 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 sembraron en medio DMEM. 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).

8.13. Conteo de taquizoítos

En cada experimento correspondiente, el conteo de taquizoítos se realizó con una cámara de Neubauer (Hoechst, Mx) a través de un microscopio Axiolab (Zeiss) y se realizó el cálculo para determinar la relación de taquizoítos extracelulares correspondientes. La fórmula empleada fue: *Total de parasitos = (N° de parasitos)(10,000)(factor de dilución)*

8.14. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 mediante inmunofluorescencias en parásitos extracelulares de *T. gondii*

Para determinar la ubicación de la TgPPasa y de la TgVP1, 5x10³ taquizoítos purificados fueron colocados sobre cubreobjetos previamente tratados con 2 µg/mL de Poli-L-lisina (SIGMA®) por 30 min. Los parásitos se fijaron con paraformaldehído (PAF) al 2 % por 30 min. Transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con PBS. Se permeabilizaron los taquizoítos con tritón X-100 al 0.5 % en PBS por 5 min y se bloqueó con SFB 1 % durante

30 min. Los parásitos se incubaron con su respectivo anticuerpo primario, correspondiente al suero preinmune e inmune de IgG de ratón anti-TgPPasa e IgG de ratón anti-TgVP1 (1:100) por 1 h a TA y 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron exhaustivamente con PBS y posteriormente se les colocó el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de ratón acoplados a FITC o TRITC (10 µg/mL); (Jackson Immuno Research, USA) por 2 h a TA. Como control positivo se utilizó el anticuerpo primario IgG de ratón anti-GAP45 y se reveló con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de ratón acoplado a TRITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 µg/mL) por 10 min a TA y finalmente se realizaron varios lavados con PBS. Para realizar el montaje, se lavaron los cubreobjetos con H₂O para retirar las sales del PBS y se montaron en portaobjetos con 5 µL de Vectashield (Vector Laboratories, UK). Las orillas fueron selladas con barniz transparente. Las laminillas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Axioscope II-Mot/Zeiss, Germany.

Los canales empleados constan de las siguientes λ : FITC (Excitación: 495 nm, Emisión: 517 nm), DAPI (Excitación: 358 nm, Emisión: 464 nm) y TRITC (Excitación: 557 nm, Emisión: 576 nm).

8.15. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 mediante inmunofluorescencias en proliferación intracelular de *T. gondii*

Se cultivaron células HEp-2 con 1.6×10^6 células/mL sobre cubreobjetos estériles colocados en cajas Petri de 35 x 10 mm (Thermo Scientific™) y se mantuvieron en medio DMEM con SFB al 10 %. Al alcanzar el 60 % de confluencia, las células fueron infectadas con taquizoítos en una relación 1:20 (célula/parásito) y se mantuvieron por 1 h en incubación a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio y se lavaron las células tres veces con medio MEM sin SFB, con el fin de eliminar los parásitos extracelulares. Las células se mantuvieron con medio DMEM con SFB al 10 % a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ durante 2, 6, 12, 24 y 48 h.

Después de cada tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron varios lavados con PBS. Las células infectadas con taquizoítos se fijaron con PAF al 4 % por 30 min y transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con PBS. Se permeabilizó con tritón X-100 al 0.5 % en PBS por 5 min y se bloqueó con SFB 1 % durante 30 min. Las células se incubaron con su

respectivo anticuerpo primario, correspondiente al suero preinmune e inmune de IgG de ratón anti-TgPPasa e IgG de ratón anti-TgVP1 (1:100) por 1 h a TA y a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y posteriormente se les colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplados a fluorocromos FITC o TRITC (10 µg/mL) (Jackson Immuno Research, USA) por 2 h a TA. Como control positivo se utilizó el anticuerpo primario IgG de ratón anti-GAP45 y se reveló con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de ratón acoplado a TRITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 µg/mL) por 10 min a TA y finalmente se realizaron lavados con PBS. Para realizar el montaje, se lavaron los cubreobjetos con H₂O para retirar las sales del PBS y se montaron en portaobjetos con 5 µL de Vectashield, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Las lamilillas se observaron en un microscopio de fluorescencia Axioscope II-Mot/Zeiss, Germany.

8.16. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* con IFN- γ

Taquizoítos extracelulares purificados fueron tratados con 200 U/mL de IFN- γ (Sigma Aldrich, St Louis MO) en medio DMEM por 2 h a TA, posteriormente se centrifugaron a 1,700 *rpm* por 10 min, se retiró el sobrenadante para eliminar la citosina del medio, los taquizoítos fueron resuspendidos en 200 µL de medio DMEM sin SFB y se realizó la infección de las células HEp-2 al 60 % de confluencia por 2 h. Transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con medio DMEM sin SFB, con el fin de eliminar el exceso de parásitos extracelulares. Las células se mantuvieron con medio DMEM con SFB al 10 % a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ durante 48 y 72 h.

Después de cada tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS. Las células infectadas con taquizoítos se fijaron con PAF 4 % por 30 min y se lavaron con PBS. Se permeabilizaron las células con tritón X-100 al 0.5 % en PBS por 5 min y se bloqueó con SFB 1 % durante 30 min. Las células se incubaron con el suero preinmune o inmune de IgG de ratón anti-TgPPasa e IgG de ratón anti-TgVP1 (1:100) por 1 h a TA. y a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron con PBS y posteriormente se les colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplados a TRITC (10 µg/mL); (Jackson Immuno Research,

USA) por 2 h a TA, transcurrido el tiempo se lavaron exhaustivamente con PBS. La glicoproteína CST1 fue tenida con la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC (1:500). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 µg/mL) por 10 min a TA y finalmente se realizaron cinco lavados. El montaje de las laminillas se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente. Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia Axioscope II-Mot/Zeiss, Germany.

8.17. Evaluación de la viabilidad de parásitos extracelulares en presencia de inhibidores de PPasas

Para determinar el efecto de los inhibidores en los parásitos extracelulares, se trabajó con 5×10^3 taquizoítos purificados, los cuales fueron incubados por 2 h con 40, 100 y 200 µM de C10-Bifosfonato (860480P-500UG Sigma-Aldrich) como inhibidor de la TgVP1 y con 2, 10 y 20 mM de NaF (7681-49-4 Merck) como inhibidor de la TgPPasa. Como controles negativos se emplearon taquizoítos sin presencia de los inhibidores.

El NaF y el C10-Bifosfonato, son solubles en agua, por lo que fueron preparados en soluciones concentradas en PBS y posteriormente se diluyeron a las concentraciones requeridas. Con base en lo anterior, como controles negativos, los parásitos fueron mantenidos solo en PBS.

Se determinó la viabilidad de los parásitos mediante fluorescencia con Sytox green (SYTOX-green *nucleic acid stain* (Molecular Probes, Eugene, OR.), dilución 1:5000 en PBS. La viabilidad fue reportada en porcentaje de taquizoítos vivos.

8.18. Ensayos de invasión celular en presencia de inhibidores de PPasas

Para evaluar el efecto de los inhibidores en la invasión celular, se trabajó con taquizoítos extracelulares purificados, tratados por 2 h con 40, 100 y 200 µM de C10-Bifosfonato como inhibidor de la TgVP1 y/o con 2, 10 y 20 mM de NaF como inhibidor de la TgPPasa. Como controles negativos se emplearon taquizoítos en PBS sin los inhibidores.

Se cultivaron células HEp-2 con 1.6×10^6 células/mL sobre cubreobjetos estériles colocados en cajas Petri de 35 x 10 mm y se mantuvieron en medio MEM con SFB al 8 %. Al alcanzar

el 60 % de confluencia, las células fueron infectadas con los taquizoítos pre-incubados con su respectivo inhibidor en una relación 1:20 (célula/parásito) y se mantuvieron por 2 h en incubación a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas con PBS para retirar el exceso de parásitos extracelulares y posteriormente fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5 % (Polysciences, Warrington, PA). Los cubreobjetos montados fueron observados mediante microscopia en contraste de fase. Se cuantificó el porcentaje de células conteniendo al menos una VP.

8.19. Ensayos de proliferación intracelular de *T. gondii* en presencia de inhibidores de PPasas

Para evaluar el efecto de los inhibidores en el proceso de proliferación celular, se trataron taquizoítos extracelulares purificados por 2 h con 200 µM y con 20 mM de NaF. Como controles negativos se emplearon taquizoítos en PBS sin los inhibidores. Al alcanzar el 60 % de confluencia, las células fueron infectadas con los taquizoítos pre-incubados con su respectivo inhibidor en una relación 1:20 (célula/parásito) y se mantuvieron por 2 h en incubación a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas con PBS para retirar el exceso de parásitos extracelulares y las células se mantuvieron por 72 h en incubación a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo, se cosecharon los taquizoítos mediante el raspado de la monocapa celular, el sobrenadante fue recuperado y se realizó el conteo de parásitos en cámara de Neubauer. Como control positivo, se evaluó la proliferación de taquizoítos mantenidos en PBS.

8.20. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* con IFN-γ en taquizoítos pretratados con inhibidores de PPasas

Taquizoítos extracelulares purificados fueron tratados con 200 U/mL de IFN-γ en medio MEM por 2 h a TA, posteriormente se centrifugaron a 1,700 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante para eliminar la citosina del medio, los taquizoítos fueron resuspendidos en solución por 2 h con su respectivo inhibidor 40, 100 y 200 µM de C10-Bifosfonato como inhibidor de la TgVP1 y con 2, 10 y 20 mM de NaF como inhibidor de la TgPPasa. Como controles negativos se emplearon taquizoítos en PBS sin inhibidores. Transcurrido el tiempo

se realizó un lavado con PBS para retirar los inhibidores y se realizó la infección de las células HEp-2 al 60 % de confluencia por 2 h. Posteriormente, se realizaron lavados con medio MEM sin SFB, con el fin de eliminar el exceso de parásitos extracelulares. Las células se mantuvieron con medio DMEM con SFB al 10 % a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ durante 48 y 72 h.

Después de cada tiempo, se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS. Las células infectadas con taquizoítos se fijaron con PAF 4 % por 30 min. Se permeabilizó con tritón X-100 al 0.5 % en PBS por 5 min y se bloqueó con SFB 1 % durante 30 min. Las células se incubaron con su respectivo anticuerpo primario, correspondiente al suero preinmune e inmune de TgPPasa y TgVP1 (1:100) por 1 h a TA y a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron con PBS y posteriormente se les colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplados a fluorocromos FITC o TRITC (10 µg/mL) (Jackson Inmuno Research, USA) por 2 h a TA. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 µg/mL) por 10 min a TA, finalmente, se realizaron lavados exhaustivos con PBS. El montaje de las laminillas se realizó siguiendo la metodología descrita previamente y se observaron en un microscopio de fluorescencia Axioscope II-Mot/Zeiss, Germany.

8.21. Purificación de quistes cerebrales de la cepa ME49

Los quistes de la cepa ME49 se obtuvieron a partir del cerebro de ratones de la cepa C57BL6, previamente infectados vía oral con aproximadamente 40 quistes. Los ratones se sacrificaron de seis a ocho semanas después de la infección mediante dislocación cervical. El cerebro se maceró con 2 mL de PBS en un homogeneizador de vidrio, la suspensión se filtró empleando una gaza doble para eliminar los fragmentos tisulares, el filtrado se centrifugó a 1,000 *rpm* por 5 min, se descartó el sobrenadante; el pellet se resuspendió en PBS y, mediante el uso de un microscopio estereoscópico y una pipeta Pasteur se aislaron los quistes y fueron colocados en una caja Petri.

El tejido infectado, así como el material utilizado se neutralizó y descontaminó con hipoclorito de sodio al 5 %.

8.22. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 mediante inmunofluorescencia en quistes cerebrales de la cepa ME49

Los quistes cerebrales se colocaron en cubreobjetos previamente tratados con 10 µg/mL de Poli-L-lisina (SIGMA®) por 30 min. Posteriormente, se fijaron con PAF al 4 % por 30 min. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS y se permeabilizaron con tritón X-100 0.5 % en PBS por 7 min y se bloqueó con SFB 1 % durante 30 min. Los quistes se incubaron con su respectivo anticuerpo primario, correspondientes al suero preinmune e inmune de TgPPasa y TgVP1 (1:100) por 1 h a TA y a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron cinco veces con PBS y posteriormente se les colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplados a al fluorocromo TRITC (10 µg/mL) por 2 h a TA. Para la detección de la glicoproteína CST1 de la pared quística, se incubó con la lectina DBA, acoplada a FITC (Vector Laboratories, Inc., Burlingame CA); (dil 1:200 en PBS) 10 µg/mL, por 2 h a TA. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 µg/mL) por 10 min a TA y se realizaron lavados exhaustivos con PBS. Se realizó el montaje con Vectashield como se ha descrito previamente y se observaron al microscopio de fluorescencia ZEISS Axioscope 2 Mot Plus, en el microscopio confocal LSM 700 ZEN 2009 ambos de Carl Zeiss Inc. (Gottingen, Germany) y en el microscopio confocal laser system TCS-SP5, Leica.

8.23. Análisis estadístico

El análisis estadístico y sus respectivas representaciones en gráficos fueron generados con el *software* Prism8.

9. RESULTADOS

Los resultados se presentan de manera secuencial, cumpliendo con los objetivos planteados en el presente trabajo. Todos los resultados experimentales se repitieron al menos tres veces.

9.1. Análisis bioinformático de la pirofosfatasa citosólica (TgPPasa)

Se realizó el análisis bioinformático de las dos PPasas de *T. gondii*, con el fin de conocer sus propiedades estructurales, espaciales y de composición. A continuación, presento lo obtenido mediante el análisis antes mencionado.

Las características de la TgPPasa se encuentran resumidas en la **tabla 3**. El análisis *in silico* con el *software* ProtParam mostró que la TgPPasa con 381 aa en su secuencia, previamente mostrada en la **tabla 2**, posee un punto isoeléctrico de 5.56 pI, 36 residuos con carga negativa (Asp + Glu); mientras que el número total de residuos con carga positiva (Arg + Lys) es de 31. Como parte de su composición atómica posee 1,205 carbonos (C), 1,876 hidrógenos (H), 336 nitrógenos (N), 343 oxígenos (O) y 6 azufres (S). Un índice alifático de 89.11 y media general de hidropatía (GRAVY) de -0.383.

Tabla 3. Características generales de la TgPPasa

Tipo	Datos
Nombre de la proteína	<i>Soluble inorganic pyrophosphatase</i>
Nombre del gen codificante	<i>sPPI</i>
Tipo de enzima	Difosfatasa inorgánica; pirofosfatasa inorgánica
Cofactor	Mg ²⁺
Organismo	<i>Toxoplasma gondii</i>
ID Taxonómico	5811 [NCBI]
ID PDB	5WRT [PDB]
ID UniProt	Q4VUZ3 [UniProt]
Ligandos	Magnesio, fijación de metales
Funciones moleculares	Actividad de la difosfatasa inorgánica
	Unión de iones de magnesio
	Hidrolasa
	Actividad de pirofosfatasa
	Actividad hidrolasa, que actúa sobre los anhídridos ácidos

La composición aminoacídica de la TgPPasa está conformada principalmente por Leucina (11.1 %) y en menor porcentaje por Cisteína (0.4 %); (**Tab. 4**). La predicción de estructuras secundarias, basadas en la propensión de su secuencia es: 48.09 % *Random coil*, 33.62 % *Alpha helix* y 18.30 % *Extenden strand*.

Tabla 4. Composición porcentual de aminoácidos en la secuencia de la TgPPasa

Tipo de aminoácido	Conformación en la secuencia (%)
Leucina (L)	11.1
Valina (V)	9.8
Arginina (R)	8.9
Glutamato (E)	8.5
Glicina (G)	8.5
Prolina (P)	7.2
Aspartato (D)	6.8
Alanina (A)	6.0
Lisina (K)	4.3
Serina (S)	4.3
Fenilalanina (F)	3.8
Asparagina (N)	3.0
Isoleucina (I)	3.0
Tirosina (Y)	3.0
Treonina (T)	2.6
Triptófano (W)	2.6
Glutamina (Q)	2.1
Histidina (H)	2.1
Metionina (M)	2.1
Cisteína (C)	0.4

Con respecto a las interacciones proteína-proteína, los resultados obtenidos determinaron la homología estructural de la TgPPasa con respecto a otras proteínas. En la **figura 14**, se observan los nodos de la red que representan proteínas generadas a partir de un único locus proteico. El análisis evidenció las interacciones proteicas putativas, subdivididas en 11 nodos y 24 conexiones (*edges*), con un grado de nodo medio de 4.36 y un coeficiente medio de agrupación local de 0.646.

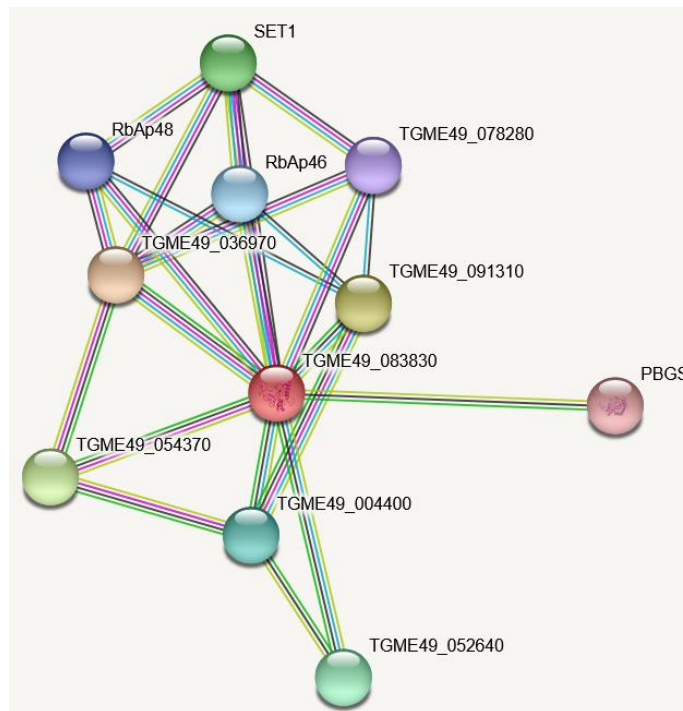


Figura 14. Red de interacciones proteína-proteína de la TgPPasa. Se muestran las interacciones entre proteínas como una red intrincada de interacción proteína-proteína (la descripción de las abreviaturas se describen en la tabla 5). Generado en STRING string-db.org (Jensen *et al.*, 2009).

De acuerdo con la red haplotípica, las probables interacciones de la TgPPasa predichas por STRING, mostrados en la **tabla 5**, indican que la interacción proteína-proteína de la enzima TgPPasa, tiene mayor *score* con la proteína que contiene el dominio N-terminal de la familia SNF2 (TGME49_036970) y menor *score* con respecto al ácido delta-aminolevulínico deshidratado, perteneciente a la familia ALAD (TGME49_053900). Estos resultados corresponden a los nodos mostrados en la **figura 14**.

Tabla 5. Probables interacciones de la TgPPasa predichos por STRING. Se muestra la descripción detallada de los nodos. La red asociada se muestra en la figura 14.

ID	Descripción	Organismo	Score
1	TGME49_083830 Pirofosfatasa inorgánica soluble	<i>Toxoplasma gondii</i>	---
2	TGME49_036970 Proteína que contiene el dominio N-terminal de la familia SNF2	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.998
3	TGME49_091310 Subunidad proteolípídica de 22 kDa de la ATP sintasa vacuolar, putativa ; Pertenece a la familia de subunidades proteolípídicas de la V-ATPasa	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.939
4	TGME49_054370 Proteína que contiene el dominio catalítico de la adenilato y la guanilato ciclasa	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.911
5	SET1 TGME49_026810 Histona-lisina N-metiltransferasa; proteína con dominio SET / proteína con bromodominio	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.909
6	TGME49_052640 Pertenece a la familia de las ATPasas transportadoras de cationes (tipo P) (TC 3.A.3). Subfamilia tipo IIIA	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.906
7	TGME49_004400 Produce ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.878
8	RbAp46 TGME49_047250 Proteína de unión al retinoblastoma, putativa; dominio WD, proteína que contiene dominio de repetición G-beta	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.870
9	RbAp48 TGME49_064820 RbAp48; proteína de repetición WD-40, putativa	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.870
10	TGME49_078280 Proteína que contiene repeticiones de WD-40	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.870
11	PBGS TGME49_053900 Ácido delta-aminolevulínico deshidratado; Pertenece a la familia ALAD	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.833

9.2. Análisis bioinformático de la pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1)

La TgVP1es un transportador activo de H⁺ mediante la hidrolisis del PPI. Su estructura es homodimérica y utiliza como cofactor al Mg²⁺ (Lin *et al.*, 2012). En la **tabla 6** se muestran las características generales de esta enzima.

Tabla 6. Características generales de la pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1)

Tipo	Datos
Nombre de la proteína	<i>H(+)-exporting diphosphatase</i>
Nombre del gen codificante	ORF Names: TGME49_248670 BN1205_003120
Tipo de enzima	Difosfatasa; pirofosfatasa
Cofactor	Mg ²⁺
Organismo	<i>Toxoplasma gondii</i> (strain ATCC 50861 / VEG)
ID Taxonómico	432359 [NCBI]
ID PDB	N/A
ID UniProt	B6KH90 [UniProt]
ID ToxoDB	TGME49_048670
Ligando	Magnesio
Funciones moleculares	Actividad de la difosfatasa inorgánica Actividad del transportador transmembrana de protones impulsada por la hidrólisis del pirofosfato. Hidrolasa Translocasa
Proceso biológico	Transporte de iones

La secuencia de la TgVP1, mostrada en la **tabla 7**, consta de 816 aminoácidos en su secuencia peptídica. Sin embargo, hasta el momento no ha sido dilucidada su estructura terciaria a través de cristalografía o algún otro método experimental.

Tabla 7. Secuencia aminoacídica de la TgVP1

Tipo	Secuencia	Longitud
PPasa membranal > B6KH90_TOX GV <i>H(+)- exporting diphosphat ase Toxopl asma gondii (strain</i>	1 MGGRRRSFFLSTAGALAPAVATTTVSLIVLSSSFPLLSS	816 aa
	40 SSPESEGDRFQVTAATRDVPEEASVAASRELSEEDATLRI	
	80 DKATTCLLLLPSIIIGLFWAVYEAWKVSQIQMDGPLGDDKR	
	120 LTDPLYLEMSGNIQQQLNMMKSI SRCIADGAI TFLTQEFK	
	160 KYMAVYIVVFSSILGIFVGIPTMAAFVLGALTSILCGFVG	
	200 MKIAVYSNVRTCHEAWMELGRGFQVALTAGSVMGFALVSL	
	240 GCLTLVAII LLYRLPSLFGTNPEDQRALFEAVAGYGLGGS	
	280 SIALFARVGGGIYTKAADVGADLSGKNEYGMSEDDPRNPA	
	320 CIADNVGDVGDVAGMGADLFGSLAEASCAGLVIAGASIA	
	360 TSASGGPQGLAHSWSGLMFPVLISSTGIFTGIFTVVLVRA	
400 CFSVRCYDDIEKALKWVMFISTGLEMPVLILLSYFFLPSE		
440 FLLDGCQGT TAWHHAACVVLGLWAGLAIGYVTEYYTSHS		
480 YFPVREISQTQIVSAATGI IYGLALGYSSTVVP IICLGVT		
520 IIVSHTLCGMYGIALAALGMLSTLT MGLMIDGYGPISDNA		

ATCC 50861 / VEG) 560 GGIAEMAGLGPEVRSRTDALDAAGNTTAAVGKGYAIGSAA
 600 LVSLALFGAFTVRAHITAVDVLDPWTFGLLFGAMMPYAF
 640 SAMTMKSVGIAASDMVQECLQQFPLIIQGNIEPQYKRCIE
 680 ISTRASLHEMIAPGALVICAPVAAGMMFGKNCTAGLLAGA
 720 LVSGIQLAISASTSGSAWDNAKKYIESGALGADHGKGSQA
 760 HKNAVTGDTVGDPLKDTSGPSLNILIKLSAIIISLVFGAFI
 800 AEHFSNAQGGPAWVRVL

El análisis *in silico* con el *software* ProtParam mostró que la TgVP1 posee un punto isoeléctrico de 5.05 pI con un total de 63 residuos con carga negativa (Asp + Glu) y 45 residuos con carga positiva (Arg + Lys). Como parte de su composición atómica posee 3,837 carbonos (C), 6,051 hidrógenos (H), 977 nitrógenos (N), 1,124 oxígenos (O) y 45 azufres (S). Un índice alifático de 103.48 con una media general de hidropatía (GRAVY) de 0.539. La composición porcentual de aminoácidos se presenta en la **tabla 8**; la TgVP1 está conformada principalmente por Alanina (12.4 %) y en menor porcentaje por Histidina (1.2 %).

Tabla 8. Composición porcentual de aminoácidos en la secuencia de la TgVP1

Tipo de aminoácido	Conformación en la secuencia (%)
Alanina (A)	12.4
Glicina (G)	10.9
Leucina (L)	10.8
Serina (S)	8.8
Valina (V)	7.4
Isoleucina (I)	7.1
Treonina	6.0
Fenilalanina (F)	4.4
Aspartato (D)	4.0
Glutamato (E)	3.7
Prolina (P)	3.6
Metionina (M)	3.4
Arginina (R)	2.9
Tirosina (Y)	2.8
Lisina (K)	2.6
Glutamina (Q)	2.5
Asparagina (N)	2.1
Cisteína	2.1
Triptófano	1.3
Histidina	1.2

Por otra parte, en las interacciones proteína-proteína identificadas por STRING, basadas en la semejanza de secuencia la TgVP1 con respecto a otras proteínas, los resultados obtenidos muestran 11 interactores (nodos) y 15 conexiones (*edges*) con una media entre nodos de 2.73 y un coeficiente medio de agrupación local de 0.843 (**Fig. 15**)

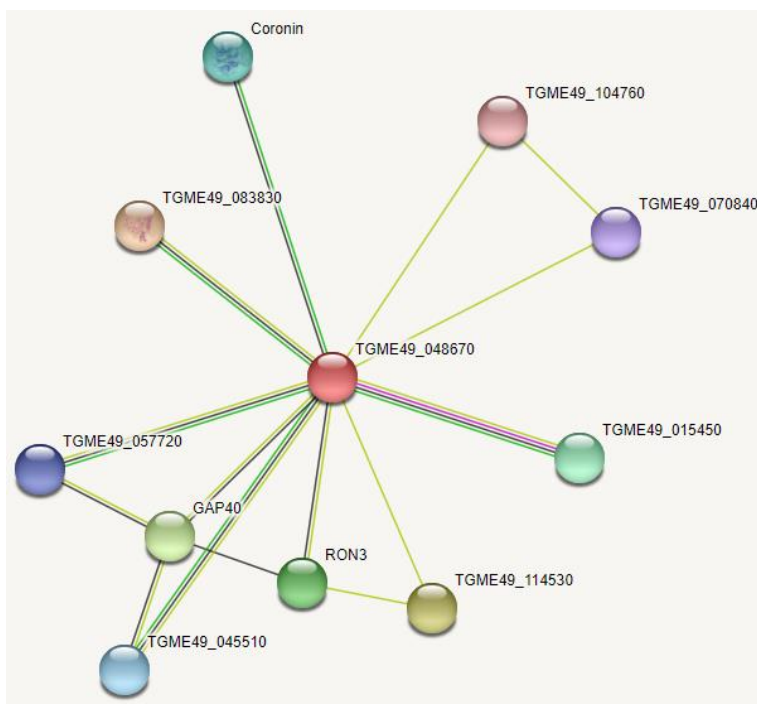


Figura 15. Red de interacciones proteína-proteína de la TgVP1. Se muestran los interactores detectados como circulas (11 nodos) y las relaciones entre ellos como conexiones (15 *edges*). El significado de los símbolos se describe en la tabla 9. Generado en STRING string-db.org (Jensen *et al.*, 2009).

De acuerdo con la red haplotípica de la interacción proteína-proteína, la enzima con una conexión más robusta (*higher score*) es con la pirofosfatasa inorgánica soluble (TGME49_083830) y una mucho menos soportada (*lower score*) con respecto a la proteína que contiene un motivo de reconocimiento de RNA (TGME49_104760) (**Tab. 9**). Estos resultados corresponden a los nodos mostrados en la **figura 15**.

Tabla 9. Probables interacciones de la TgVP1 predichos por STRING. Se muestra la descripción detallada de los nodos. La red asociada se muestra en la figura 15.

ID	Descripción	Organismo	Score
1 TGME49_048670	Pirofosfatasa translocadora de H(+) tipo V VP1; Pirofosfatasa inorgánica translocadora de H+ TVP; Pirofosfatasa inorgánica translocadora de H+ TVP, putativa	<i>Toxoplasma gondii</i>	---
2 TGME49_083830	Pirofosfatasa inorgánica de tipo I; Pirofosfatasa inorgánica soluble	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.672
3 TGME49_114530	Familia RPAP1, proteína C-terminal; proteína que contiene el dominio N C similar a RPAP1	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.671
4 GAP40	Proteína GAP40; Proteína 40 asociada al deslizamiento	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.542
5 RON3	Rhoptry neck protein RON3	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.509
6 TGME49_015450	Acuaporina; Acuaporina, putativa ; Pertenece a la familia MIP/acuaporina (TC 1.A.8)	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.507
7 Coronin	Coronin, putativa	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.483
8 TGME49_045510	ATPasa de tipo P transportadora de fosfolípidos, proteína de la subfamilia flippase; ATPasa de tipo P, putativa; ATPasa transportadora de fosfolípidos, putativa	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.456
9 TGME49_057720	ATPasa putativa de protones; ATPasa de tipo P transportadora de fosfolípidos, putativa	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.456
10 TGME49_070840	Proteína que contiene el dominio catalítico de la poli(adp-ribosa) polimerasa; Poli [ADP-ribosa] polimerasa; NAD(+) ADP-ribosiltransferasa, putativa	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.448
11 TGME49_104760	Proteína que contiene un motivo de reconocimiento de RNA	<i>Toxoplasma gondii</i>	0.446

9.3. Modelado estructural de la TgVP1 mediante AlphaFold2

La estructura de las proteínas puede facilitar la comprensión mecánica de su función. El desarrollo de métodos computacionales para predecir las estructuras tridimensionales (3D) de las proteínas a partir de la secuencia proteica ha sido de gran ayuda en casos en donde no se conoce la estructura cristalizada, tal como es el caso de TgVP1 (ID: B6KH90). Con la finalidad de obtener un modelo confiable de la TgVP1 y conocer su probable estructura 3D para el diseño de péptidos inmunogénicos, se utilizó el *software* AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021).

La proteína TgVP1 fue modelada empleando más de 5,000 secuencias disponibles en las bases de datos de referencia, para generar diversos alineamientos múltiples (MSA) utilizando el método de detección de homología HMMer y HHblits (Mirdita *et al.*, 2022) con lo cual, un módulo separado, emplea los mapas de contactos, la abundancia de secuencias disponibles y la calidad de las interacciones no covalentes, para predecir un *score* de calidad llamado pLDDT. EL mapa pLDDT se interpreta como la distancia entre las posiciones nativa y predicha para el aminoácido Y, cuando se elige la posición X como referencia. El análisis debe repetirse para todos los aminoácidos, tomando una a una todos los otros aminoácidos como referencia y el resultado es una matriz de distancias putativas (PDM: *protein distance matrix*) el cual se muestra como un mapa de calor (**Fig. 16a**).

Puesto que la estructura nativa es desconocida, AlphaFold 2.0 emplea otro bloque más de inteligencia artificial para producir esta calificación. Con las secuencias se produce primero un mapa de cobertura, que indica las posiciones del alineamiento frente al número de secuencias en las que dicha posición está representada, generando un histograma, mostrado en la **figura 16b**, con la cobertura de las secuencias analizadas la secuencia primaria de la TgVP1 y las secuencias alineadas de homólogos como entradas. El modelado estructural de la TgVP1 se encuentra conformado por 44.36 % *Random coil*, 35.91 % *Alpha helix* y 19.73 % *Extended strand*.

Como se observa en las **figuras 16a y b**, la confianza en la predicción estructural de la TgVP1 por parte de AlphaFold2, se encuentra mayormente en el corazón del plegamiento, aproximadamente a partir del aminoácido 100 y hasta el 300 y, en menor medida, en los extremos. Esto se debe principalmente a la disponibilidad de información en las bases de datos con la que trabajo AlphaFold2.

Debido a limitaciones en el poder de cómputo disponible, en la **figura 16c** se muestra la representación esquemática del dímero predicho. Sobre esta predicción se encalló la estructura del complejo Mg^{2+} -PPi, con base en la estructura experimental del complejo de la proteína con fosfato y magnesio (Li *et al.*, 2016). Tal como lo indica la bibliografía para el caso de PPasas translocadoras de protones dependientes de Mg^{2+} (Daouda *et al.*, 2017), cada subunidad de la TgVP1 consiste en un dominio integral de membrana formado por 16 hélices transmembranales con dos Mg^{2+} en cada sitio activo, representados en color verde en la

figura 16d. El con un porcentaje de confiabilidad obtenido en la predicción estructural fue del 99 % de confianza, de acuerdo con Jumper *et al.* (2021).

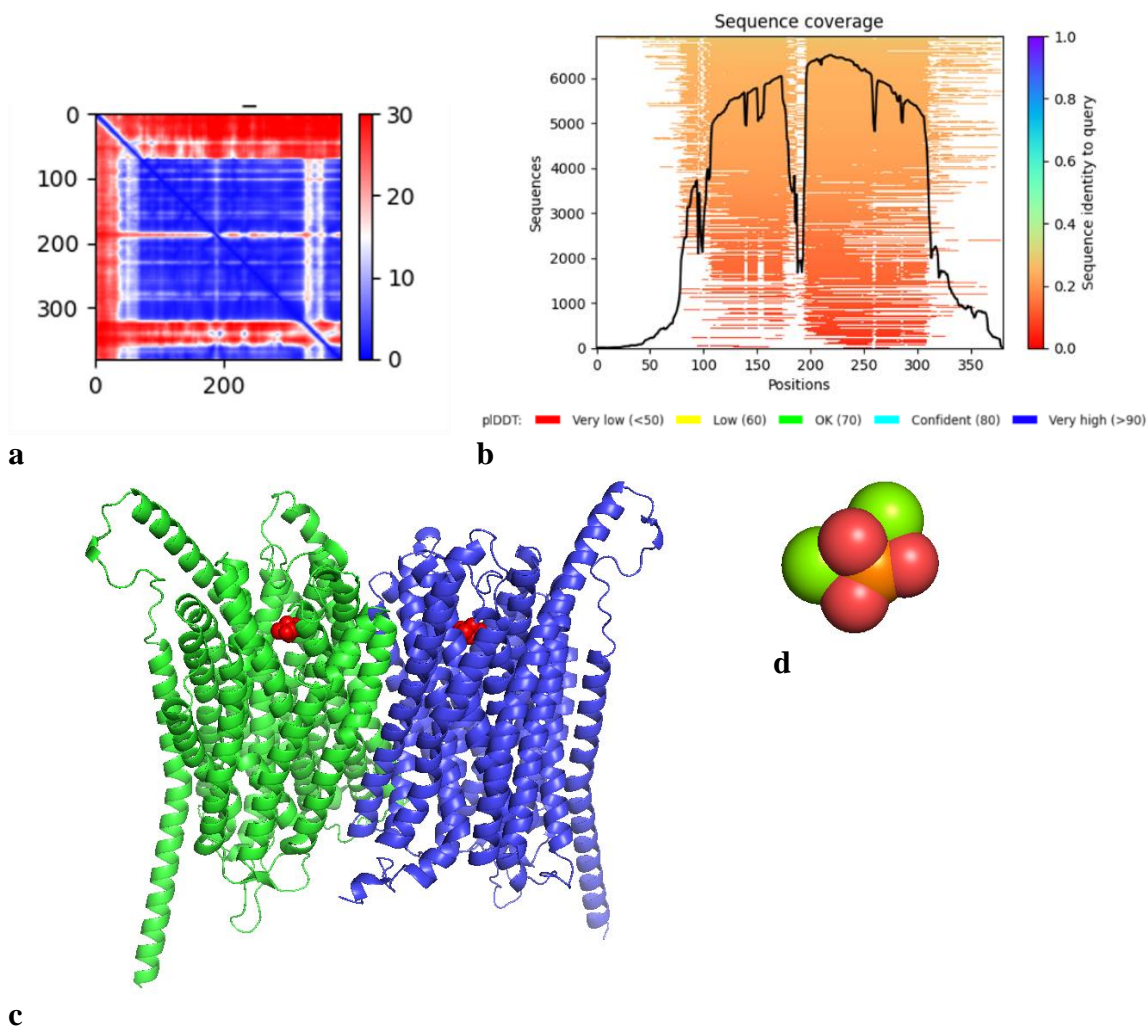


Figura 16. Estructura tridimensional predicha por AlphaFold2 para la TgVP1. a) Mapa de calor del índice confianza pLDDT, tanto el eje X como el eje Y representan la posición en la secuencia de aminoácidos y el color indica la confianza en la escala de colores indicada a la derecha. **b)** Histograma con la cobertura de secuencias, la barra de color indica el porcentaje de identidad de secuencia, medido por regiones en el alineamiento múltiple (MSA). **c)** Representación esquemática de la predicción estructural de la TgVP1 mostrando la estructura homodimérica en color verde y azul. **d)** Estructura del ligando unido al sitio activo mostrado en modelo espacial compacto (Oxígenos (O₂) rojo; Fosforo (P) naranja; Mg²⁺ verde).

9.4. Diseño de péptidos inmunogénicos

Para el diseño de las diferentes construcciones peptídicas se utilizaron las secuencias correspondientes a la TgPPasa y a la TgVP1, las cuales fueron tomadas de la base datos de UniProt y fueron utilizadas en formato .FASTA en la plataforma de IEDB.

9.4.1 Péptido inmunogénico para la TgPPasa

Durante el diseño del péptido inmunogénico para la TgPPasa se seleccionó el epítipo lineal con mayor antigenicidad y accesibilidad, utilizando los métodos de Kolaskar & Tongaonkar, (1990) y Emini *et al.*, (1985), respectivamente. La secuencia del péptido inmunogénico diseñado para la TgPPasa consta de 14 aminoácidos, iniciando en M146 y terminando en A159, con un score de 0.983 con respecto a la antigenicidad y un peso molecular (PM) de 1.65 KDa.

La disponibilidad espacial del epítipo se confirmó con respecto a la estructura terciaria de la proteína, tomando como base la estructura cristalizada de la TgPPasa (**Fig. 17**) en donde se observa la disponibilidad del diseño en la estructura dimérica de la TgPPasa, lo que permitió una adecuada producción de anticuerpos.

Por otra parte, al evaluar la predicción conformacional del epítipo para ser reconocido por linfocitos B, se observó en la **figura 18a**, una elevada accesibilidad, acorde con las predicciones del *software* Distope 2.0 (Kringelum *et al.*, 2012). Por otra parte, al evaluar los posibles plegamientos que pudiera tener el diseño del péptido con RPBS web portal, no se encontró interacción entre los aminoácidos que conforman el diseño (**Fig. 18b**) y esto se corroboró al identificar la secuencia del péptido en la estructura 3D de la TgPPasa. Adicionalmente, se corroboró la confiabilidad del diseño, evaluando la secuencia del péptido en AlphaFold2 para generar el mapa de calor como medida de confianza (**Fig. 18c**)

Péptido inmunogénico

P I **M Q D L K K D G S L R E Y A** S T
 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161

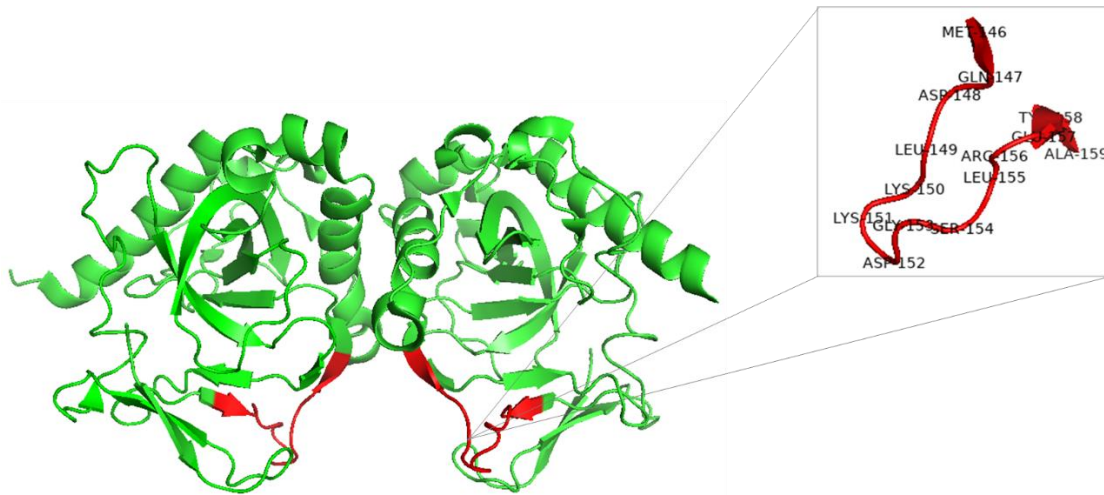


Figura 17. Modelo de la estructura cristalina de la TgPPasa e identificación del péptido inmunogénico diseñado. Se observa la estructura dimerica en color verde, resaltando en color rojo la región correspondiente al péptido inmunogénico diseñado, el cual inicia en M146 y terminando en A159. Generado con PyMoL.

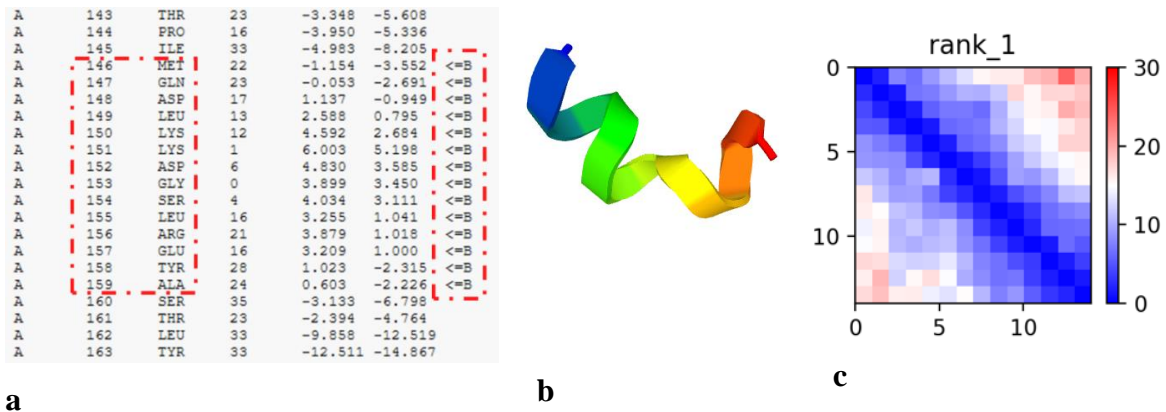


Figura 18. Evaluación del péptido diseñado para la TgPPasa. a) Se muestra la disponibilidad espacial del péptido diseñado para ser reconocido con linfocitos B. Generado en DiscoTope 2.0. b) Evaluación de los posibles plegamientos del péptido con RPBS web portal en donde se muestra que no hay interacción entre los aminoácidos del diseño. c) Mapa de calor mostrando la confiabilidad del diseño. Generado en AlphaFold2

En el caso de la especificidad del diseño peptídico, se comparó la secuencia del epítipo “MQDLKKDGSREYA” en pBLAST, dirigiendo la búsqueda con respecto a *Homo sapiens* (taxid:9606) y *Mus musculus* (taxid:10090) y posteriormente realizando una comparación no dirigida para descartar interacciones cruzadas entre especies relacionadas y no emparentadas, principalmente con respecto al modelo empleado *M. musculus* para evitar reactividad inmunológica cruzada. La secuencia del epítipo también fue descartada de las proteínas identificadas en el análisis de interacción proteína-proteína previamente mostrado en la **figura 14** y **tabla 5**. El resultado obtenido al realizar pBLAST no dirigido mostro inmediatamente un 100 % de identidad con respecto a la TgPPasa; por otra parte, los resultados al dirigir el alineamiento en pBLAST mostraron que no hay interacción entre la secuencia del péptido y *H. sapiens* y *M. musculus*, los cuales se incluyen en el **anexo III**. Finalmente, la secuencia peptídica se envió a sintetizar para realizar los experimentos inmunológicos *in vitro*.

9.4.2. Péptido inmunogénico para la TgVP1

Para el caso del péptido inmunogénico de la TgVP1, el diseño también consto de la mayor antigenicidad y accesibilidad, utilizando los métodos de Kolaskar & Tongaonkar (1990) y Emini *et al.*, (1985), respectivamente. La secuencia del péptido inmunogénico diseñado consta de 16 aminoácidos, iniciando en G112 y terminando en L127, con un score de 1.008 con respecto a la antigenicidad y un pM de 1.67 KDa.

Como se muestra en **figura 19**, la disponibilidad del péptido se confirmó con respecto a la estructura 3D obtenida a partir del modelado con AlphaFold2, en donde se observa la disponibilidad del diseño en la estructura dimérica de la TgVP1, lo que permitió una adecuada producción de anticuerpos.

Péptido inmunogénico

D	G	P	L	G	D	D	N	K	R	L	T	D	P	L	Y	L	Y
111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128

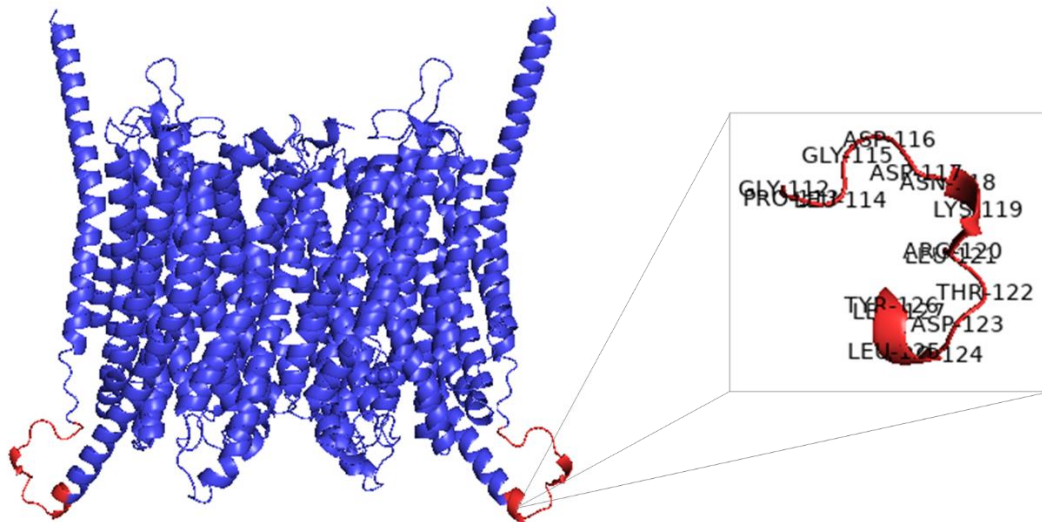


Figura 19. Modelado predicho para la estructura tridimensional de la TgVP1 e identificación del péptido inmunogénico diseñado. Se observa la estructura dimerica en color verde, resaltando en color rojo la región correspondiente al péptido inmunogénico diseñado, iniciando en G112 y terminando en L127. Generado con PyMoL.

Al evaluar la predicción conformacional del epítipo para ser reconocido por linfocitos B (Kringelum *et al.*, 2012), se observó una correcta disponibilidad del péptido diseñado para ser reconocido en la interacción antígeno-anticuerpo (**Fig. 20a**). Adicionalmente, como parte de la evaluación del diseño del péptido “**GPLGDDNKRLTDPLYL**” se evaluaron los posibles plegamientos del diseño en RPBS web portal (**Fig. 20b**) y no se encontraron interacción entre los aminoácidos que conforman el diseño y esto se corroboró al identificar la secuencia del péptido en la estructura 3D de la TgVP1. Adicionalmente, se corroboró la confiabilidad del diseño, evaluando la secuencia del péptido en AlphaFold2 para generar el mapa de calor como medida de confianza (**Fig. 20c**).

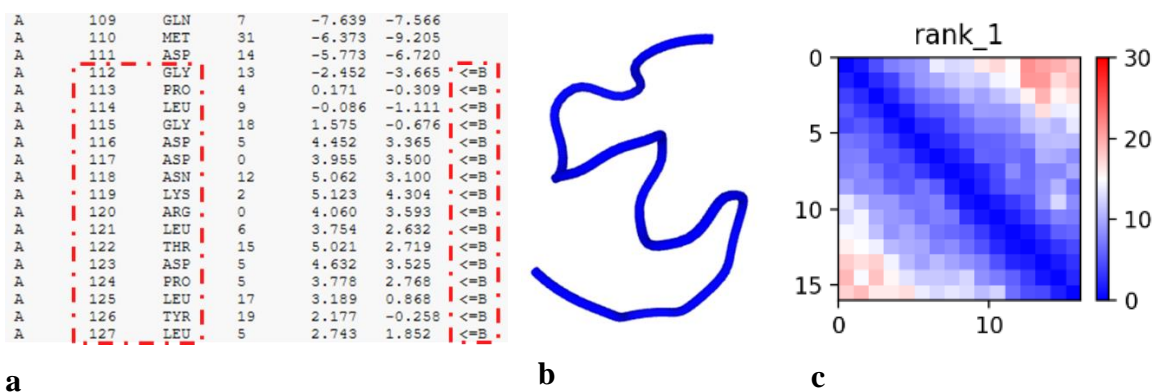


Figura 20. Evaluación del péptido diseñado para la TgVP1. a) Se muestra la disponibilidad espacial del péptido diseñado para ser reconocido con linfocitos B. Generado en DiscoTope 2.0. b) Evaluación de los posibles plegamientos del péptido con RPBS web portal en donde se muestra que no hay interacción entre los aminoácidos del diseño. c) Mapa de calor mostrando la confiabilidad del diseño. Generado en AlphaFold2

Al igual que en el caso del péptido inmunogénico para la TgPPasa, la especificidad del diseño peptídico para TgVP1 se comparó en pBLAST, la secuencia “**GPLGDDNKRLTDPLYL**” fue comparada con respecto a *Homo sapiens* (taxid:9606) y *Mus musculus* (taxid:10090) y posteriormente se realizó una comparación no dirigida para descartar interacciones cruzadas entre especies relacionadas y no emparentadas, principalmente con respecto al modelo empleado *M. musculus* para evitar reactividad inmunológica cruzada. La secuencia del epítipo también fue descartada de las proteínas identificadas en el análisis de interacción proteína-proteína mostradas anteriormente en la **figura 15** y **tabla 9**. El resultado obtenido al realizar pBLAST no dirigido mostro inmediatamente un 100 % de identidad con respecto a la TgVP1. Los resultados del alineamiento en pBLAST se muestran en el **anexo III**. La secuencia peptídica se envió a sintetizar para realizar los experimentos inmunológicos *in vitro*.

9.5. Caracterización immunoquímica de los péptidos diseñados para la TgPPasa y la TgVP1 mediante Wb

Una vez sintetizados los péptidos por la compañía GeneScript® fueron inmunizados los dos grupos de ratones, uno con el péptido inmunogénico diseñado para la TgPPasa y otro para el péptido de la TgVP1. Los sueros inmunes recolectados fueron evaluados mediante

reconocimiento inmune contra los péptidos diseñados para lo cual, se corrieron 10 μ g de cada péptido en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 1.5 %. Posteriormente, los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para verificar mediante Wb con un suero inmune, el inmuno-reconocimiento de la banda correspondiente a 1.65 kDa para el caso de la TgPPasa (**Fig. 21b**) y de 1.67 kDa para la TgVP1 (**Fig. 21d**), respectivamente. Los resultados mostrados en la **figura 21**, demuestran que los anticuerpos generados tanto para la TgPPasa como para la TgVP1 reconocieron el diseño peptídico sintetizado. Además, el control de carga evaluado mediante SDS-PAGE demostró la integridad de los péptidos utilizados durante las inmunizaciones (**Fig. 21a y c**).

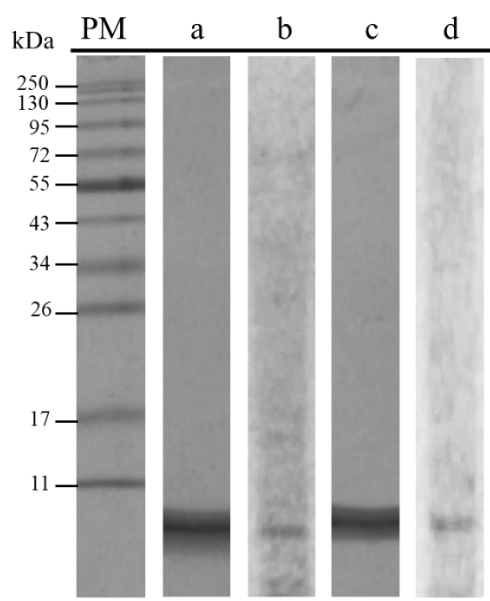


Figura 21. Reconocimiento inmune de los péptidos sintetizados para la TgPPasa y TgVP1. **a)** SDS-PAGE de 10 μ g del péptido inmunogénico TgPPasa. **b)** Inmunoblot con el suero inmune de la TgPPasa mostrando una banda única con un peso de ~1.65 kDa. **c)** SDS-PAGE de 10 μ g del péptido inmunogénico TgVP1. **d)** Inmunoblot con el suero inmune de la TgVP1 mostrando una banda única con un peso de ~1.67 kDa. **PM**, Marcador de peso molecular *Blue Prestained Protein Standard, Broad Range* (11-250 kDa) P7718 NEB®.

Por otra parte, se realizó el ensayo de Wb para la TgPPasa y TgVP1, utilizando los sueros inmunes (dilución 1:150) en extractos totales de taquizoítos, así como los sueros preinmunes correspondientes como controles negativos. Como controles positivos, se utilizaron anticuerpos contra α -tubulina con un pM de 50 kDa y α -actina con un pM de 45 kDa.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para el caso del extracto total, generó el bandeo característico con las distintas proteínas que posee *T. gondii* al ser teñido mediante azul de Coomassie tal como se ha reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Castro-Elizalde, 2015; Cruz-Mirón, 2021), este bandeo validó la correcta aplicación de la técnica de electroforesis (**Fig. 22a**). El análisis del Wb con los sueros inmunes mostró que en el suero inmune contra la TgPPasa se detectó una banda con un peso de ~42 kDa que corresponde al peso de la proteína reportado por (Pace *et al.*, 2011) (**Fig. 22d**). En el caso del suero inmune contra la TgVP1 se detectó una banda de ~85.9 kDa correspondiente al peso reportado para la proteína por (Liu *et al.*, 2014) (**Fig. 22b**). En ambos casos se detectó una sola banda por lo que el diseño de péptidos inmunogénicos produjo anticuerpos policlonales mono-específicos.

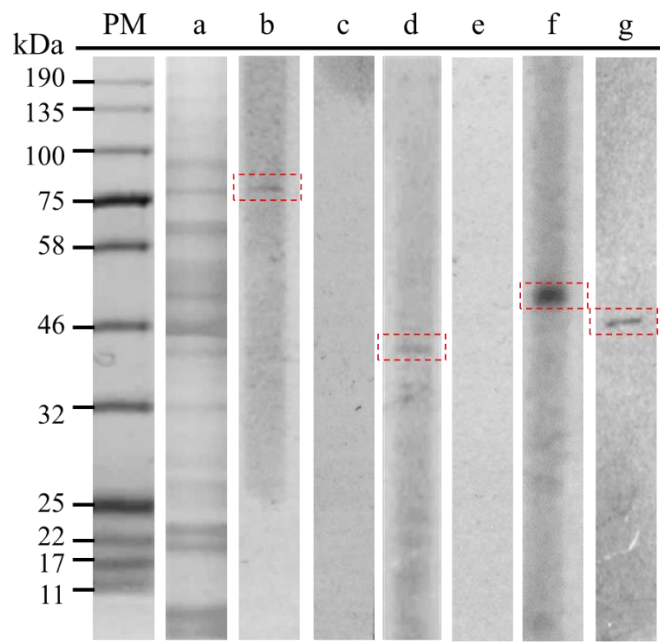


Figura 22. Inmunoblot de la TgPPasa y TgVP1 en extracto total de *T. gondii*. **a)** Extracto total de *T. gondii* [200 µg] (SDS-PAGE). **b)** Suero inmune de la TgVP1 mostrando una banda única con un peso de ~85.9 kDa. **c)** Suero preinmune de la TgVP1. **d)** Suero inmune de la TgPPasa mostrando una banda única con un peso de ~42 kDa. **e)** Suero preinmune de la TgPPasa. **f)** Control positivo anti-tubulina correspondiente a 50 kDa. **g)** Control positivo anti-actina correspondiente a 45 kDa. **PM**, Marcador de peso molecular *Blue Prestained Protein Standard, Broad Range* (11-190 kDa) P7718 (NEB®, UK).

El hecho de que en los sueros preinmunes no se detectara reacción alguna, demuestra que no hubo reacción cruzada en el Wb (**Fig. 22c y e**). En el caso de los controles positivos observó una única banda para tubulina de 50 ~kDa y para actina de 45 kDa (**Fig. 22f y g**).

9.6. Expresión de la inmunoglobulina IgG inducida por los péptidos inmunogénicos para la TgPPasa y TgVP1

Se analizó por ELISA, la producción de isotipos de inmunoglobulinas IgG en los sueros preinmunes e inmunes obtenidos de los tres ratones problema de cada grupo. Los valores de absorbancia obtenidos para cada PPasa fueron extrapolados con respecto a una curva estándar de IgG que se realizó a la par de cada PPasa evaluada. Se empleo el suero de referencia IgG de ratón (Bethyl. No. Cat. RS10-101) por lo que los resultados se presentan cuantitativamente en la **figura 23**.

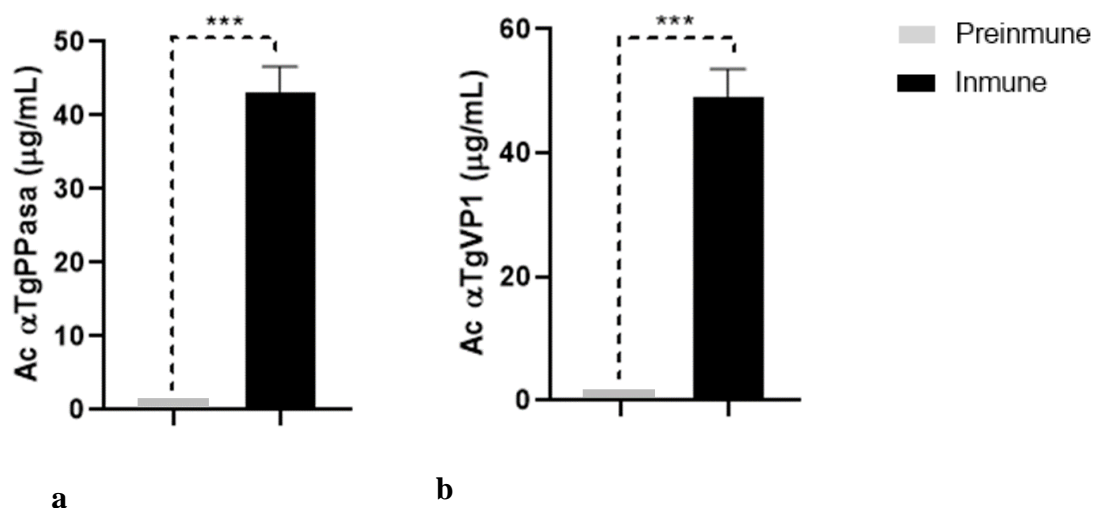


Figura 23. Evaluación de la expresión del isotipo de IgG en sueros preinmunes e inmunes.

a) Evaluación de anticuerpos obtenidos al inmunizar los ratones con el péptido inmunogénico para TgPPasa con respecto al suero inmune como control. La barra representa el promedio (n=3) ± el error estándar (***) con respecto al control (p< 0.005). **b)** Evaluación de anticuerpos obtenidos al inmunizar los ratones con el péptido inmunogénico para TgVP1 con respecto al suero inmune como control. La barra representa el promedio (n=3) ± el error estándar (***) con respecto al control (p< 0.005).

Se obtuvo un incremento en los niveles de producción de IgG en los plasmas inmunes obtenidos al día 47 de acuerdo con el protocolo de inmunización establecido. En los dos grupos de ratones evaluados, los péptidos inmunogénicos realizaron la activación de linfocitos B con lo que se validó el correcto diseño de ambos péptidos. Se obtuvieron valores promedio de 43.069 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de IgG en los sueros inmunes de los ratones a los que se les administro el péptido de la TgPPasa (**Fig. 23a**), mientras que en el caso de los sueros inmunes de los ratones a los que se les administro el péptido de la TgVP1, se obtuvieron valores promedio de 48.970 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de IgG (**Fig. 23b**). En ambos casos los sueros preinmunes utilizados como control no presentaron valores de IgG.

9.7. Distribución de la TgPPasa y TgVP1 en taquizoítos extracelulares de *T. gondii*

Una vez determinada la especificidad de los anticuerpos mediante inmunoblot y ELISA, se realizó la localización celular de la TgPPasa y de la TgVP1 en taquizoítos extracelulares para lo cual, se realizaron inmunofluorescencias utilizando los anticuerpos correspondientes a cada PPasa.

Puesto que la distribución de la TgPPasa se encuentra en el citoplasma del parásito (Pace *et al.*, 2011), se estandarizaron los tiempos de permeabilización con tritón X-100 para la inmunofluorescencia y el óptimo fue de 5 min. Como se observa en la **figura 24**, el análisis de la distribución de la TgPPasa se realizó mediante microscopia de fluorescencia y fue comparada con respecto a los sueros preinmunes, los cuales no mostraron marca. En contraste de fases (phase) se observa la forma característica de media luna de los taquizoítos. En los sueros inmunes se muestra la presencia de la TgPPasa en el citoplasma del parásito particularmente en la zona perinuclear y hacia el extremo anterior en forma de agregados fluorescentes usando un anticuerpo secundario acoplado a FITC.

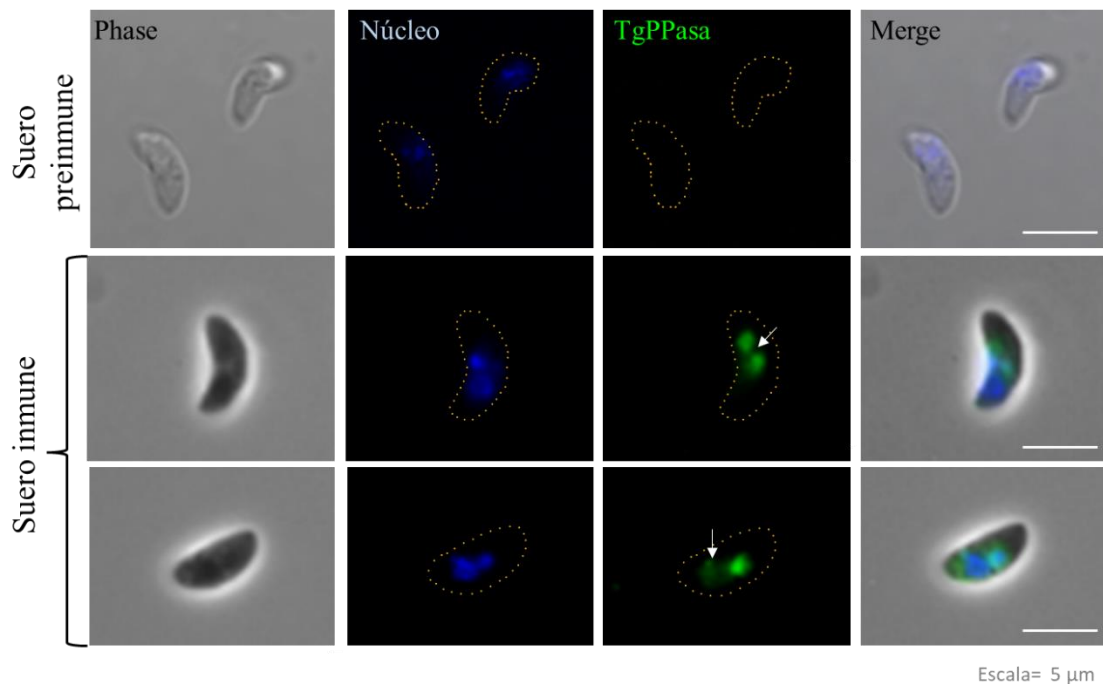


Figura 24. Distribución de la TgPPasa en taquizoítos extracelulares. **Phase**, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases. **Núcleo**, corresponde a la tinción con DAPI. **TgPPasa** corresponde a la detección de esta enzima y revelada con un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Se evaluó el suero preinmune como control negativo y el suero inmune específico contra la TgPPasa. Con fin de facilitar la detección de los parásitos, se delimitaron las periferias de los taquizoítos. Escala= 5 μ m.

Para el caso de la distribución de la TgVP1 se tomó el mismo tiempo de permeabilización (5 min). En este caso, el grupo de Rodrigues *et al.*, (2000) reportaron mediante inmunofluorescencia el marcaje de vacuolas y de la superficie celular de parásitos extracelulares, mientras que los taquizoítos intracelulares se teñían intensamente. Sin embargo, en el grupo de trabajo de Rodrigues *et al.*, (2000) emplearon anticuerpos policlonales específicos para un V-H⁺-PPasa previamente probados en células vegetales y obtuvieron reacción cruzada la V-H⁺-PPasa de *T. gondii*.

Por nuestra parte, en el presente trabajo de tesis se trabajó con los sueros obtenidos después de la inoculación con péptidos inmunogénicos diseñados específicamente para *T. gondii* y al realizar la inmunolocalización en parásitos extracelulares se identificó en el **figura 25**, la presencia de marcas de la TgVP1 en forma de agregados citosólicos distribuidos en el cuerpo de los taquizoítos, posiblemente presentes en los acidocalcisomas como se ha reportado

previamente (Moreno & Zhong, 1996; Rodrigues *et al.*, 2000). Con respecto al suero preinmune, los taquizoítos no presentaron marca fluorescente.

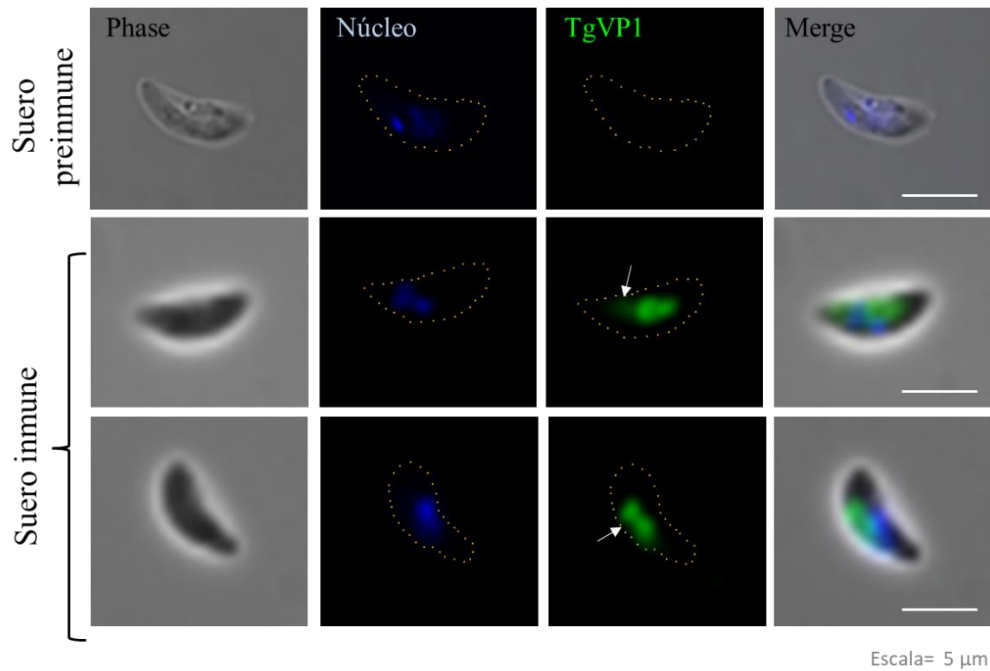


Figura 25. Distribución de la TgVP1 en taquizoítos extracelulares. Phase, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases. Núcleo, corresponde a la tinción con DAPI. TgVP1 corresponde a la detección de esta enzima y revelada con un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Se evaluó el suero preinmune como control negativo y el suero inmune específico contra la TgVP1. Con fin de facilitar la detección de los parásitos, se delimitaron las periferias de los taquizoítos. Escala= 5 μm.

En ambas inmunolocalizaciones se empleó como control positivo parásitos extracelulares marcados con el anticuerpo policlonal anti-GAP45 que marca todo el parásito contra los sueros preinmunes de cada PPasa. Los resultados fueron observados mediante microscopia de fluorescencia y se presentan en la **figura 26**.

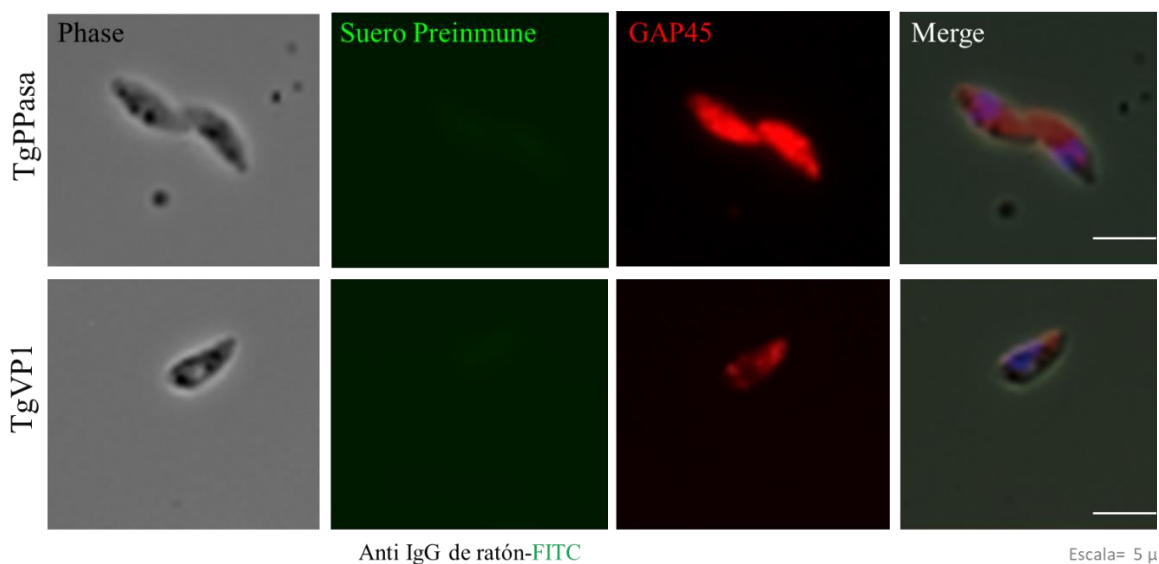


Figura 26. Distribución de GAP45 en taquizoítos extracelulares. Se evaluaron el suero preinmune como control negativo y como control positivo, un anticuerpo contra GAP45 que tiñe la membrana plasmática de *T. gondii*. **Phase**, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases. **Núcleo**, corresponde a la tinción con DAPI. **TgPPasa** y **TgVPI** corresponde al origen de los sueros preinmunes evaluados y detectados con anticuerpos secundarios acoplados a FITC. Escala= 5 μ m.

9.8. Distribución de la TgPPasa y TgVPI en la proliferación celular de *T. gondii*

Con el objetivo de determinar la ubicación de la TgPPasa y la TgVPI durante el proceso de proliferación celular, se infectaron células HEP-2 con taquizoítos extracelulares purificados. Las células infectadas se fijaron en distintos tiempos para conocer la distribución de las PPasas a las 2, 6, 12, 24 y 48 h fueron los tiempos evaluados.

Como se observa en la **figura 27**, la TgPPasa se detecta en el citosol de los taquizoítos intracelulares. A las **2 h** post-invasión cuando hay solo un parásito al interior de la VP, la marca fluorescente se detecta en uno de los extremos del parásito, aunque es difícil determinar a cuál extremo se refiere. A las **6 h** de incubación, ya se detectan dos parásitos intravacuolares y cada uno de ellos tiene la marca de la TgPPasa aparentemente en el extremo posterior en donde están los núcleos de los parásitos. A partir de las **12 h** de proliferación, se tiene una VP con 4 parásitos intravacuolares con la presencia de un cuerpo residual que nos indica la orientación del extremo posterior.

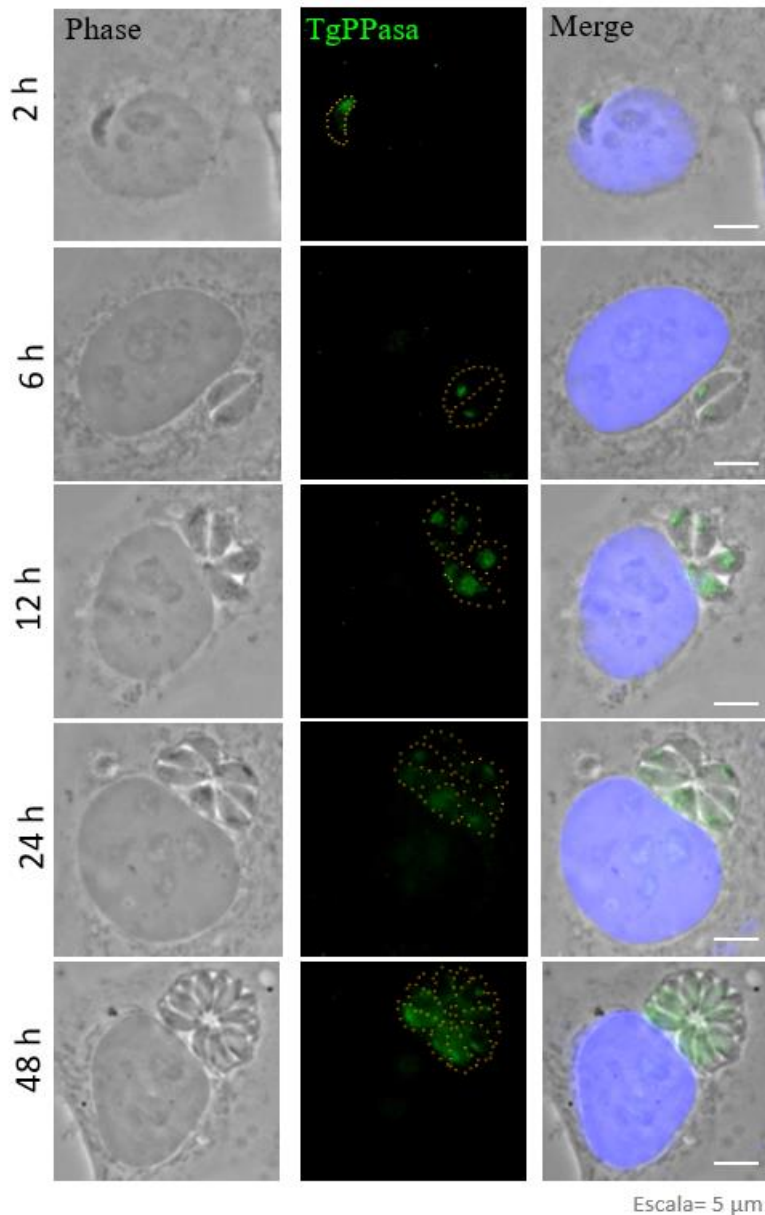


Figura 27. Distribución de la TgPPasa en el proceso de invasión y proliferación intracelular de taquizoítos. Phase, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases de parásitos proliferando a diferentes tiempos. **TgPPasa** fue revelada con el suero inmune y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. **Núcleos**, corresponden a los núcleos de las células HEp-2 que se encuentran teñidos con DAPI. Con el fin de facilitar la detección de los parásitos, se delimitaron las periferias de los taquizoítos. Escala= 5 μ m.

En esta condición, la marca fluorescente se detecta en la parte media de los parásitos y algo de marca en el extremo apical. A las **24** y **48 h** de proliferación cuando los taquizoítos ya se encuentran organizados en la VP en forma de roseta, la marca de TgPPasa se encuentra

mayoritariamente distribuida por el citoplasma de los parásitos, y con agregados en el extremo apical. Como se muestra en la **figura 28**, la marca de la TgPPasa no se detecta en la membrana de la VP ni en el citoplasma o membrana de la célula hospedera. La evaluación del suero preinmune no mostró marcaje fluorescente en ninguno de las fases de proliferación intracelular evaluadas lo que demuestra la ausencia de anticuerpos reactivos contra proteínas de *T. gondii* en los ratones sin inmunizar y apoya la especificidad de los inmunomarcajes obtenidos.

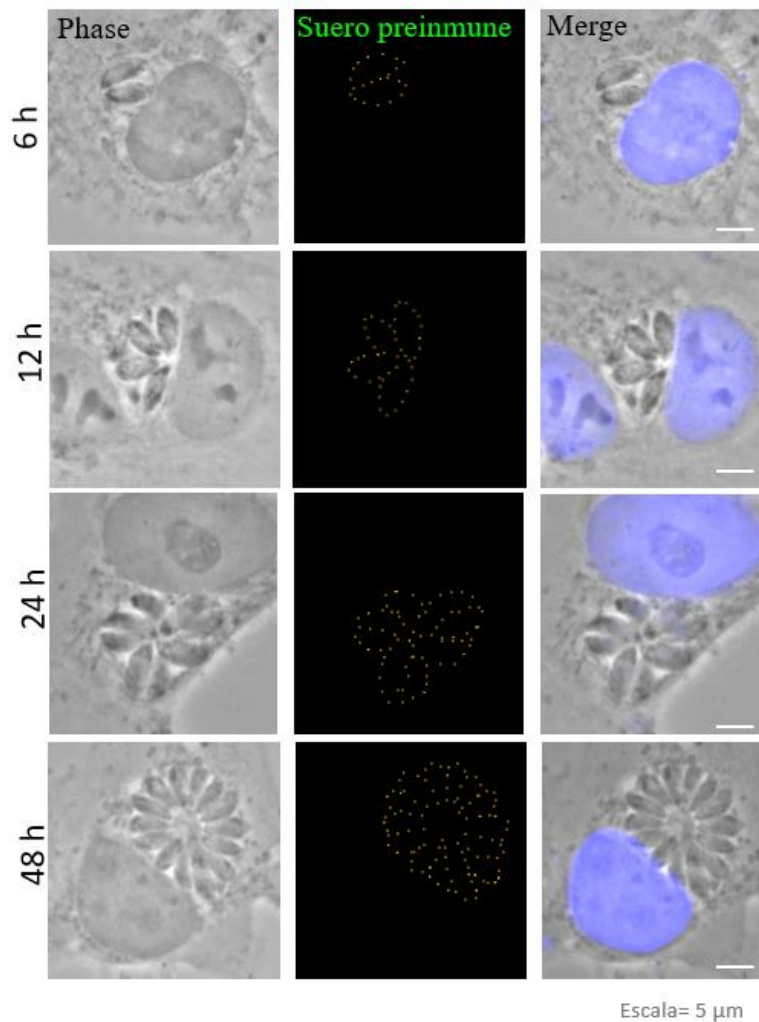


Figura 28. Evaluación de la reactividad del suero preinmune de la TgPPasa en el proceso de proliferación intracelular de taquizoítos. Phase, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases, de parásitos proliferando a diferentes tiempos; Se evaluó el **suero preinmune** y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Los **núcleos** de las células HEP-2 se encuentran teñidos con DAPI. Con fin de facilitar la detección de los parásitos, se delimitaron las periferias de los taquizoítos. Escala= 5 μ m.

Por otra parte, se evaluó la distribución de la TgVP1 durante el proceso de invasión y proliferación intracelular de los taquizoítos. La distribución de la TgVP1, mostrada en la **figura 29**, se monitoreó con FITC. A las **2 h** de invasión, se observó la marca de la TgVP1 ubicada en la parte media y orientado hacia uno de los extremos del parásito. A las **6 h** de proliferación por endodiogenia, la marca de la TgVP1 se sigue detectando en la parte media con cierta orientación hacia uno de los extremos, aún difícil de determinar a este tiempo si la marca corresponde al extremo posterior o al extremo anterior. Sin embargo, a las **12 h** de proliferación, donde se tiene una VP con racimo de parásitos, la marca de la TgVP1 se muestra con mayor evidencia hacia el extremo apical, particularmente en donde están ubicadas las roptrias de los parásitos.

La distribución de la TgVP1 hacia el extremo apical fue más evidente a las **24 y 48 h** de proliferación. No se detectó marca de la enzima en la membrana de la VP, en el cuerpo residual, en la red intravacuolar o en el citoplasma de la célula hospedero.

La especificidad generada por el suero inmune contra la TgVP1 fue evidenciada con el control negativo de suero preinmune en el cual no se detectó ningún marcaje (**Fig. 30**).

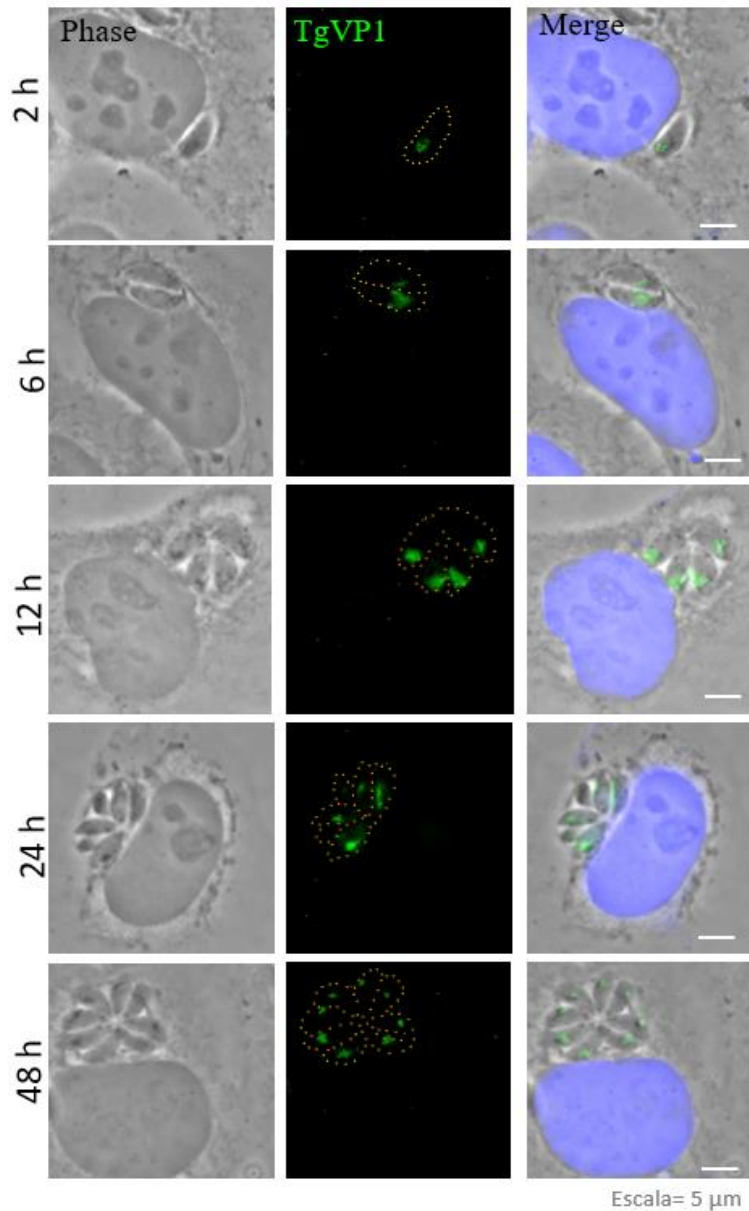


Figura 29. Distribución de la TgVP1 en el proceso de invasión y proliferación intracelular de taquizoítos. Phase, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases, de parásitos proliferando a diferentes tiempos; La **TgVP1** fue revelada con el suero inmune y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Los **núcleos** de las células HEP-2 se encuentran teñidos con DAPI. Con fin de facilitar la detección de los parásitos, se delimitaron las periferias de los taquizoítos. Escala= 5 μ m.

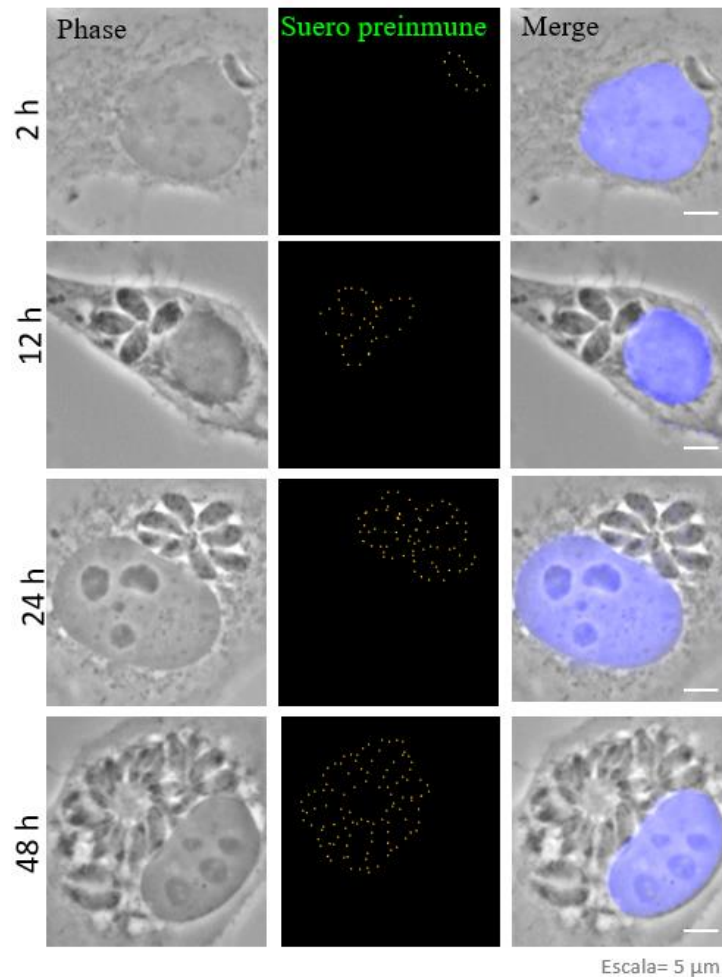


Figura 30. Evaluación de la reactividad del suero preinmune de la TgVP1 en el proceso de proliferación intracelular de taquizoítos. Phase, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases, de parásitos proliferando a diferentes tiempos; Se evaluó el **suero preinmune** y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Los **núcleos** de las células HEp-2 se encuentran teñidos con DAPI. Con fin de facilitar la detección de los parásitos, se delimitaron las periferias de los taquizoítos. Escala= 5 μ m.

Hasta el momento, la evidencia recabada durante el proceso de proliferación celular de *T. gondii* en células HEp-2, sugiere que la TgPPasa se concentra en el citoplasma, probablemente asociado a algún organelo aún no identificado con ubicación central, quizá, los gránulos densos. Adicionalmente, la TgVP1 se detecta en la parte apical de los parásitos probablemente perfilándose hacia la VP. Aunque no se detectó marca en la membrana de la VP, no se descarta la posibilidad que la TgVP1 esté en una cantidad limitada que haya imposibilitado un inmunomarcaje evidente de la VP.

En ambas inmunolocalizaciones se empleó como control positivo el anticuerpo policlonal anti-GAP45 que marca todo el parásito con respecto a los sueros preinmunes de cada PPasa. Los resultados fueron observados mediante microscopía de fluorescencia (**Fig. 31**)

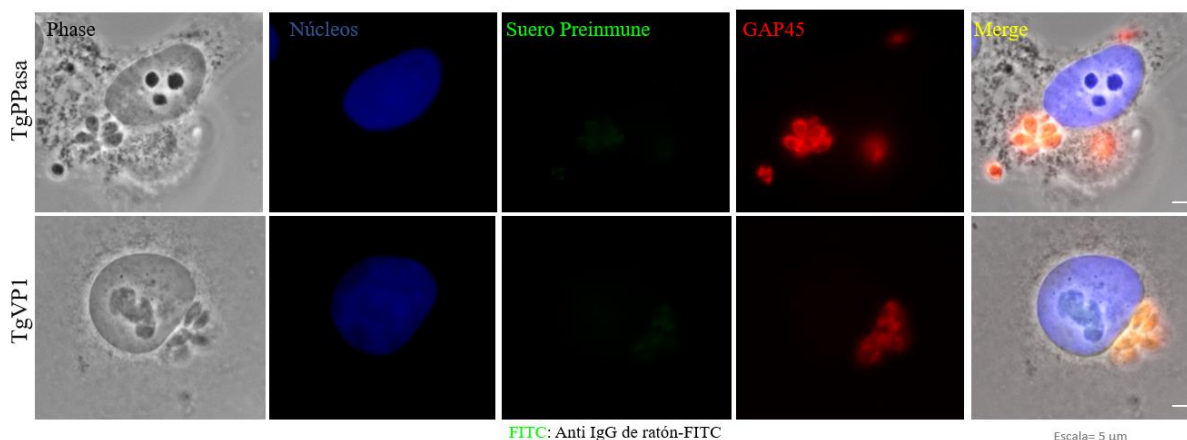


Figura 31. Distribución de GAP45 en proliferación intracelular de taquizoítos. Se evaluó el suero preimmune como control negativo y como control positivo, un anticuerpo contra GAP45 que tiñe a la membrana plasmática de *T. gondii*. **Phase**, corresponde a micrograffías de microscopía de contraste de fases. **Núcleo**, corresponde a la tinción con DAPI. **TgPPasa** y **TgVP1** corresponde al origen de los sueros preinmunes evaluados y detectados con anticuerpos secundarios acoplados a FITC. Escala= 5 μ m.

9.9. Inmunolocalización de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* con IFN γ

Con el fin de determinar la localización topológica de la TgPPasa y la TgVP1 durante el proceso de cigogénesis de *T. gondii*, se tomó en cuenta un reporte previo de nuestro grupo de trabajo (Cruz-Mirón, 2021) en donde, se evalúa a partir de taquizoítos extracelulares, un tratamiento con distintas concentraciones de IFN- γ dentro del rango fisiológico de la respuesta inmune, que va de 50 a 1000 U/mL y a distintos tiempos. Posteriormente, realiza la invasión de células HEP-2.

Los resultados del tratamiento demuestran que se logró inducir el enquistamiento *in vitro* de taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* con 200 U/mL de IFN- γ por 2 h, de manera óptima. Este proceso es monitoreado con la lectina *D. biflorus* acoplada a FITC con el fin de detectar

la presencia de la glicoproteína de quiste CST1, mediante fluorescencia a las 48 y 72 h de proliferación.

Como parte del proceso de proliferación, los taquizoítos contenidos en las VP forman las rosetas características y la reproducción por endodiogenia mantiene el equilibrio de proliferación 2^n , es decir los parásitos se multiplican de 2 en 2. Sin embargo, al inducir el proceso de enquistamiento con $IFN\gamma$, los taquizoítos contenidos en las VP pierden ese equilibrio y la proliferación se lleva a cabo de manera asincrónica. Además, en algunos casos, los taquizoítos empiezan a sufrir el cambio de estadio a estructuras similares a los bradizoítos.

Como se observa en la **figura 32**, a las **48 h** de proliferación, los taquizoítos ya presentan una cierta desorganización intravacuolar y se detecta la expresión de CST1 al interior de los parásitos y en el espacio intravacuolar, observado como una tinción homogénea y con una cierta delimitación de la estructura esferoidal de la VP. A las **72 h**, la desorganización intravacuolar de los parásitos es evidente y la VP ya ha adquirido una forma esferoidal característica de los quistes, asimismo, se detecta una mayor expresión de CST1 fluorescente en la estructura quística. En los dos tiempos de incubación está presente CST1 indicada con flechas.

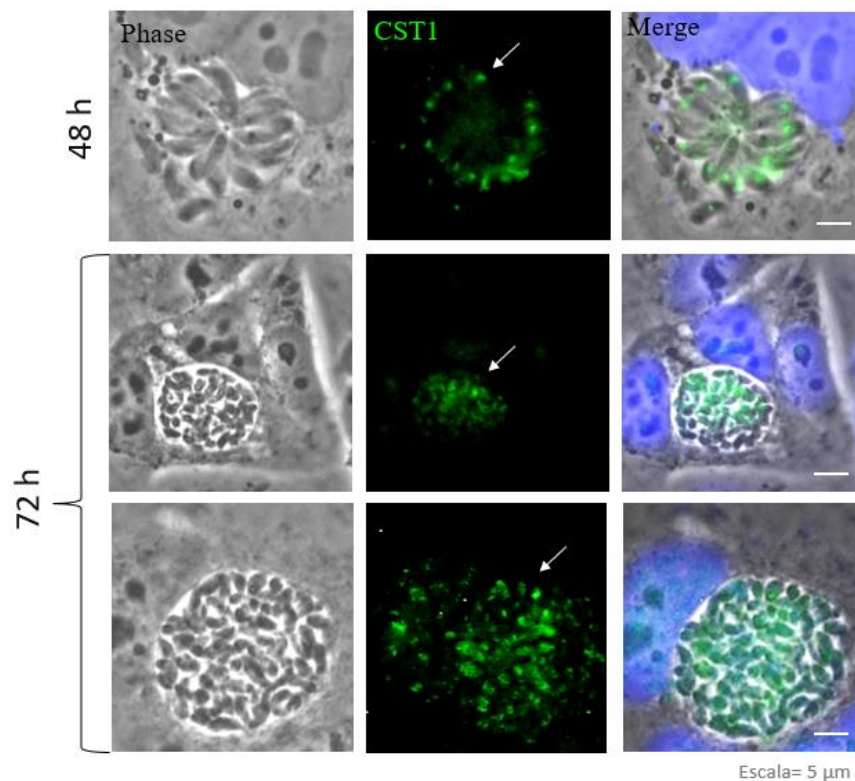


Figura 32. Expresión de CST1 a las 48 y 72 h en taquizoítos extracelulares expuestos a 200 U/mL de IFN- γ y posteriormente invadidos en células HEP-2. Phase, corresponde a micrografías de microscopía de contraste de fases, de parásitos en proceso de enquistamiento inducido con IFN- γ y a diferentes tiempos; Se evaluó la distribución de la glicoproteína CST1 con ayuda de la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC. Los núcleos de las células HEP-2 se encuentran teñidos con DAPI. Escala= 5 μ m.

Para conocer el porcentaje de VP positivas a CST se realizó el conteo de las estructuras “quísticas” en los dos tiempos evaluados. Como se puede observar en la **figura 33**, después de contar ~1 000 células, se identificó un 63 % de VP positivas a CST1 a las 48 h y un 69 % a las 72 h de incubación, lo cual concuerda con los resultados reportados por Cruz-Mirón, (2021). Aunque los resultados obtenidos no son significativamente distintos entre sí (**Fig. 31**), lo que se busca evidenciar es la identificación de CST1 como indicador del proceso de cistogénesis.

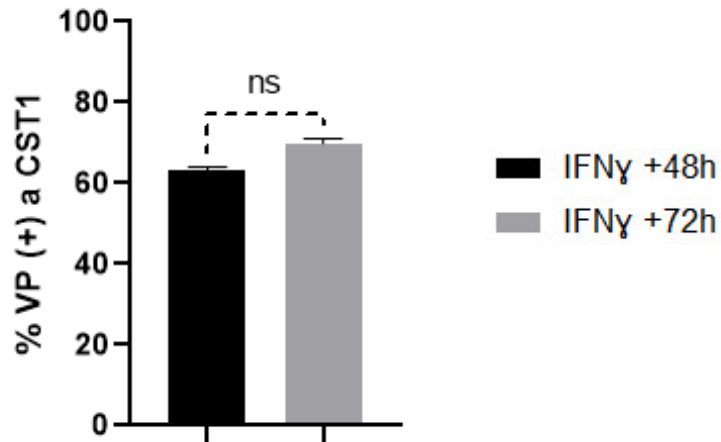


Figura 33. Vacuolas parasitóforas positivas a CST1. Se muestra el porcentaje obtenido después de inducir al enquistamiento con 200 U/mL de IFN- γ a las 48 y 72 h. Las columnas representan el promedio con n=3 y las barras de error son error estándar ns, no significativo estadísticamente vs., los tiempos de incubación con IFN- γ ($p < 0.05$)

Por otra parte, se evaluó la distribución de la TgPPasa y la TgVP1 mediante inmunofluorescencia, con ayuda de los respectivos sueros inmunes durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* inducido con IFN- γ y evidenciado con la lectina de *D. biflorus* para CST1.

Para fines comparativos, se insertó la distribución de la TgPPasa en taquizoítos a las 48 h de proliferación intracelular la cual, fue extraída de la **figura 27**. Cuando se evaluó la distribución de la TgPPasa, durante el enquistamiento inducido por IFN- γ , se observa en la **figura 34**, que con respecto a la proliferación de taquizoítos, hay un cambio evidente en la marca, de estar la TgPPasa en los taquizoítos se encuentra distribuida con una ubicación apical y con cierta distribución difusa en el citoplasma, a 48 h de enquistamiento, la TgPPasa, muestra una disminución en la marca, así como, una distribución difusa y la presencia de agregados en los parásitos.

A las **72 h** de enquistamiento, la marca fluorescente de la TgPPasa está muy disminuida, permaneciendo únicamente en forma de agregados esferoidales. En contraste, la marca de CST1 prevalece asociada a la estructura quística observada por Nomarsky.

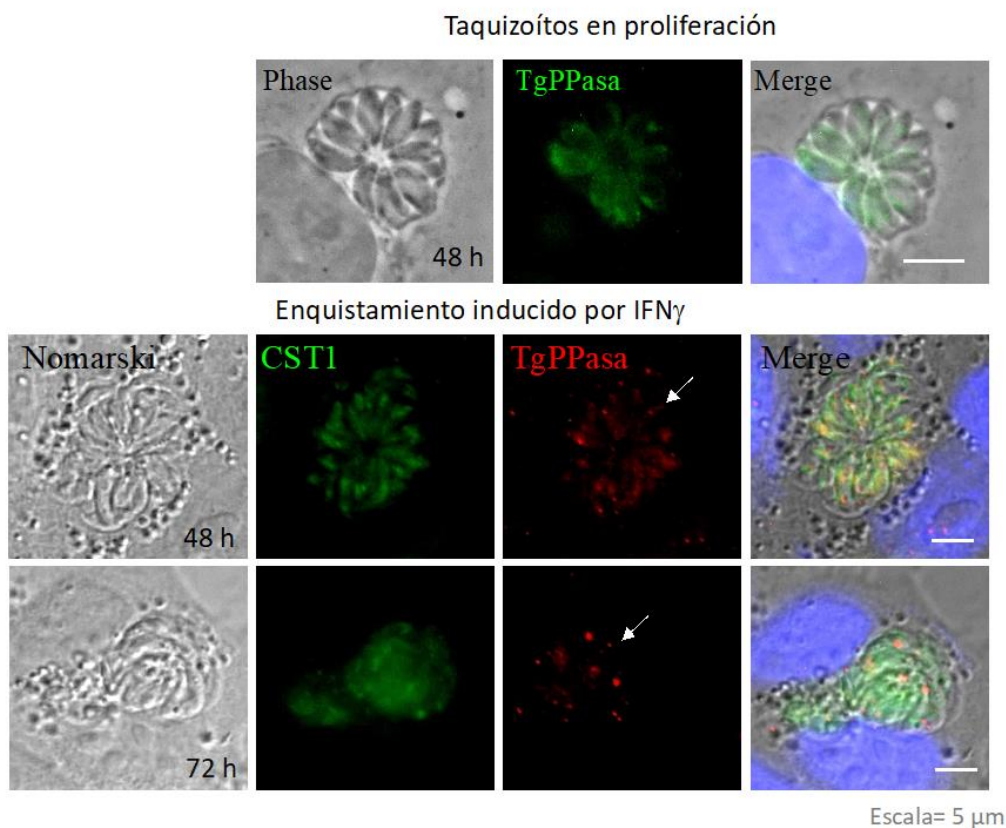


Figura 34. Distribución de la TgPPasa durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* con IFN γ . Las micrografías de “Taquizoítos en proliferación” fueron extraídas en parte de la figura 25 correspondiendo a las 48 h de proliferación para facilitar la comparación con la distribución de la TgPPasa durante el enquistamiento. La marca de la TgPPasa en taquizoítos en proliferación se monitoreó con FITC mientras que, durante el enquistamiento, se monitoreó con TRITC. Los núcleos de las células HEP-2 se encuentran teñidos con DAPI. El enquistamiento fue monitoreado por la expresión de CST1 y detectado con la lectina de *D. biflorus*-FITC. Escala= 5 μ m

Por otra parte, se evaluó la distribución de la TgVP1 durante el enquistamiento de *T. gondii* inducido con 200 U/mL de IFN γ . Para fines comparativos, se insertó la distribución de la TgVP1 en taquizoítos a las 48 h de proliferación intracelular, la cual fue extraída de la **figura 29**. Cuando se evaluó la distribución de la TgVP1 durante el enquistamiento inducido por IFN γ , en la **figura 35**, se observó una clara disminución de la marca de TgVP1 a las 48 h, encontrándose principalmente como agregados en la parte apical de los parásitos, aparentemente, con dirección hacia la VP. Sin embargo, a las 72 h de enquistamiento, la disminución de la marca de TgVP1 fue aún más evidente, quedando solo en agregados fluorescentes limitados la periferia de la VP. La marca de CST1 no se modificó

aparentemente a los tiempos evaluados (48 h y 72 h) encontrando a CST1 asociada a la pared quística naciente y co-localizando en la periferia con los agregados de TgVP1. La presencia de las TgPPasa y la TgVP1 solo se identificó en los parásitos intracelulares o en la VP o quiste en formación, pero no en estructuras de la célula hospedero.

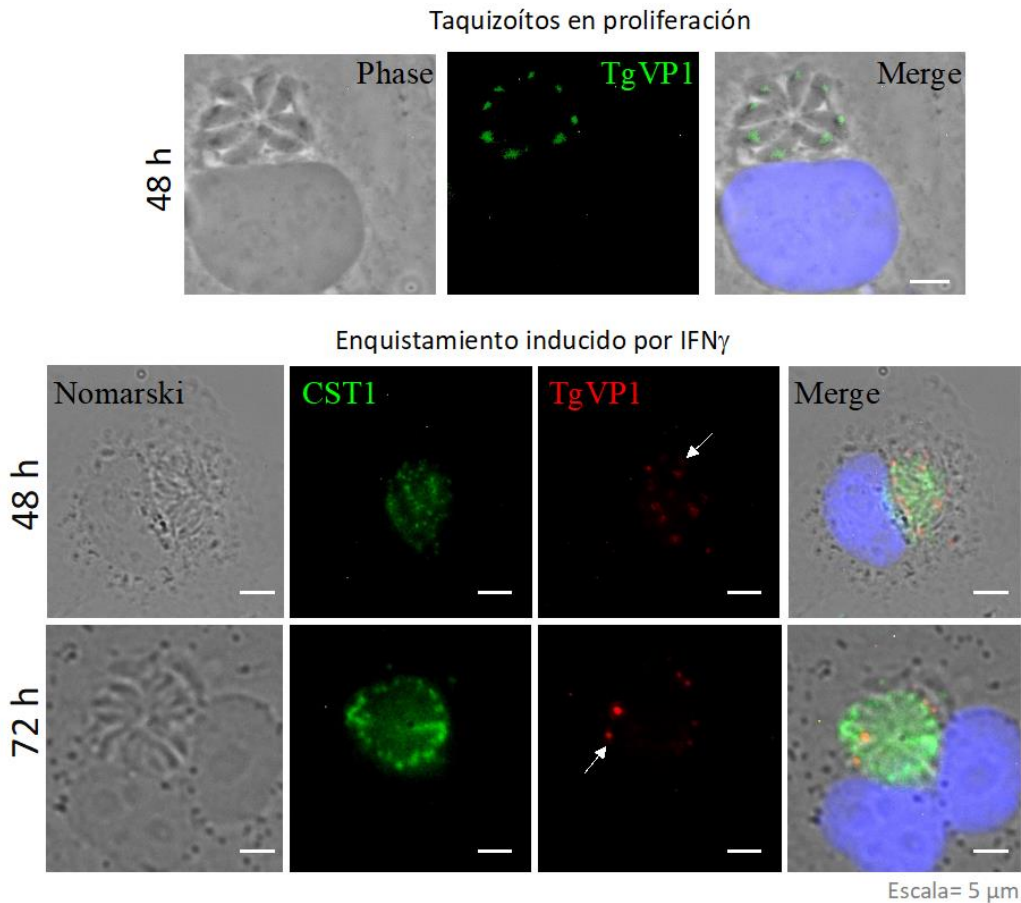


Figura 35. Distribución de la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* con IFN γ . Las micrografías de “Taquizoítos en proliferación” fue extraída en parte de la figura 27 correspondiendo a las 48 h de proliferación para facilitar la comparación con la distribución de la TgVP1 durante el enquistamiento. La marca de la TgVP1 en taquizoítos en proliferación se monitoreó con FITC mientras que, durante el enquistamiento, se monitoreó con TRITC. Los núcleos de las células HEp-2 se encuentran teñidos con DAPI. El enquistamiento fue monitoreado por la expresión de CST1 y detectado con la lectina de *D. biflorus*-FITC. Escala= 5 μ m

9.10. Efecto de los inhibidores de PPasas en la viabilidad de taquizoítos extracelulares

Una vez realizada la inmunolocalización de las PPasas en parásitos extracelulares, en el proceso de proliferación celular y en la inducción al enquistamiento inducido con IFN γ , se evaluó el efecto de inhibidores de PPasas en el proceso de enquistamiento. Los inhibidores que se utilizaron fueron NaF (2, 10 y 20 mM) para inhibir a la TgPPasa y C10-bifosfonato (40, 100 y 200 μ M) para inhibir a la TgVP1.

Primeramente, se determinó el posible efecto de los inhibidores de las PPasas en la viabilidad de los taquizoítos extracelulares tratados con las concentraciones de cada inhibidor anteriormente indicadas, por 2 h a TA. Posteriormente, se determinó la viabilidad de los parásitos mediante suspensión en Sytox Green y se determinó el porcentaje de viabilidad de los taquizoítos. El colorante Sytox Green produce una tinción verde fluorescente para cromosomas y núcleo, y es impermeable en células vivas, lo que lo convierte en un indicador útil de parásitos extracelulares muertos.

Los taquizoítos recién extraídos del peritoneo de ratones infectados, presentan una viabilidad superior al 90 %. Cuando los taquizoítos se incubaron con el inhibidor NaF (2, 10 y 20 mM) para inhibir a la pirofosfatasa citosólica (TgPPasa), se obtuvo un 88 % de viabilidad en los taquizoítos mantenidos en solución con 2 mM de NaF, mientras que para los taquizoítos tratados con 10 mM la viabilidad fue del 85 % y para 20 mM del 81 %. Estos valores, presentados en la **figura 36**, fueron comparados con respecto a los taquizoítos mantenidos en PBS como control, los cuales mantuvieron una viabilidad del 96 %. El tiempo de incubación fue de 2 h en todos los casos. Al observar los parásitos en el microscopio, no se observó alteración en su morfología.

Por otra parte, en la **figura 37**, se presentan los resultados del tratamiento de parásitos extracelulares con C10-bifosfonato (40, 100 y 200 μ M) para inhibir a la TgVP1, se observó un 89 % de viabilidad en los taquizoítos mantenidos en solución con 40 μ M de C10-B, mientras que para los taquizoítos tratados con 100 μ M de C10-B la viabilidad fue del 86 % y para 200 μ M de C10-B de 81 %. Estos porcentajes fueron comparados con respecto a los taquizoítos mantenidos en PBS como control, en donde se observó un 95 % de viabilidad. El tiempo de incubación fue de 2 h en todos los casos. La incubación con este inhibidor no alteró la morfología de los parásitos.

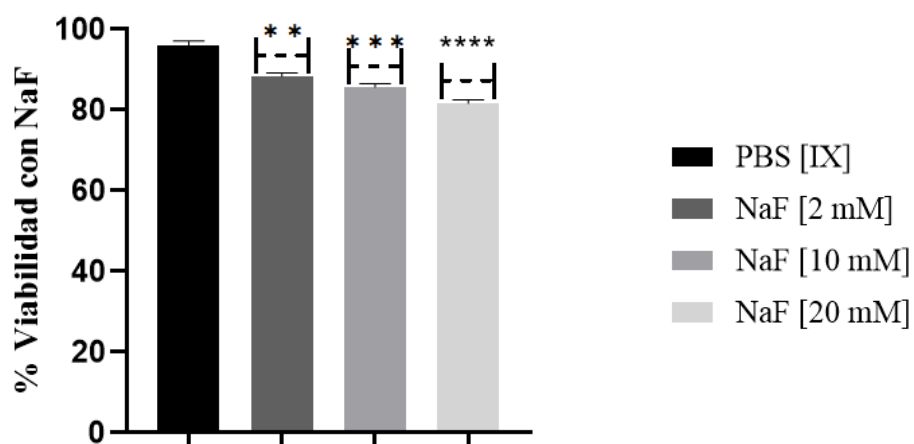


Figura 36. Viabilidad en parásitos extracelulares tratados con distintas concentraciones de NaF como inhibidor de la TgPPasa. Las columnas representan el promedio, con n=3 y las barras de error son error estándar **, *** y **** vs., las concentraciones de NaF evaluadas ($p < 0.01$, $p < 0.005$ y $p < 0.0001$, respectivamente).

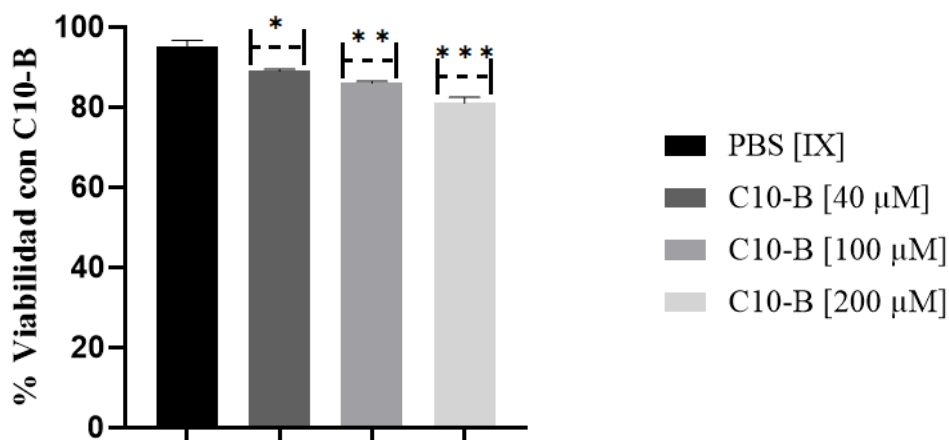


Figura 37. Porcentaje de viabilidad en parásitos extracelulares tratados con distintas concentraciones de C10-Bifosfonato como inhibidor de la TgVP1. Las columnas representan el promedio, con n=3 y las barras de error son error estándar *, ** y *** vs., las concentraciones de C10-bifosfonato evaluadas ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.005$, respectivamente).

9.11. Efecto de los inhibidores de PPasas en el proceso de invasión celular

Toda vez que se determinó que los inhibidores de PPasas evaluados no eran tóxicos en taquizoítos extracelulares, se evaluó el efecto de estos inhibidores en la invasión celular.

Se trataron taquizoítos extracelulares con los inhibidores NaF y C10-Bifosfonato para la TgPPasa y TgVP1, respectivamente, utilizando las concentraciones antes indicadas. Posteriormente, se invadieron células HEp-2 y transcurridas 2 h se fijaron con glutaraldehído. Se determinó el porcentaje de invasión en cada tratamiento. Como controles negativos se emplearon taquizoítos en PBS sin inhibidores.

Al evaluar cada tratamiento se identificó que, a las 2 h de invasión, los taquizoítos mantenidos en solución con 2, 10 y 20 mM de NaF previo a la invasión celular no alteraron la morfología de los taquizoítos y tampoco de las células HEp-2, como se muestra en la **figura 38**. No se identificó toxicidad por parte del NaF de manera considerable, en la máxima concentración evaluada (20 mM) se obtuvo una disminución en el porcentaje de invasión de alrededor de dos unidades.

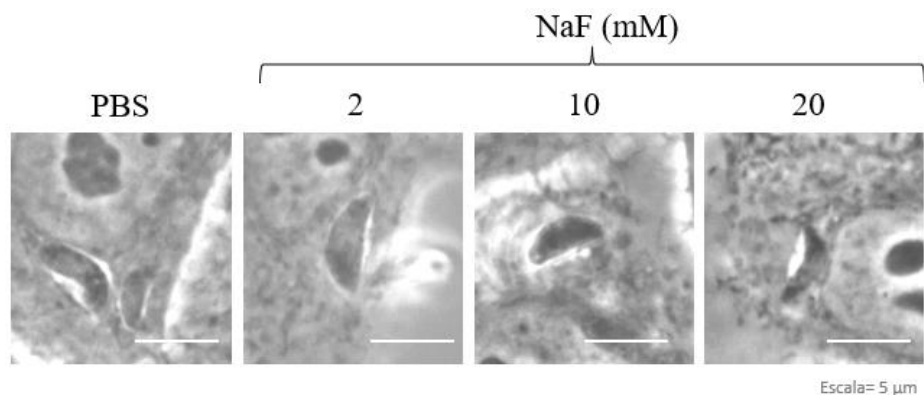


Figura 38. Efecto del NaF en la morfología intracelular de los taquizoítos. PBS, células HEp-2 invadidas con taquizoítos mantenidos en PBS; NaF, células invadidas con taquizoítos tratados con 2, 10 y 20 mM de NaF. Escala= 5 μ m.

El efecto de NaF en el proceso de invasión fue monitoreado mediante el conteo de 1,000 células HEp-2 y se determinó el porcentaje de invasividad. Como se muestra en la **figura 39**, se observó ligera variabilidad en la invasividad de los taquizoítos a las diferentes concentraciones de NaF usadas.

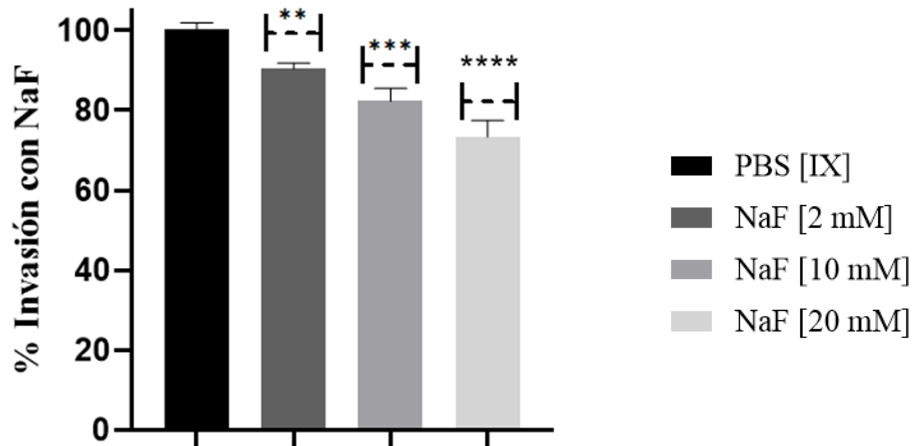


Figura 39. Efecto del NaF en la invasividad de los taquizoítos. Las columnas representan el promedio con $n=3$ y las barras de error son error estándar **, *** y **** vs., las concentraciones de NaF evaluadas ($p<0.01$, $p<0.005$ y $p<0.0001$, respectivamente).

Por otra parte, al evaluar el efecto de C10-Bifosfonato como inhibidor de la TgVP1 en la invasividad de los taquizoítos en células HEP-2, el tratamiento de los taquizoítos por 2 h con las diferentes concentraciones de C10-Bifosfonato (40, 100 y 200 μM), no presentó alteraciones en la morfología de los parásitos ni en las células HEP-2, como se muestra en la **figura 40**, en comparación con el control negativo de taquizoítos solo mantenidos en PBS.

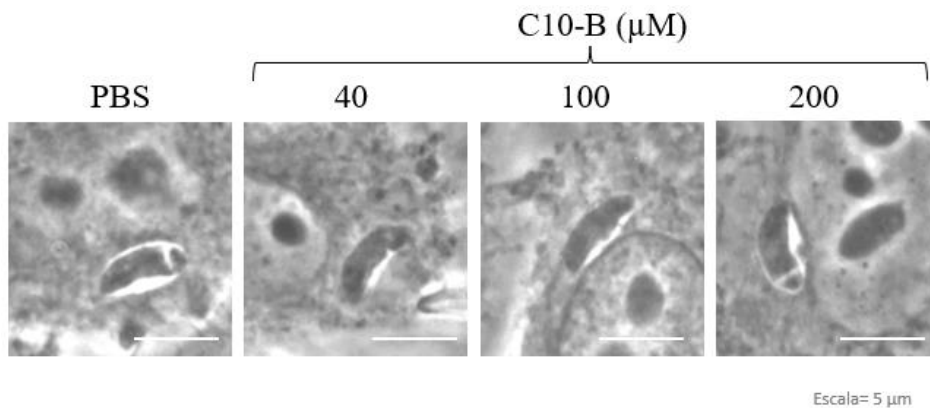


Figura 40. Efecto del C10-Bifosfonato en la morfología intracelular de los taquizoítos. PBS, células HEP-2 invadidas con taquizoítos mantenidos en PBS; C10-B, células invadidas con taquizoítos tratados con 40, 100 y 200 μM de C10-Bifosfonato. Escala= 5 μm .

En relación con la invasividad de los parásitos tratados con el fármaco C10-Bifosfonato, se encontró que este inhibidor, no modificó de forma sustancial la capacidad invasiva de los parásitos ya que a la máxima concentración evaluada (200 μ M) disminuyó alrededor de tres unidades el porcentaje de invasividad (**Fig. 41**).

Los resultados obtenidos demuestran que los inhibidores no afectan de manera contundente el proceso de invasión de *T. gondii*, tampoco alteran la morfología de los parásitos y tampoco de las células hospederas.

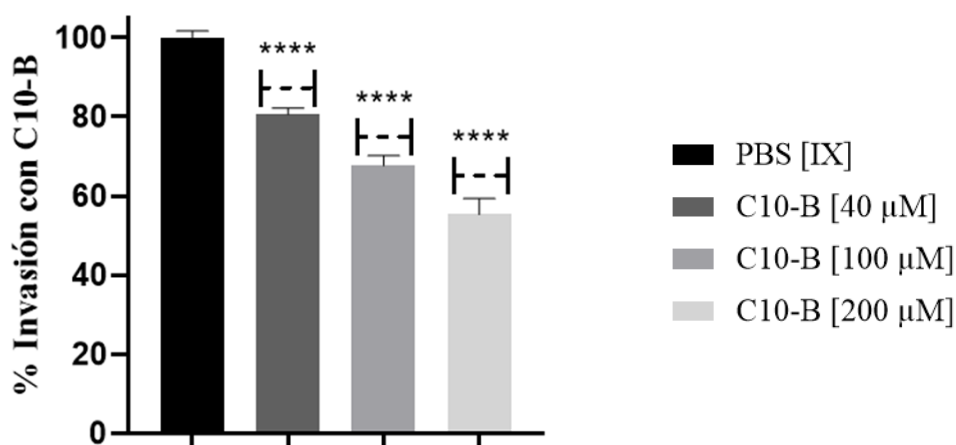


Figura 41. Efecto del C10-Bifosfonato en la invasividad de taquizoítos. Las columnas representan el promedio con n=3 y las barras de error son error estándar **, **** y **** vs., las concentraciones de C10-bifosfonato evaluadas ($p < 0.01$, $p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente).

9.12. Efecto de los inhibidores de PPasas en la proliferación celular de *T. gondii*

Para evaluar el efecto de los inhibidores en el proceso de proliferación celular, se trabajó con taquizoítos extracelulares purificados, los cuales fueron incubados por 2 h con 200 μ M de C10-Bifosfonato y con 20 mM de NaF, posteriormente, se eliminó el sobrenadante y después de un lavado con PBS, se infectaron células HEp-2. Como controles negativos se emplearon taquizoítos mantenidos únicamente en PBS. Se decidió trabajar con la máxima concentración de cada inhibidor para evaluar el porcentaje de proliferación. Después de 72 h de proliferación, las células se rompieron con un raspador de células, con el fin de liberar los parásitos intracelulares y poder realizar el conteo en cámara de Neubauer. Como se muestra

en la **figura 42**, el número de parásitos recuperados tanto en el control negativo como en las condiciones tratadas con los dos inhibidores no son significativamente distintos, lo cual indica que estos inhibidores (NaF y C10-B) no afectan el proceso de proliferación intracelular.

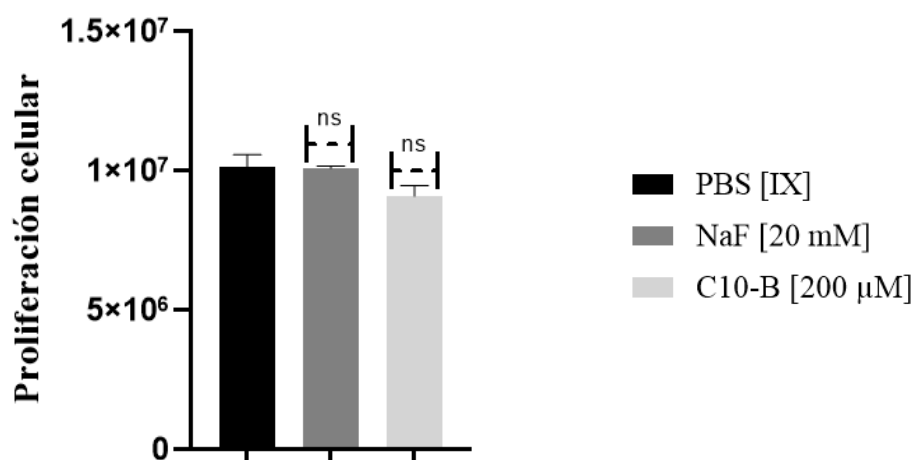


Figura 42. Evaluación de la proliferación celular de *T. gondii* en taquizoítos tratados con inhibidores de PPasas. Las columnas representan el promedio con $n=3$ y las barras de error son error estándar ns, no significativo estadísticamente vs., las concentraciones de inhibidores evaluadas ($p=0.9296$ y $p=0.1313$, respectivamente).

9.13. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* con IFN- γ en presencia de inhibidores de PPasas

Con el fin de determinar la localización de la TgPPasa y de la TgVP1, durante el proceso de enquistamiento inducido de manera *in vitro* por exposición a IFN γ , se infectaron células HEp-2 con taquizoítos extracelulares purificados mantenidos en solución por 2 h con 200 U/mL de IFN- γ y, posteriormente, 2 h con 40, 100 y 200 μ M de C10-Bifosfonato y con 2, 10 y 20 mM de NaF como. Como controles negativos se emplearon taquizoítos sin inhibidores. Las células se fijaron a las 48 y 72 h de proliferación y se evaluó el enquistamiento mediante la detección de CST1 con la lectina de *D. biflorus* fluorescente. El porcentaje de enquistamiento se determinó contando al menos 500 células invadidas y determinando aquellas que fueran positivas a CST1.

Los resultados obtenidos para la TgPPasa se muestran en la **figura 43**. Como se había descrito previamente en la **figura 34**, la marca de la TgPPasa se observa en forma de agregados intravacuolares que van desapareciendo durante el enquistamiento. La adición de NaF aparentemente y a medida que se aumentó su concentración, produjo a desaparición en mayor medida, de la marca fluorescente para la TgPPasa, de tal manera que a la máxima concentración (20 mM) fue difícil detectar a la TgPPasa. Aparentemente, las concentraciones de NaF evaluadas no afectaron la formación de los quistes tisulares, manteniendo estos la presencia de CST1 y su forma esferoidal.

En contraste, cuando los taquizoítos fueron incubados con el C10-Bifosfonato (inhibidor de TgVP1), desde la concentración más baja evaluada de 40 μ M, se notó una drástica disminución en el marcaje de la TgVP1 en los tiempos de enquistamiento evaluados de 48 y 72 h, como se muestra en la **figura 44**. Además, la expresión de CST1 fue muy atípica, en forma de agregados al interior de las VP, no se detectaron quistes clásicos con CST1 limitando la estructura quística. Sin embargo, las imágenes de Nomarsky muestran parásitos intravacuolares desorganizados y característicos de arreglos intraquísticos, por los que estas estructuras pueden ser clasificadas como “quistes no convencionales”. Con estos resultados, se puede sugerir que el C10-Bifosfonato afectó el proceso de enquistamiento en *T. gondii in vitro*.

El conteo de VP positivas a CST1 como indicativo de la inducción al enquistamiento con IFN- γ , dilucido el impacto que generaron los fármacos, como se muestra en la **figura 45**, se detectó menor porcentaje de enquistamiento con la mayor concentración de NaF (20 mM) disminuyendo alrededor del 50 % la detección de CST1, mientras que a 2 mM de NaF no se observó diferencia significativa con respecto al control en el cual se indujo al enquistamiento, pero no hubo presencia de NaF.

Sin embargo, el tratamiento con C10-Bifosfonato, generó importantes diferencias con respecto al control, en donde solo se indujo al enquistamiento con IFN- γ . En la **figura 46** se muestra que desde la concentración más baja evaluada de 40 μ M de C10-B, el porcentaje de VP positivas a CST1 disminuyó drásticamente y la disminución fue constante con forme se aumentó la concentración de C10-B.

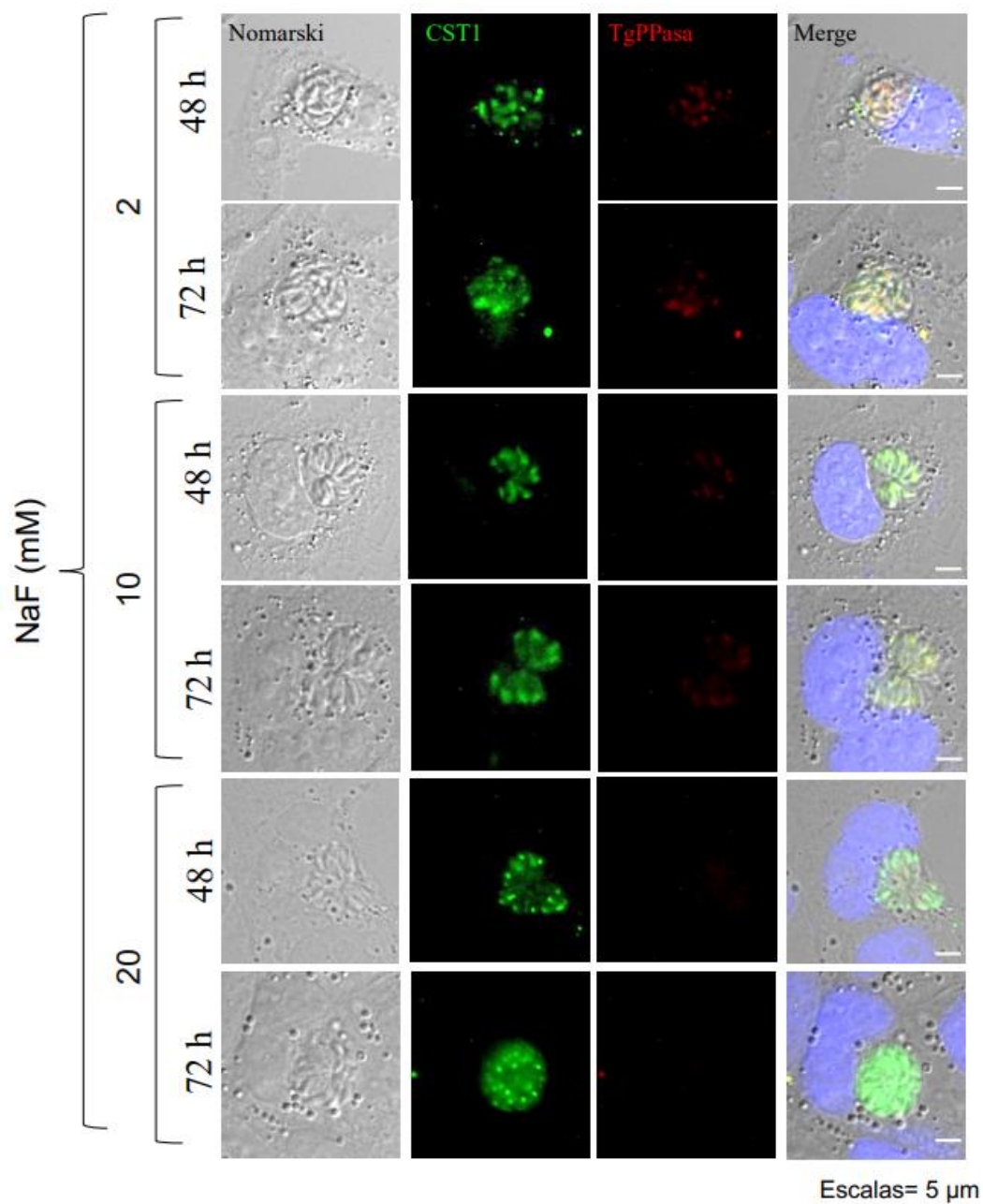


Figura 43. Distribución de la TgPPasa en el enquistamiento de *T. gondii* inducido con IFN- γ y en presencia de NaF. Se muestra la distribución de la marca de la TgPPasa marcada con TRITC a las 48 y 72 h de cistogénesis. CST1 corresponde a la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC.

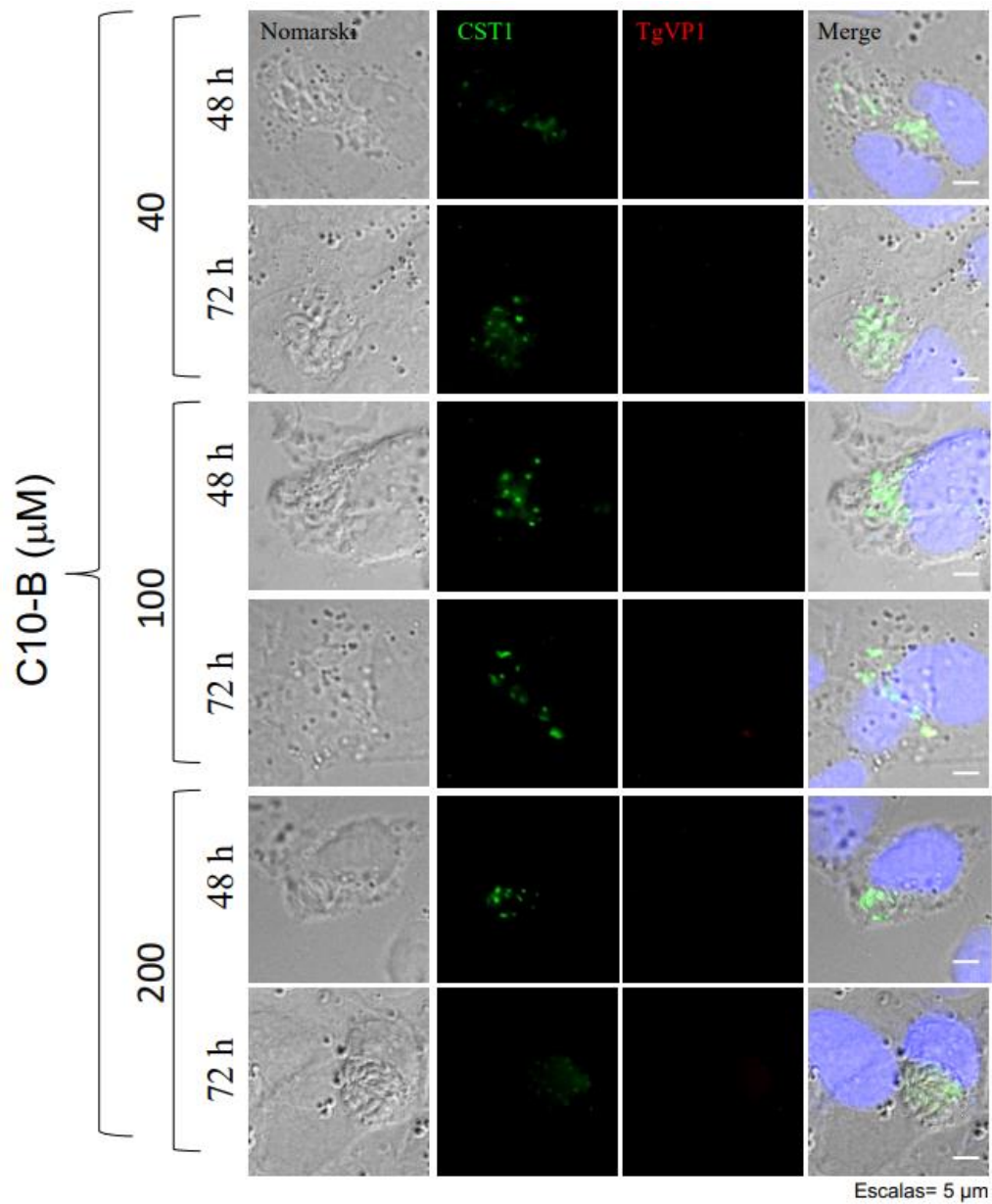


Figura 44. Distribución de la TgVP1 en el enquistamiento de *T. gondii* inducido con IFN- γ en presencia de C10-Bifosfonato. Se muestra la distribución de la marca de la TgVP1 marcada con TRITC a las 48 y 72 h de cistogénesis. CST1 corresponde a la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC.

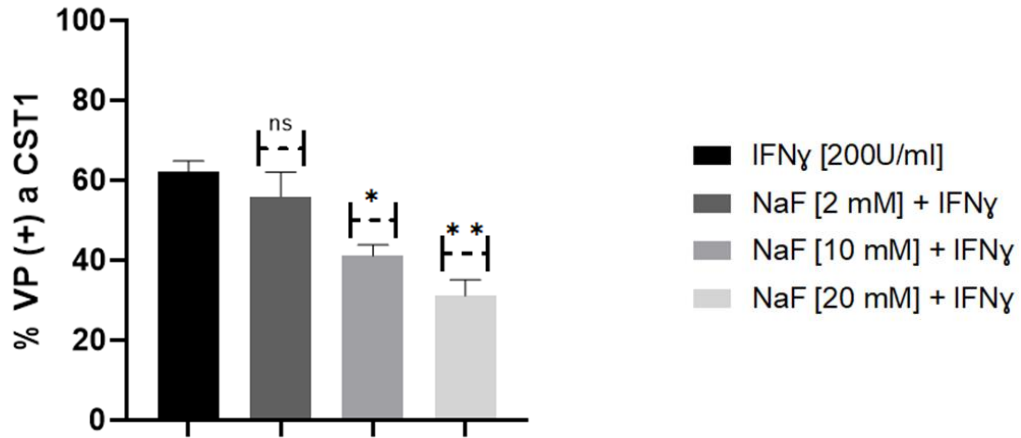


Figura 45. Porcentaje de inducción al enquistamiento con IFN- γ en presencia de NaF. Las columnas representan el promedio con n=3 y las barras de error son error estándar ns, no significativo estadísticamente, * y ** vs., las concentraciones de C10-bifosfonato evaluadas (ns, $p < 0.05$ y $p < 0.011$, respectivamente).

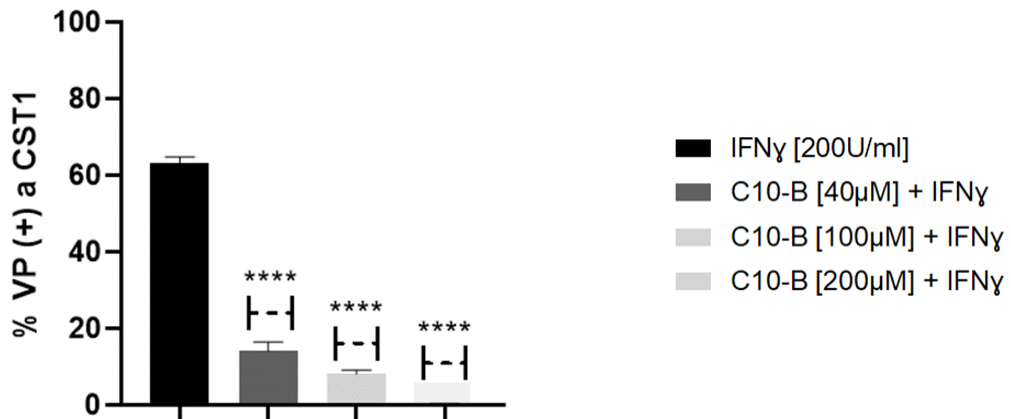


Figura 46. Porcentaje de inducción al enquistamiento con IFN- γ en presencia de C10-Bifosfonato. Las columnas representan el promedio con n=3 y las barras de error son error estándar ****, **** y **** vs., las concentraciones de C10-bifosfonato evaluadas ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente).

9.14. Distribución de la TgPPasa y la TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49

Con el fin de determinar la distribución de la TgPPasa y de la TgVP1 en quistes aislados de cerebro de ratones infectados con la cepa ME49 de *T. gondii* y compararlos con las distribuciones descritas anteriormente en quistes tisulares inducidos *in vitro* por exposición a IFN- γ , los quistes purificados se procesaron mediante inmunofluorescencia con los sueros preinmunes e inmunes contra la TgPPasa y la TgVP1 y fueron observados mediante microscopía confocal.

Al aislar los quistes cerebrales mediante fraccionamiento del tejido cerebral, se observó a partir del microscopio estereoscópico, que los quistes tenían forma esférica con tamaños de entre 20-100 μm . Como se muestra en la **figura 47a**, la TgPPasa se encontró distribuida en el citoplasma de los bradizoítos contenidos al interior del quiste tisular, mientras que la TgVP1, mostrada en la **figura 47b**, se detectó distribuida únicamente en la periferia del quiste, aunque no queda claro específicamente a qué estructura se encuentra asociada, podría estar en la membrana derivada de la VP ya que la TgVP1 podría permanecer aún después de la formación del quiste cerebral.

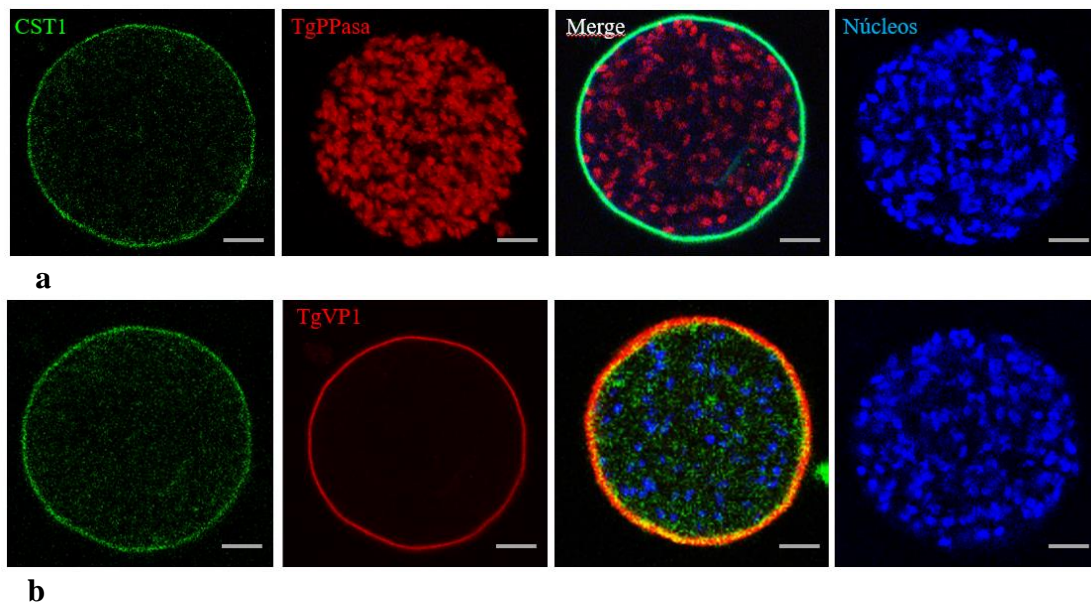


Figura 47. Distribución de la TgPPasa y TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49. a) Distribución de la TgPPasa. b) Distribución de la TgVP1. En ambos casos las PPasas se encuentran marcadas con TRITC. CST1 corresponde a la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC. Los núcleos de los bradizoítos fueron teñidos con DAPI. Escala= 10 μm

La ubicación de la TgVP1 sugiere una posible función en el quiste, aunque se desconoce en qué mecanismos podría estar participando. En ambos casos, la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC marca las glicoproteínas de CST1.

En contraste con los sueros preinmunes, no se generaron marca fluorescente como se muestra en la **figura 48**.

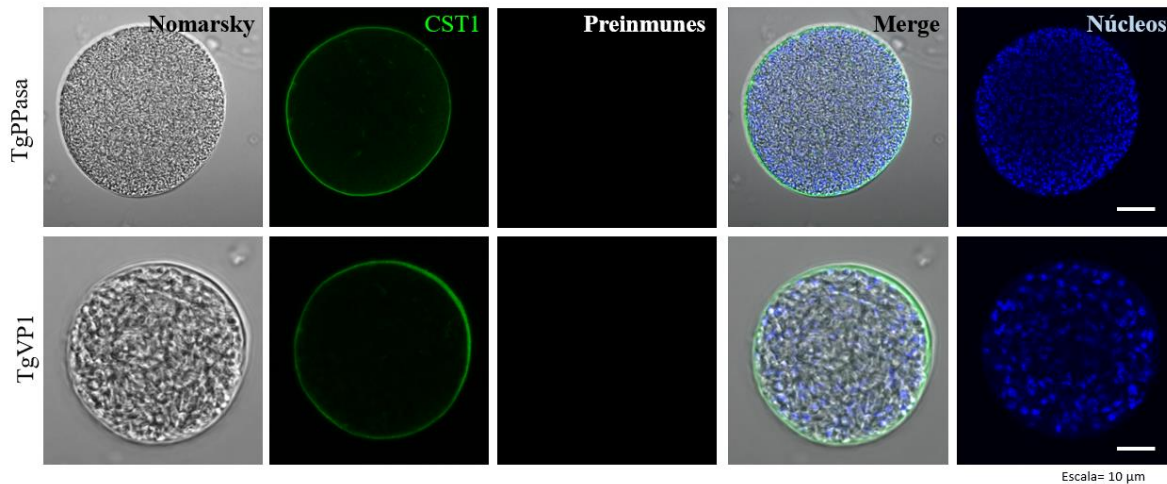


Figura 48. Evaluación de la distribución de la TgPPasa y TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49 en sueros preinmunes. CST1 corresponde a la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC. Los núcleos de los bradizoítos fueron teñidos con DAPI. Escala= 10 μm

10. DISCUSIÓN

Toxoplasma gondii, un parásito apicomplexa que invade y prolifera en todo tipo de células nucleadas de mamíferos, es el agente causal de 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 (Dubey, 2020). La ingesta de carne mal cocida contaminada con quistes tisulares, son las principales formas de transmisión del parásito (Mayoral *et al.*, 2020).

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 antitoxoplásmicos asegurando así la supervivencia del parásito y la transmisión entre las especies, por lo que es considerado uno de los parásitos más exitosos debido a su alta capacidad de diseminación tisular (Filisetti & Candolfi, 2004; Kim & Weiss, 2004). 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 el cual aún no hay vacunas disponibles.

El diseño de péptidos inmunogénico de diferentes proteínas mediante estrategias bioinformáticas ha representado una valiosa herramienta en el estudio de la función de diversas proteínas no solo en *Toxoplasma*. Desde el punto de vista de la inmunoprotección, los péptidos han sido empleados para realzar la inmunización de modelos animales y la evaluación de la respuesta imunitaria de anticuerpos y de citocinas, así como, de su capacidad para inducir inmunoprotección ante retos letales con los patógenos (Flower, 2013). Por otra parte, los péptidos diseñados y sintetizados también pueden ser empleados para generar anticuerpos con reconocimiento policlonal monoespecífico con el fin de caracterizar la distribución topográfica de moléculas y como herramientas para la caracterización bioquímica de múltiples componentes. Gracias al conocimiento del genoma de *T. gondii* (Kissinger *et al.*, 2003) fue posible conocer la secuencia de dos tipos de PPasas, por una parte, la sPPasa de la Familia I denominada TgPPasa (5WRT), de la que se tiene actualmente su estructura cristalizada y que está caracterizada bioquímicamente. Esta TgPPasa contiene dos iones Mg^{2+} en su sitio activo, coordinados en sus motivos de unión (M1 y M2) por

Asp190, Asp195 y Asp227 (Jamwal *et al.*, 2017). Adicionalmente, se tiene identificada la secuencia de la pirofosfatasa membranal translocadora de protones TgVP1 (B6KH90) la cual, ha sido descrita como un transportador activo de H⁺ mediante hidrólisis del PPI. De acuerdo con predicciones topológicas y a proteínas relacionadas (Lin *et al.*, 2012; McIntosh & Vaidya, 2002), se sabe que su estructura es homodimérica, sin embargo, hasta el momento no ha sido dilucidada su estructura terciaria a través de cristalografía o de algún otro método experimental. Con base en la información disponible para cada PPasa, se procedió al diseño y síntesis de péptidos correspondientes a las dos PPasas descritas en *Toxoplasma*, con fin de poder generar anticuerpos específicos que nos permitieran determinar su distribución tanto en parásitos extracelulares y en proliferación, así como en el proceso de enquistamiento tanto *in vitro* como en quistes aislados de cerebros de ratones con encefalitis toxoplásmica.

Para poder estudiar la distribución y función de la TgPPasa y la TgVP1 de *T. gondii*, durante la formación del quiste tisular, primeramente, fue necesario conocer las estructuras proteicas de ambas PPasas, esto nos permitió diseñar péptidos inmunogénicos confiables, accesibles para ser reconocidos por linfocitos B y específicos para cada PPasa. El modelado estructural de la TgVP1 mediante AlphaFold2, evidenció una estructura homodimérica con 16 pases transmembranales que utiliza como cofactor al Mg²⁺, características que han sido reportadas en mPPasa de otros parásitos como *T. cruzi* (Scott *et al.*, 1998), *L. donovani* (Rodrigues *et al.*, 1999b) y *T. brucei* (Rodrigues *et al.*, 1999a). Estas características no son únicas de única de los parásitos, de hecho, inicialmente fueron descritas este tipo de moléculas en organismos del Reino Plantae, en donde las mPPasas han sido ampliamente caracterizadas, como en el caso de *Vigna radiata*, de quien se conoce su estructura a partir del análisis por difracción por rayos X en la molécula cristalizada (PDB: 4A01) (Lin *et al.*, 2012). Precisamente, la mPPasa de *V. radiata* ha sido utilizada como plantilla para realizar predicciones topológicas de la pirofosfatasa translocadora de protones de *P. falciparum* (McIntosh & Vaidya, 2002). Desafortunadamente, no en todas las moléculas de interés se conoce la estructura molecular obtenida a partir de cristales por lo que, es necesario recurrir a herramientas bioinformáticas que nos permitan predecir sus conformaciones espaciales e interacciones con otras moléculas. En el análisis de predicción estructural con la herramienta AlphaFold2, no es necesario realizar comparaciones estructurales con respecto a una sola estructura obtenida

por cristalografía, sin embargo, se han obtenido estructuras con una alta confiabilidad, al no estar basadas en una sola proteína, sino en MSA.

Con base en la aplicación de Alpha Fold2 y otras herramientas bioinformáticas sobre todo enfocadas a la búsqueda de péptidos inmunogénicos, se pudo determinar dos secuencias inmunogénicas correspondientes a las dos PPasas de *T. gondii*. El péptido inmunogénico para la TgPPasa “MQDLKKDGLREYA” de 14 aminoácidos, entre M146 al A159, y el péptido para la TgVP1 “GPLGDDNKRLTDPLYL”, de 16 aminoácidos, entre G112 y L127, ambos con parámetros adecuados de antigenicidad establecidos por los algoritmos (Emini *et al.*, 1985; Kolaskar & Tongaonkar, 1990). En el diseño de los epítomos antes descritos, se consideraron insertos de secuencias de MAP's en el extremo C-terminal con fin de hacer más inmunogénicas las moléculas y evitar así reacciones de tolerancia inmunológica, ya que como es bien sabido, la inmunización de ratones o conejos con péptidos por debajo de los 25 aminoácidos, conocidos como haptenos, en lugar de inducir una respuesta de producción de anticuerpos, produce una tolerancia en el animal sin producción de anticuerpos y citocinas (Flower, 2013). Las MAP's cumplen la función de ser acarreadores e inductoras de la respuesta inmunitaria enfocada hacia el epítomo inmunogénico (Posnett *et al.*, 1988).

La respuesta positiva mediante inmunoblot con los sueros inmunes recolectados para ambas PPasas demostró que los diseños peptídicos fueron apropiados ya que, no solo reconocieron los péptidos usados para inmunizar los ratones BALB/c, sino que también reconocieron las proteínas nativas respectivas en los pesos moleculares descritos: ~42 kDa para la TgPPasa (Pace *et al.*, 2011) y ~85.9 kDa para la TgVP (Liu *et al.*, 2014). El hecho de que se hayan reconocidos bandas únicas para ambos sueros inmunes, indica que el reconocimiento fue monoespecífico por los anticuerpos policlonales y que el procesamiento de las muestras fue adecuado ya que no se detectó ninguna degradación proteolítica en las muestras, considerando la amplia gama de proteasas que se han descrito en *Toxoplasma* (Ramírez-Flores *et al.*, 2019).

La especificidad de los anticuerpos generados permitió caracterizar la distribución topográfica de ambas PPasas, tanto en parásitos extracelulares como en parásitos en proliferación intracelular. Igualmente, fueron útiles para determinar su distribución en quistes tisulares inducidos de manera *in vitro* y en quistes tisulares aislados de cerebros de ratones infectados y con encefalitis toxoplásmica. En este sentido, la detección a la TgPPasa se

realizó en el citoplasma de taquizoítos extracelulares, cercano a la zona perinuclear y hacia el extremo anterior en forma de agregados fluorescentes, nuestro resultado coincide con lo publicado por (Pace *et al.*, 2011). En contraste, en el caso de la TgVP1, nuestros resultados indican que en taquizoítos extracelulares se detectó la TgVP1 en agregados citosólicos distribuidos en el cuerpo de los taquizoítos, mientras que en taquizoítos en proliferación intracelular se observó que, a medida que progresaba la proliferación intracelular, la marca se distribuía en el citoplasma de los parásitos intravacuolares con una distribución de la TgVP1 hacia el extremo apical a las 24 y 48 h de proliferación y hacia la VP pero no como una marca selectiva y exclusiva de la membrana de la VP, tampoco se detectó en el citoplasma o en la membrana de la célula hospedero, contrario a lo que se había reportado previamente (Rodrigues *et al.*, 2000). Su ubicación citosólica, podría responder a los acidocalciosomas como también lo publicaron (Moreno & Zhong, 1996; Rodrigues *et al.*, 2000). Es importante aclarar que los únicos reportes sobre la distribución espacial de estas PPasas en *T. gondii* se realizaron utilizando anticuerpos generados contra una V-H⁺-PPasa de células vegetales y que reconocieron mediante reacción cruzada, a las PPasas de Toxoplasma y de tripanosomátidos, por lo que nuestro estudio es el primer reporte que muestra esta distribución con anticuerpos específicos de las PPasas de este parásito. Esto podría explicar por qué encontramos variaciones en la distribución de estas moléculas con nuestros anticuerpos en comparación con los reportes existentes. Será necesario en experimentos futuros considerar realizar ensayos de inmuno-microscopia electrónica con el fin de precisar la distribución subcelular de la TgVP1.

El enquistamiento de Toxoplasma es un proceso que se puede inducir *in vitro* en células infectadas con *T. gondii*, sometiendo a las células infectadas o a los parásitos, bajo condiciones de estrés ya sea por la exposición a fármacos o a condiciones de cultivo específicas como deprivación de nutrientes, presencia de fármacos antiparasitarios o presencia de citosinas como IFN γ y TNF α (Sullivan & Jeffers, 2011), sin embargo, estos enquistamiento *in vitro* solo se habían logrado en ciertas células y solo con cepas cistogénicas como la cepa tipo II (Bohne *et al.*, 1994). En un reporte reciente de Castro-Elizalde *et al.* (2018), se demostró que la exposición de taquizoítos de la cepa RH (una cepa considerada como no cistogénica) a MPA, inducía en enquistamiento *in vitro* en tan solo 24 horas. En este estudio, se demostró que la VP funcionaba como un andamio o soporte sobre el cual se

estructuraba la pared de los quistes tisulares *in vitro*. Es decir, la glicoproteína de quiste tisular CST1 se insertaba gradualmente a la membrana de la VP hasta conformar una estructura pseudoquística con presencia de bradizoítos intravacuolares. Este mismo hallazgo fue corroborado posteriormente mediante la inducción al enquistamiento de taquizoítos extracelulares de la cepa RH, tratados con IFN- γ , previo a la infección celular (Cruz-Mirón, 2021), observando que al cabo de 12 h comenzaba a haber presencia de la glicoproteína CST1 y a las 48 y 72 h, ya se encontraba delimitada la VP con esta glicoproteína de pared de quiste. CST1, es una glicoproteína rica en N-acetilgalactosamina y es propia de la pared de los quistes tisulares y ha sido utilizada como un marcador de enquistamiento o diferenciación de *Toxoplasma* al pasar del estadio de taquizoíto a bradizoíto, utilizando para su detección la lectina de *D. biflorus* (Zhang *et al.*, 2001).

Hasta el momento no hay reportes de la distribución de las PPasas en el proceso de enquistamiento. Sin embargo, dado que la TgVP1 se encuentra reportada durante la proliferación celular en la VP (Rodrigues *et al.*, 2000), nos planteamos la hipótesis de que la TgVP1 pudiera estar presente durante el enquistamiento dado que la membrana de la VP era el templete sobre el cual se estructuraba la pared quística y sería de mucho interés conocer si esta TgVP1 se conserva en la estructura quística. Al mantenerse la membrana de la VP como el andamio para la formación de la pared quística, cabe la posibilidad que esta estructura membranal pueda preservarse a lo largo del proceso de enquistamiento y tener funciones de excreción/secreción o de introducción de componentes del medio extracelular al interior de los quistes y posteriormente al interior de los bradizoítos con fines metabólicos y de nutrición, un aspecto fundamental que aún no ha sido estudiado y menos aún reportado. La pared del quiste tisular ha sido descrita como una pared gruesa que alberga a la glicoproteína CST1 proveniente de gránulos densos y a las proteínas, BPK1, MCP4 MAG1 y GR6, provenientes de micronemos, y otras proteínas recientemente identificadas mediante análisis proteómico (Tu *et al.*, 2020). Sin embargo, en la inducción al enquistamiento, de manera *in vitro*, no hay reportes de la interacción de las proteínas quísticas antes mencionadas, por lo que un análisis proteómico de los productos de excreción/secreción de quistes tisulares, podría ser de interés para tratar de identificar y caracterizar posibles complejos moleculares y sus funciones en el enquistamiento de *T. gondii*.

Un aspecto interesante de nuestro trabajo fue el encontrar que, durante la proliferación de los taquizoítos, ocurrieron cambios evidentes en la distribución de las PPasas. En relación con la TgPPasa, se detectó en los taquizoítos intravacuolares una ubicación apical, con cierta distribución difusa en el citoplasma, la cual no cambió a lo largo de la proliferación intracelular. En contraste, durante el enquistamiento, esta TgPPasa presentó una disminución gradual en su expresión, lo cual se evidenció por la disminución de la marca fluorescente y solo se detectó como una distribución difusa y terminó con un patrón de agregados citosólicos esferoidales de la marca fluorescente. En contraste, la marca de CST1 no modificó su distribución, detectándose en los parásitos y en la estructura quística. Muy probablemente esta disminución de la expresión de la marca de la TgPPasa podría estar relacionada con la conversión del estadio de taquizoíto a bradizoíto.

El hecho de que no se haya modificado la expresión de CST1 mientras que la TgPPasa disminuía y se alteraba su distribución en el enquistamiento, sugiere que la formación del quiste tisular, es un proceso en el que aparentemente no está participando la TgPPasa, y esto fue corroborado cuando se llevaron a cabo ensayos de inducción al enquistamiento con IFN- γ en presencia del inhibidor NaF con el cual, se detectó una disminución en la detección de la marca fluorescente correspondiente a la TgPPasa, sin que se afectara el desarrollo de la expresión de CST1. A la fecha, no hay reportes que indiquen si los bradizoítos expresan o no a la TgPPasas ni de las funciones que pudieran tener, más allá de su función obvia como mecanismo para evitar la acumulación de PPI. Sin embargo, tampoco se descarta la posibilidad de que el NaF pueda inhibir a otras enzimas celulares, tales como las ATPasa de protones y algunas fosfatasa, incluyendo ciertas fosfatasa de proteínas.

Por otra parte, cuando se evaluó la distribución de la TgVP1 durante la inducción al enquistamiento de *T. gondii* con IFN- γ , se observó una clara disminución de la marca de TgVP1 permaneciendo en forma de agregados esferoidales conforme avanzaba el tiempo de enquistamiento, a las 72 h de enquistamiento, se encontraron agregados fluorescentes delimitando la periferia de la VP. La marca de CST1, como se esperaba, fue aumentando en su intensidad y delimitando la forma esferoidal de la pared quística naciente y co-localizando en la periferia con los agregados de TgVP1. La ubicación periférica de la TgVP1 en el quiste en formación podría sugerir que dicha molécula es transportada desde las estructuras tubulares y vesículas que están embebidas en la pared del quiste, según los reportado

previamente (Ferguson & Hutchison, 1987). El análisis ultraestructural de los quistes tisulares de *T. gondii*, ha sugerido que la pared quística presenta una capa externa membranal que lo rodea por completo y una capa interna con apariencia esponjosa y de mayor grosor, que aparentemente es la pared del quiste (Hernández-Contreras, 2012; Ferguson & Hutchison, 1987). Aparentemente, la TgVP1 quedaría insertada en la capa membranal que rodea a todo el quiste y que se ha descrito como una membrana que tuvo su biogénesis en la membrana de la VP (Ferguson & Hutchison, 1987). La presencia de una TgVP1 en la membrana quística, probablemente, podría contribuir con la demanda energética requerida en el proceso de interconversión de los estadios, de taquizoíto a bradizoíto, con formación del quiste tisular. En este sentido, la TgVP1, al ser una proteína integral de membrana, garantizaría la acidez y funcionalidad de la VP y posteriormente de la MVP en la formación del quiste, en forma similar a como ocurre en plantas, en donde las mPPasas cumplen un papel importante como reservorios de energía durante periodos de latencia (García-Contreras *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011). Con el fin de corroborar la función sugerida en el enquistamiento de *T. gondii*, es necesario conocer la ubicación exacta de estas moléculas y una posibilidad es mediante inmuno-electromicroscopia electrónica. Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo también ha identificado pequeñas vesículas de excreción/secreción de ~200 nm de diámetro, emergiendo de los quistes tisulares, cuya composición y función aún es desconocida (Hernández-Contreras, 2012), por lo que, no se descarta la presencia de la TgVP1 en la membrana de dichas vesículas. Probablemente un análisis proteómico de los productos de excreción/secreción en quistes tisulares de *T. gondii*, podría ampliar el panorama y evidenciar las proteínas involucradas en estas regiones.

Interesantemente, cuando se inhibió la TgVP1 con el C10-bifosfonato, se observó que no solo no se detectaba la TgVP1 a lo largo del enquistamiento y en todas las concentraciones utilizadas del inhibidor, sino que, no se detectó la formación de estructuras quísticas convencionales y, por otro lado, la molécula CST1 presentó arreglos atípicos sin la formación de los característicos quistes tisulares nacientes con apariencia esférica y fluorescentes ante la presencia de CST1. Estos resultados sugieren que la TgVP1 de alguna manera se encuentra insertada en la membrana externa que rodea los quistes en formación y que contribuye en la organización de los parásitos al interior de la VP y durante el proceso de interconversión para la formación de los quistes tisulares. La caracterización mediante microscopía electrónica

nos permitirá determinar en el futuro, los detalles morfológicos finos de estas estructuras fallidas en su formación como quistes tisulares.

Las PPasas de *T. gondii* no son solamente enzimas que degradan PPI, sino que también están implicadas en el funcionamiento y equilibrio de distintas reacciones bioquímicas. En el caso de la TgPPasa, es probable que no solo proporcione un impulso termodinámico en la biosíntesis de las reacciones a través de la liberación del PPI (Heinonen, 2001). Esta enzima es de gran relevancia ya que el PPI, puede servir como moneda de cambio de energía, como sustituto del ATP en la vía glucolítica mediante la PFK, la cual consume PPI para impulsar la fosforilación de la fructosa-6-fosfato (Yang *et al.*, 2022b). Por otra parte, la TgVP1 no solo soporta la acidificación y cambios en el ΔG° de los acidocalcisomas (Docampo & Moreno, 2011; Rodrigues *et al.*, 2000) sino que, gracias a las herramientas de predicción evolutiva, ahora sabemos que esta característica no es exclusiva de los parásitos, sino que las plantas poseen mPPsas vacuolares y/o transmembranales (Goodenough *et al.*, 2019) y que la translocación de H^+ también es activada en condiciones de estrés, probablemente esta condición sea resultado de la evolución celular a partir de la teoría endosimbiótica.

Dado que *T. gondii*, sufre cambios morfológicos y moleculares durante la interconversión de estadios, los resultados obtenidos durante la inducción al enquistamiento con IFN- γ , sugieren que la TgPPasa podría estar implicada en las reservas de energía en este parásito dado que permanece en el citoplasma de los taquizoítos (48 h). Sin embargo, a mayor tiempo, aparentemente la marca disminuye, aunque esto no descarta la posibilidad que esta enzima se quede en el citoplasma de los parásitos degradando el PPI para garantizar la energía necesaria para la interconversión parasitaria que se lleva a cabo el enquistamiento. En el enquistamiento, los bradizoítos disminuyen su motilidad y su capacidad proliferativa y expresan numerosos organelos de reserva como los gránulos de glicógeno. No se sabe si esta disminución en la actividad metabólica de los bradizoítos pudiera estar regulada desde la única mitocondria que posee *T. gondii* y que es en donde se genera la energía a través de la fosforilación oxidativa o si está relacionada con la disminución en la expresión de la TgPPasa detectada durante el enquistamiento. Tomando en cuenta la evidencia recabada en nuestros resultados, aparentemente la TgPPasa no es indispensable en el proceso de enquistamiento inducido por IFN- γ y tampoco de la formación de la pared quística, ya que al evaluar distintas

concentraciones del inhibidor NaF, se observó que el proceso de enquistamiento se llevó a cabo de manera normal, aunque si se alteró la distribución de la TgPPasa.

Aunque no hay información disponible de la interacción de las PPasas en el proceso de enquistamiento, los resultados obtenidos en la localización de la TgPPasa y TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49, es un parteaguas en el proceso de entendimiento de la distribución de dichas PPasas en quistes tisulares. Estudios posteriores podrían ayudar a dilucidar la relación de las PPasas con sus respectivos organelos de interacción.

11. CONCLUSIONES

La TgVP1 es una enzima que además de contribuir en el proceso de hidrólisis de pirofosfato activada bajo condiciones de estrés, aparentemente, también contribuye en el proceso de enquistamiento de *T. gondii*, en contraste, la TgPPasa no parece contribuir en dicho proceso.

La distribución de la TgPPasa en quistes cerebrales de la cepa ME49 se encuentra en el citoplasma de los bradizoítos mientras que la distribución de la TgVP1 en quistes cerebrales de la cepa ME49 se encuentra en la periferia del quiste tisular.

12. PERSPECTIVAS

Utilizar inmuno-microscopía electrónica de transmisión para determinar la presencia subcelular de la TgPPasa y la TgVP1

Evaluar la participación de los inhibidores de PPasas en la formación de quistes cerebrales de la cepa ME49 mediante el tratamiento de los ratones infectados (ensayo *in vivo*).

Evaluar el efecto de los inhibidores en otras cepas.

Evaluar la cinética del pirofosfato en bradizoítos y durante el proceso de enquistamiento *in vivo* e *in vitro*.

Generar un *knockout* de las TgPPasa y TgVP1 mediante CRISPR Cas9 y evaluar la capacidad de enquistamiento de dicha cepa.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Coetzee, R., Cukura, A., Silva, A. Da, Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Castro, L. G., ... Zhang, J. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Baykov, A. A., Alexandrov, A. P., Smirnova, I. N., & Belozersky, A. N. (1992). A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(1), 238–243. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90163-q](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90163-q)
- Baykov, A. A., Dubnova, E. B., Bakuleva, N. P., Evtushenko, O. A., Zhen, R. G., & Rea, P. A. (1993). Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzyme. *FEBS Letters*, 327(2), 199–202. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80169-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80169-U)
- Baykov, A. A., Fabrichniy, I. P., Pohjanjoki, P., Zyryanov, A. B., & Lahti, R. (2000). Fluoride effects along the reaction pathway of pyrophosphatase: Evidence for a second enzyme pyrophosphate intermediate. *Biochemistry*, 39(1), 11939–11947. <https://doi.org/10.1021/bi000627u>
- Behnke, M. S., Saeij, J. P. J., & Boyle, J. P. (2020). Development and application of classical genetics in *Toxoplasma gondii*: *Perspectives and Methods* (pp. 859–896). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00019-0>
- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2015). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 463–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasaamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 49(6), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>

- 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. *Infection and Immunity*, 62(5), 1761–1767. <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.1761-1767.1994>
- Canfield, E. D. E., Kristensen, E., & Thamdrup, B. (2005). The Phosphorus Cycle. In E. D. E. Canfield, E. Kristensen, & B. Thamdrup (Eds.), *Advances in Marine Biology* (Vol. 48, pp. 419–440). Academic Press. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0065-2881\(05\)48011-6](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0065-2881(05)48011-6)
- Castro-Elizalde. (2015). *Caracterización del efecto del interferón-γ en la inducción de la cistogenesis en la cepa RH de Toxoplasma gondii* [Tesis]. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).
- Castro-Elizalde, K. N., Hernández-Contreras, P., Ramírez-Flores, C. J., González-Pozos, S., Gómez de León, C. T., Mondragón-Castelán, M., & Mondragón-Flores, R. (2018). Mycophenolic acid induces differentiation of *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites into bradyzoites and formation of cyst-like structure *in vitro*. *Parasitology Research*, 117(2), 547–563. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5738-x>
- Chen, A. L., Kim, E. W., Toh, J. Y., Vashisht, A. A., Rashoff, A. Q., Van, C., Huang, A. S., Moon, A. S., Bell, H. N., Bentolila, L. A., Wohlschlegel, J. A., & Bradley, P. J. (2015). Novel components of the toxoplasma inner membrane complex revealed by BioID. *mBio*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.02357-14>
- Cruz-Mirón, R. (2021). *Identificación y caracterización de un posible receptor para interferón gamma en el parásito Toxoplasma gondii involucrado en el proceso de enquistamiento* [Tesis]. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).
- Cruz-Mirón, R., Ramírez-Flores, C., Lagunas-Cortés, N., Mondragón-Castelán, M., Ríos-Castro, E., González-Pozos, S., Aguirre-García, M. M., & Mondragón-Flores, R. (2021). Proteomic characterization of the pellicle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Proteomics*, 237, 104146. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104146>
- Cygan, A. M., Theisen, T. C., Mendoza, A. G., Marino, N. D., Panas, M. W., & Boothroyd, J. C. (2020). Coimmunoprecipitation with MYR1 identifies three additional proteins

- within the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole required for translocation of dense granule effectors into host cells. *mSphere*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/msphere.00858-19>
- Daouda, M. P., Bouchra, E. K., Perez-Castiñeira, J. R., Serrano, D. A., & Abdelaziz, S. (2017). Inorganic pyrophosphatases: Study of interest. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 08, 388–397. <https://doi.org/10.4236/abb.2017.810028>
- Díaz-Martin, R. D., Sandoval-Rodriguez, F. E., González-Pozos, S., Gómez de León, C. T., Mondragón-Castelán, M. E., & Mondragón-Flores, R. (2022). A comprehensive ultrastructural analysis of the *Toxoplasma gondii* cytoskeleton. *Parasitology Research*, 121, 2065–2078. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07534-3>
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Docampo, R., & Moreno, S. N. J. (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium*, 50(2), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.012>
- Drozdowicz, Y. M., Kissinger, J. C., & Rea, P. A. (2000). AVP2, a sequence-divergent, K⁺-insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 123(1), 353–362. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.353>
- Drozdowicz, Y. M., Shaw, M., Nishi, M., Striepen, B., Liwinski, H. A., Roos, D. S., & Rea, P. A. (2003). Isolation and characterization of TgVP1, a type I vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii*: The dynamics of its subcellular localization and the cellular effects of a diphosphonate inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1075–1085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209436200>
- Dubey. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1019–1024. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00023-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00023-x)
- Dubey, J. P. (2020). The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods* (pp. 1–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3>

- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267–299. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.267>
- Dubey, J. P., Harrison, B., Dangoudoubiyam, S., Bandini, G., Cheng, K., Kosber, A., Agop-Nersesian, C., Howe, D. K., Samuelson, J., Ferguson, D. J. P., & Gubbels, M.-J. (2017). Differential roles for inner membrane complex proteins across *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* development. *mSphere*, 2(5), 1–19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00409-17>
- Dzierszinski, F., Nishi, M., Ouko, L., & Roos, D. S. (2004). Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryotic Cell*, 3(4), 992–1003. <https://doi.org/10.1128/EC.3.4.992-1003.2004>
- Emini, E. A., Hughes, J. v, Perlow, D. S., & Boger, J. (1985). Induction of hepatitis a virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *Journal of Virology*, 55(3), 836–839. <https://doi.org/10.1128/jvi.55.3.836-839.1985>
- English, E. D., & Striepen, B. (2019). The cat is out of the bag: How parasites know their hosts. *PLoS Biology*, 17(9), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000446>
- Eriksson, J., Karamohamed, S., & Nyrén, P. (2001). Method for real-time detection of inorganic pyrophosphatase activity. *Analytical Biochemistry*, 293(1), 67–70. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5106>
- 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 and Microbe*, 15(5), 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.002>
- Eubank, W. B., & Reeves, R. E. (1982). Analog inhibitors for the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of *Entamoeba histolytica* and their effect on culture growth. *The Journal of Parasitology*, 68(4), 599–602. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6288907/>
- Farquharson, K. L. (2018). Life of PPI: Soluble PPases and H⁺-PPase act cooperatively to keep pyrophosphate levels in check. *Plant Cell*, 30(5), 951. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00342>

- Ferguson, D. J. P., & Hutchison, W. M. (1987). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitology Research*, 73, 483–491. <https://doi.org/10.1007/BF00535321>
- Ferreira Da Silva, M. D. F., Barbosa, H. S., Groß, U., & Lüder, C. G. K. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular BioSystems*, 4(8), 824–834. <https://doi.org/10.1039/b800520f>
- Filisetti, D., & Candolfi, E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanità*, 40(1), 71–80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15269455/>
- Flower, D. R. (2013). Designing immunogenic peptides. *Nature Chemical Biology*, 9(12), 749–753. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1383>
- Folgueira, I., Lamas, J., Sueiro, R. A., & Leiro, J. M. (2021). Molecular characterization and transcriptional regulation of two types of H⁺-pyrophosphatases in the scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi*. *Scientific Reports*, 11(8519), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88102-0>
- Fox, A. B., Guevara, B. R., Rommereim, M. L., Falla, A., Bellini, V., Pétre, G., Rak, C., Cantillana, V., Dubremetz, J.-F., Cesbron-Delauw, M.-F., Taylor, A. G., Mercier, C., & Bzik, D. (2019). *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane-associated dense granule proteins orchestrate chronic infection and GRA12 underpins resistance to host Gamma Interferon. *American Society for Microbiology*, 10(4), 1–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00589-19>
- Francia, M. E., & Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), 125–136. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3184>
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P., & Miller, N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian Oocysts. *Science*, 167(1), 893–896. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4903651/>
- Galván-Ramírez, M. de la L., & Mondragón-Flores, R. (2001). *Toxoplasmosis human* (1st ed., Vol. 3). Investigación en salud.

- García-Contreras, R., Celis, H., & Romero, I. (2004). Importance of *Rhodospirillum rubrum* H⁺-pyrophosphatase under low-energy conditions. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6651–6655. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6651-6655.2004>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–608). <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G., & Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581, 2204–2214. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.050>
- Ghosh, S., Chan, J. M. W., Lea, C. R., Meints, G. A., Lewis, J. C., Tovian, Z. S., Flessner, R. M., Loftus, T. C., Bruchhaus, I., Kendrick, H., Croft, S. L., Kemp, R. G., Kobayashi, S., Nozaki, T., & Oldfield, E. (2004). Effects of bisphosphonates on the growth of *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium species in vitro* and *in vivo*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(1), 175–187. <https://doi.org/10.1021/jm030084x>
- Gómez de León, C. T., Díaz-Martín, R. D., Mendoza-Hernández, G., González-Pozos, S., Ambrosio, J. R., & Mondragón-Flores, R. (2014). Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal of Proteomics*, 111, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.008>
- Goodenough, U., Heiss, A. A., Roth, R., Rusch, J., & Lee, J. H. (2019). Acidocalcisomes: Ultrastructure, biogenesis, and distribution in microbial eukaryotes. *Protist*, 170(3), 287–313. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2019.05.001>
- Gov, L., Karimzadeh, A., Ueno, N., & Lodoen, M. B. (2013). Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. *mBio*, 4(4), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00255-13>
- Guevara, R. B., Fox, B. A., & Bzik, D. J. (2020). *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane-associated dense granule proteins regulate maturation of the cyst wall. *mSphere*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mSphere>

- Halonen, S. K., & Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 114, pp. 125–145). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>
- Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A.-K., Teplyakov, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., Lahti, R., & Goldman, A. (2001). Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 98(6), 3121–3126. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11248042/>
- Heinonen, J. K. (2001). Biological role of inorganic pyrophosphate. In *Spring Science+Business Media, LLC* (1a ed., Vol. 59). Kluwer Academic Publisher. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4615-1433-6>
- Hernández-Contreras, P. (2012). *Inducción de la cistogénesis de Toxoplasma in vitro por inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa y caracterización de algunos eventos celulares y moleculares involucrados* [Tesis de Maestría]. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Holmes, A. O. M., Kalli, A. C., & Goldman, A. (2019). The Function of membrane integral pyrophosphatases from whole organism to single molecule. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(132), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00132>
- Hunter, A. C., & Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 766–778. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>
- IUBMB. (2021). *International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology Etc.* <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/#01>
- Jamwal, A., Yogavel, M., Abdin, M. Z., Jain, S. K., & Sharma, A. (2017). Structural and biochemical characterization of Apicomplexan inorganic pyrophosphatases. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05234-y>
- Janson, C. A., Degani, C., & Boyer, P. D. (1979). The formation of enzyme-bound and medium pyrophosphate and the molecular basis of the oxygen exchange reaction of

- yeast inorganic pyrophosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 254(10), 3743–3749. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)50649-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)50649-9)
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., & von Mering, C. (2009). STRING 8 - A global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research*, 37, 412–416. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn760>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kajander, T., Kellosalo, J., & Goldman, A. (2013). Inorganic pyrophosphatases: One substrate, three mechanisms. *FEBS Letters*, 587, 1863–1869. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.003>
- Kellosalo, J., Kajander, T., Kogan, K., Pokharel, K., & Goldman, A. (2012). The structure and catalytic cycle of a sodium-pumping pyrophosphatase. *Science*, 337(6093), 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.1222505>
- Khan, A., Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology*, 41(6), 645–655. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.005>
- Kieber, J. J., & Signer, E. R. (1991). Cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 16(2), 345–348. <https://doi.org/10.1007/BF00020567>
- Kim, K., & Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. *International Journal for Parasitology*, 34(3), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>
- Kissinger, J. C., Gajria, B., Li, L., Paulsen, I. T., & Roos, D. S. (2003). ToxoDB: Accessing the *Toxoplasma gondii* genome. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 31, Issue 1, pp. 234–236). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg072>

- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters*, 276(1–2), 172–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-Q)
- Kringelum, J. V., Lundegaard, C., Lund, O., & Nielsen, M. (2012). Reliable B Cell epitope predictions: Impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Computational Biology*, 8(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002829>
- Lemercier, G., Dutoya, S., Luo, S., Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., Baltz, T., Docampo, R., & Bakalara, N. (2002). A vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37369–37376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204744200>
- Lemgruber, L., Lupetti, P., Martins-Duarte, E. S., de Souza, W., & Vommaro, R. C. (2011). The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1920–1932. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01681.x>
- Li, K. M., Wilkinson, C., Kellosalo, J., Tsai, J. Y., Kajander, T., Jeuken, L. J. C., Sun, Y. J., & Goldman, A. (2016). Membrane pyrophosphatases from *Thermotoga maritima* and *Vigna radiata* suggest a conserved coupling mechanism. *Nature Communications*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms13596>
- Lin, S. M., Tsai, J. Y., Hsiao, C. D., Huang, Y. T., Chiu, C. L., Liu, M. H., Tung, J. Y., Liu, T. H., Pan, R. L., & Sun, Y. J. (2012). Crystal structure of a membrane embedded H⁺-translocating pyrophosphatase. *Nature*, 484(7394), 399–403. <https://doi.org/10.1038/nature10963>
- Ling, Y., Sahota, G., Odeh, S., Chan, J. M. W., Araujo, F. G., Moreno, S. N. J., & Oldfield, E. (2005). Bisphosphonate inhibitors of *Toxoplasma gondii* growth: *in vitro*, QSAR, and *in vivo* investigations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(9), 3130–3140. <https://doi.org/10.1021/jm040132t>
- Liu, J., Pace, D., Dou, Z., King, T. P., Guidot, D., Li, Z., Carruthers, V. B., & Moreno, S. N. J. (2014). A vacuolar-H⁺-pyrophosphatase (TgVP1) is required for microneme

- secretion, host cell invasion, and extracellular survival of *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, 93(4), 698–712. <https://doi.org/10.1111/mmi.12685>
- Luo, S., Marchesini, N., Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (1999). A plant-like vacuolar H⁺-pyrophosphatase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Letters*, 217(1), 217–220.
- Luoto, H. H., Baykov, A. A., Lahti, R., & Malinen, A. M. (2013a). Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1255–1260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217816110>
- Luoto, H. H., Belogurov, G. A., Baykov, A. A., Lahti, R., & Malinen, A. M. (2011). Na⁺-translocating membrane pyrophosphatases are widespread in the microbial world and evolutionarily precede H⁺-translocating pyrophosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21633–21642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244483>
- Luoto, H. H., Nordbo, E., Baykov, A. A., Lahti, R., & Malinen, A. M. (2013b). Membrane Na⁺-pyrophosphatases can transport protons at low sodium concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35126–35137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510909>
- Maeshima, M. (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 37–51. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00130-9)
- Marchesini, N., Luo, S., Rodrigues, C. O., Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (2000). Acidocalcisomes and a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochemical Journal*, 347(1), 243–253. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470243>
- Marchesini, N., Ruiz, F. A., Vieira, M., & Docampo, R. (2002). Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8146–8153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111130200>
- Matta, S. K., Rinkenberger, N., Dunay, I. R., & Sibley, L. D. (2021). *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. In *Nature Reviews Microbiology* 19(7), 467-480. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00518-7>

- Mayoral, J., di Cristina, M., Carruthers, V. B., & Weiss, L. M. (2020). *Toxoplasma gondii*: bradyzoite differentiation *in vitro* and *in vivo*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2071, pp. 269–282). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9857-9_15
- McIntosh, M. T., Drozdowicz, Y. M., Laroiya, K., Rea, P. A., & Vaidya, A. B. (2001). Two classes of plant-like vacuolar-type H⁺-pyrophosphatases in malaria parasites. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *114*, 183–195. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00251-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00251-1)
- McIntosh, M. T., & Vaidya, A. B. (2002). Vacuolar type H⁺ pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa. *International Journal for Parasitology*, *32*(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00325-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00325-3)
- Miranda, K., Pace, D. A., Cintron, R., Rodrigues, J. C. F., Fang, J., Smith, A., Rohloff, P., Coelho, E., Haas, de F., Souza, de W., Coppens, I., Sibley, D. L., & Moreno, S. N. J. (2010). Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole. *Mol Microbiol.*, *76*(6), 1358–1375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07165.x.Characterization>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: Making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, *19*, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Mitsuda, N., Enami, K., Nakata, M., Takeyasu, K., & Sato, M. H. (2001). Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Letters*, *488*(24489), 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02400-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02400-5)
- Mooers, B. H. M. (2020). Shortcuts for faster image creation in PyMOL. *Protein Science*, *29*(1), 268–276. <https://doi.org/10.1002/pro.3781>
- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., & Sibley, L. D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *Journal of Experimental Medicine*, *190*(12), 1783–1792. <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1783>

- Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (2009). The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(3), 208–213. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00404.x>
- Moreno, S. N. J., & Zhong, L. (1996). Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochemical Journal*, 313(2), 655–659. <https://doi.org/10.1042/bj3130655>
- Muñiz-Hernández, S., González Del Carmen, M., Mondragón, M., Mercier, C., Cesbron, M. F., Mondragón-González, S. L., González, S., & Mondragón-Flores, R. (2011). Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/473983>
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. In *Diario Oficial de la Federación* (pp. 1–58).
- Pace, D. A., Fang, J., Cintron, R., Docampo, M. D., & Moreno, S. N. J. (2011). Overexpression of a cytosolic pyrophosphatase (TgPPase) reveals a regulatory role of PPi in glycolysis for *Toxoplasma gondii*. *Biochemical Journal*, 440(2), 229–240. <https://doi.org/10.1042/BJ20110641>
- Park, J., Pandya, V. R., Ezekiel, S. J., & Berghuis, A. M. (2021). Phosphonate and bisphosphonate inhibitors of farnesyl pyrophosphate synthases: A structure-guided perspective. *Frontiers in Chemistry*, 8, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.612728>
- Pérez-Castiñeira, J. R., Alvar, J., Ruiz-Pérez, L. M., & Serrano, A. (2002). Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29(3), 567–573. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00517-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00517-X)
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. In *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 375–386). <https://doi.org/10.1038/nri1604>

- Posnett, D. N., McGrath, H., & Tam, J. P. (1988). A novel method for producing anti-peptide antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 263(4), 1719–1725. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)77935-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77935-6)
- Primo, C., Pizzio, G. A., Yang, J., Gaxiola, R. A., Scholz-Starke, J., & Hirschi, K. D. (2019). Plant proton pumping pyrophosphatase: the potential for its pyrophosphate synthesis activity to modulate plant growth. *Plant Biology*, 21(6), 989–996. <https://doi.org/10.1111/plb.13007>
- Ramírez-Flores, Cruz-Mirón, R., Lagunas-Cortés, N., Mondragón-Castelán, M., Mondragon-Gonzalez, R., González-Pozos, S., & Mondragón-Flores, R. (2020). *Toxoplasma gondii* excreted/secreted proteases disrupt intercellular junction proteins in epithelial cell monolayers to facilitated tachyzoites paracellular migration. *Cellular Microbiology*, 23(3), 1–46. <https://doi.org/10.1111/cmi.13283>
- Ramírez-Flores, C. J., Cruz-Mirón, R., Arroyo, R., Mondragón-Castelán, M. E., Nopal-Guerrero, T., González-Pozos, S., Ríos-Castro, E., & Mondragón-Flores, R. (2019). Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitology Research*, 118(1), 289–306. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6163-5>
- Ramírez-Flores, Carlos., Cruz-Mirón, Rosalba., Mondragón-Castelán, M. E., González-Pozos, Sirenia., Ríos-Castro, Emmanuel., & Mondragón-Flores, Ricardo. (2019). Proteomic and structural characterization of self-assembled vesicles from excretion/secretion products of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Proteomics*, 208, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103490>
- Rea, P. A., & Poole, R. J. (1993). Vacuolar H⁺ translocating pyrophosphatase. *Annu. Rev. Physiol. Plat Mol. Biol.*, 44, 157–180. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00130-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00130-9)
- Ribeiro, M., Franco, P. S., Lopes-Maria, J. B., Angeloni, M. B., Barbosa, B. de F., Gomes, A. de O., Castro, A. S., Silva, R. J. da, Oliveira, F. C. de, Milian, I. C. B., Martins-Filho, O. A., Ietta, F., Mineo, J. R., & Ferro, E. A. V. (2017). Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. *Experimental Parasitology*, 181, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.08.004>

- Rivera Fernández, N., & Mondragon Flores, R. (2010). Cistogénesis de *Toxoplasma gondii*. *Departamento de Bioquímica. Centro de Investigacion y Estudios Avanzados*, 29(1), 13–18.
- Rodrigues, C. O., Scott, D. A., Bailey, B. N., Souza, W. D. E., Benchimol, M., Moreno, B., Urbina, J. A., Oldfield, E., & Moreno, S. N. J. (2000). Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPi) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. *Biochemical Journal*, 349, 737–745. <http://www.biochemj.org/content/349/3/737.abstract>
- Rodrigues, C. O., Scott, D. A., & Docampo, R. (1999a). Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7712–7723. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.11.7712>
- Rodrigues, C. O., Scott, D. A., & Docampo, R. (1999b). Presence of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its localization to a different compartment from the vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem. J.*, 340, 759–766.
- Roth, A. G., Drescher, D., Yang, Y., Reamer, S., Uhlig, S., & Arenz, C. (2009). Potent and selective inhibition of acid sphingomyelinase by bisphosphonates. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(41), 7560–7563. <https://doi.org/10.1002/anie.200903288>
- Ruiz, F. A., Lea, C. R., Oldfield, E., & Docampo, R. (2004). Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44250–44257. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406261200>
- Ruiz, F. A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, & Docampo, R. (2001). The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46196–46203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105268200>
- Russell, R. G. G., Croucher, P. I., & Rogers, M. J. (1999). Bisphosphonates: Pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporosis International*, 9, 66–80.

- 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 and Infection*, 20(4), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.12.004>
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Scott, D. A., de Souza, W., Benchimol, M., Zhong, L., Lu, H. G., Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (1998). Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 22151–22158. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.22151>
- Selseleh, M., Modarressi, M. H., Shojaee, S., Mohebali, M., Eshraghian, M. R., Selseleh, M., & Keshavarz, H. (2013). Brain tissue cysts in infected mice with RH-strain of *Toxoplasma gondii* and evaluation of BAG1 and SAG1 genes expression. *Iranian Journal Parasitol*, 8(1), 40–46. <http://ijpa.tums.ac.ir>
- Serrano, A., Pérez-Castiñeira, J. R., Baltscheffsky, M., & Baltscheffsky, H. (2007). H⁺-PPases: Yesterday, today and tomorrow. *IUBMB Life*, 59(2), 76–83. <https://doi.org/10.1080/15216540701258132>
- Seufferheld, M., Lea, C. R., Vieira, M., Oldfield, E., & Docampo, R. (2004). The H⁺-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51193–51202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406099200>
- Sibley, L. D. (2010). How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(5), 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.05.009>
- Sibley, L. D., & Ajioka, J. W. (2008). Population structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Review of*

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>

- Sibley, L. D., Khan, A., Ajioka, J. W., & Rosenthal, B. M. (2009). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2749–2761. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>
- Sinai, A. P., & Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *Journal of Cell Biology*, 154(1), 95–108. <https://doi.org/10.1083/jcb.200101073>
- Sivula, T., Salminen, A., Parfenyev, A. N., Pohjanjoki, P., Goldman, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., & Lahti, R. (1999). Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters*, 454(1–2), 75–80. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00779-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00779-6)
- Soète, 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*. In *Experimental Parasitology* (Vol. 78, Issue 4, pp. 361–370). <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1039>
- Soète, M., & Dubremetz, J. F. (1996). *Toxoplasma gondii*: Kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 219, 75–80. https://doi.org/10.1007/978-3-642-51014-4_8
- Striepen, B., Jordan, C. N., Reiff, S., & Van Dooren, G. G. (2007). Building the perfect parasite: Cell division in Apicomplexa. *PLoS Pathogens*, 3(6), 0691–0698. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030078>
- Strunecka, A., & Strunecky, O. (2020). Mechanisms of fluoride toxicity: From enzymes to underlying integrative networks. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(20), 1–24. <https://doi.org/10.3390/app10207100>
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Zhu, X. Q., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 109(15), 5844–5849.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

- Sullivan, W. J., & Jeffers, V. (2011). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x>
- Szabo, C. M., & Oldfield, E. (2001). An investigation of bisphosphonate inhibition of a vacuolar proton-pumping pyrophosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(2), 468–473. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5617>
- Takehige, K., & Tazawa, M. (1989). Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localization in *Chara corallina*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(6), 3262–3266. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)94061-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)94061-5)
- Tomita, T., Mukhopadhyay, D., Han, B., Yakubu, R., Tu, V., Mayoral, J., Sugi, T., Ma, Y., Saeij, J. P. J., & Weiss, L. M. (2021). *Toxoplasma gondii* matrix antigen 1 is a secreted immunomodulatory effector. *mBio*, 12(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/life11090988>
- Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2013). *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. *Trends in Parasitology*, 29(8), 380–384. <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/9/988>
- Tu, V., Ma, Y., Tomita, T., Sugi, T., Mayoral, J., Han, B., Yakubu, R. R., Williams, T., Horta, A., & Weiss, L. M. (2020). The *Toxoplasma gondii* cyst wall interactome. *mBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02699-19>
- 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), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00469-19>
- Urbina, J. A., Moreno, B., Vierkotter, S., Oldfield, E., Payares, G., Sanoja, C., Bailey, B. N., Yan, W., Scott, D. A., Moreno, S. N. J., & Docampo, R. (1999). *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33609–33615. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33609>
- Valueva, A. V., Romanov, R. S., Vorobyeva, N. N., Kurilova, S. A., & Rodina, E. V. (2020). Synthesis of inorganic pyrophosphatase-nanodiamond conjugates resistant to calcium

and fluoride. *ACS Omega*, 5(12), 6641–6650.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04428>

- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Weiner, H., Stitt, M., & Heldt, H. W. (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 893, 13–21.
- 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. Euk. Microbiol*, 42(2), 150–157.
- Wu, Q. F., Wang, W. S., Chen, S. B., Xu, B., Li, Y. D., & Chen, J. H. (2021). Crystal structure of inorganic pyrophosphatase from *Schistosoma japonicum* reveals the mechanism of chemicals and substrate inhibition. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.712328>
- Yang, X., Yin, X., Liu, J., Niu, Z., Yang, J., & Shen, B. (2022a). Essential role of pyrophosphate homeostasis mediated by the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 18(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010293>
- Yang, X., Yin, X., Liu, J., Niu, Z., Yang, J., & Shen, B. (2022b). Essential role of pyrophosphate homeostasis mediated by the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 18(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010293>
- Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature Reviews Immunology*, 14(2), 109–121. <https://doi.org/10.1038/nri3598>

- Zhang, Halonen, S. K., Ma, Y. F., Wittner, M., & Weiss, L. M. (2001). Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infection and Immunity*, 69(1), 501–507. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.501-507.2001>
- Zhang, J., Li, J., Wang, X., & Chen, J. (2011). OVP1, a Vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.09.014>
- Zhang, Min., Joyce, B. R., Sullivan, W. J., & Nussenzweig, V. (2013). Translational control in Plasmodium and Toxoplasma parasites. *Eukaryotic Cell*, 12(2), 161–167. <https://doi.org/10.1128/EC.00296-12>
- Zhang, Wang, C., Otto, T. D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S. R., Udenze, K., Bronner, I. F., Casandra, D., Mayho, M., Brown, J., Li, S., Swanson, J., Rayner, J. C., Jiang, R. H. Y., & Adams, J. H. (2018). Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science*, 360(6388), 1–26. <https://doi.org/10.1126/science.aap7847>
- Zyryanov, A. B., Vener, A. v., Salminen, A., Goldman, A., Lahti, R., & Baykov, A. A. (2004). Rates of elementary catalytic steps for different metal forms of the Family II pyrophosphatase from *Streptococcus gordonii*. *Biochemistry*, 43(4), 1065–1074. <https://doi.org/10.1021/bi0357513>

14. ANEXOS

I. Reacciones bioquímicas de liberación del PPi

El pirofosfato inorgánico (PPi) se descubrió ya en el siglo XIX. Como su nombre indica, se sintetiza calentando sales de sodio o potasio de ortofosfato. La formación de PPi en un sistema biológico fue reportada en 1941 por Cori, quien encontró que se acumulaba en el extracto de hígado de rata incubado aeróbicamente en presencia de succinato y fructosa (referido en Cori *et al.* 1951) (Heinonen, 2001).

Algunas de las reacciones bioquímicas de liberación de PPi se enlistan a continuación: (Tomado y modificado de (Heinonen, 2001)).

1. $NTP + X + Y = X-Y + AMP + PPi$

1.1. *Síntesis de aminoacil-ARNt*

$ATP + \text{un aminoácido} + \text{ARNt} = \text{aminoacil-ARNt} + AMP + PPi$.
6.1.1.1-7; 6.1.1.9-12; 6.1.1.14-22. Hoagland *et al.* 1958.

1.2. *Síntesis de la pared celular en algunas bacterias*

$ATP + \text{D-alanina} + \text{poli(ribitolfosfato)} = \text{O-D-alanil-poli(ribitolfosfato)} + AMP + PPi$.
6.1.1.13. Baddiley y Neuhaus 1959.

1.3. *Activación de los ácidos carboxílicos*

$ATP + R-COO- + \text{CoenzimaA} = R-CO-CoenzimaA + AMP + PPi$.
6.2.1.1-3; 6.2.1.7-8; 6.2.1.11-12; 6.2.1.14-17; 6.2.1.23-33. Chou y Lipmann 1952.

1.4. *Degradación de proteínas in vivo*

$ATP + \text{ubiquitina} + \text{proteína-lisina} = \text{proteína-N-ubiquitilisina} + AMP + PPi$.
6.3.2.19; 6.3.2.21. Ciechanover *et al.* 1981.

1.5. *Síntesis de péptidos no ribosomales*

a. Síntesis de péptidos antibióticos en bacterias

$nATP + n\text{aminoácidos} = \text{péptido} + nAMP + nPPi$.
Sin número EC. Gewers *et al.* 1968.

b. $ATP + \text{L-histidina} + \text{6-alanina} = \text{carnosina} + AMP + PPi$.
6.3.2.11. Kalyankar y Meister 1959.

c. Síntesis de la kiotorfina en el cerebro

$ATP + \text{L-arginina} + \text{L-tirosina} = \text{L-tirosil-L-arginina} + AMP + PPi$.
6.3.2.24. Veda *et al.* 1987.

1.6. *Síntesis de un anillo β -lactámico*

N^2 -(2-carboxietil) arginina + ATP = deoxyguanidinoproclavamate + AMP + PPi.
Sin número de EC. Bachmann *et al.* 1998.

1.7. Síntesis de amidas

ATP + un aminoácido + NH_4^+ = la amida correspondiente + AMP + PPi o ATP + un aminoácido + L-glutamina = la amida correspondiente + L-glutamato + AMP + PPi.
6.3.1.1 ; 6.3.1.7 ; 6.3.5.4. Ravel *et al.* 1962.

1.8. Síntesis de arginina y urea

ATP + L-citrulina + L-aspartato = L-argininosuccinato + AMP + PPi.
6.3.4.5. Petrac y Rattner 1958.

1.9. Síntesis de coenzimas

a. biosíntesis de NAD.

ATP + deamido NAD^+ + amoníaco = NAD^+ + AMP + PPi
ATP + deamido NAD^+ + L-glutamina = NAD^+ + L-glutamato + AMP + PPi.
6.3.1.5 ; 6.3.5.1. Preiss y Handler 1958.

b. biosíntesis de la coenzimaA.

ATP + (R)-pantoato + B-alanina = (R)-pantotenato + AMP + PPi.
6.3.2.1. Maas y Novelli 1953. 6.3.2.4.
CTP + 4-fosfopantotenato + L-cisteína = 4-fosfopantotenoilcisteína + CMP + PPi.
6.3.2.5. Jackowski 1996.

1.10. Síntesis de guanilato

ATP + XMP + amoníaco = GMP + AMP + PPi
ATP + XMP + L-glutamina = GMP + L-glutamato + AMP + PPi.
6.3.4.1. ; 6.3.5.2. Lagerqvist 1957.

1.11. Modificación covalente de las proteínas con ácidos carboxílicos

a. ATP + biotina + apoenzima-lisina = apoenzima-N-biotinilisina (holoenzima) + AMP+PPi.
6.3.4.9 -11 ; 6.3.4.15. Lane *et al.* 1964.
b. ATP + lipoato + apoenzima-lisina = apoenzima-N-lipoilisina (holoenzima) + AMP +PPi.
Sin número EC. Reed *et al.* 1958.
c. ATP + carboxilato + HS-enzima = carboxil-S-enzima + AMP + PPi.
6.2.1.19-20; 6.2.1.22. Schmellen y Eggerer 1974.

1.12. Ligadura de ARN y ADN

a. ATP + (NMP)_n-3'-OH + P-5--(NMP)_m = (NMP)_{n+m} + AMP + PPi.
6.5.1.1; 6.5.1.3. Weiss y Richardson 1967.
b. ATP + ARN = ARN-terminal-2'3'-fosfato cíclico + AMP + PPi.
6.5.1.4. Filipovicz *et al.* 1985.

1.13. Síntesis de fosfoenolpiruvato en la fotosíntesis C4

ATP + piruvato + ortofosfato = PEP + AMP + PPi.
2.7.9.1. Hatch y Slack 1968.

2. ATP + X = Y + AMP + PPi

2.1. Reducción de un grupo carboxilo

a. $\text{ATP} + \text{aril-COO}^- + \text{NADPH} = \text{aril-CHO} + \text{NADP}^+ + \text{AMP} + \text{PPi}$.

1.2.1.30. Gross 1971.

b. biosíntesis de la lisina en los hongos

$\text{ATP} + \text{L-}\alpha\text{-aminoadipato} + \text{NADPH} = \text{L-}\alpha\text{-aminoadipato-}\delta\text{-semialdehído} + \text{NADP}^+ + \text{AMP} + \text{PPi}$.

Sin número de EC. Sagisaka y Shimura 1962

2.2. Producción de luz por la luciferasa de luciérnaga

$\text{ATP} + \text{luciferina} + \text{O}_2 = \text{luciferina oxidada} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{luz} + \text{AMP} + \text{PPi}$.

1.13.12.7. McElroy y Green 1956.

2.3. Racemización de fenilalanina

$\text{ATP} + \text{L-fenilalanina} + \text{H}_2\text{O} = \text{D-fenilalanina} + \text{AMP} + \text{PPi}$.

5 .1.1.11. Yamada y Kurahashi 1969

3. NTP + X = NMP-X + PPi

3.1. Activación de los azúcares

$\text{NTP} + \text{azúcar-fosfato} = \text{NDP-azúcar} + \text{PPi}$.

2.7.7.9-11 ; 2.7.7.13 ; 2.7.7.23-24 ; 2.7.7.27-30 ; 2.7.7.32-34. Munch-Petersen *et al.* 1953.

Sin número EC. NTP-p-glicero-D-mannoheptosa-1-fosfato nucleotidiltransferasa. Eidels y Osborn 1971.

CTP-mioinositol-1-fosfato citidiltransferasa. Chen *et al.* 1998.

CTP-2-C-metileritritol-4-fosfato citidiltransferasa. Rohdich *et al.* 1999

3.2. Activación de otros compuestos para la biosíntesis de fosfolípidos, antibióticos, etc.

$\text{CTP} + \text{colinfosfato} = \text{CDP-colina} + \text{PPi}$.

2.7.7.14-15 ; 2.7.7.38-41 ; 2.7.7.43-44 ; 2.7.7.46-47 ; 2.7.7.55 ; 2.7.7.57-58. Kennedy y Weiss 1956.

3.3. Activación del sulfato

$\text{ATP} + \text{sulfato} = \text{APS} + \text{PPi}$.

2.7.7.4. Hilz y Lipmann 1955.

3.4. Síntesis de coenzimas

a. $\text{ATP} + \text{nicotinamida ribonucleótido} = \text{NAD}^+ + \text{PPi}$.

2.7.7.1 ; 2.7.7.18. Kornberg 1948.

b. $\text{ATP} + \text{FMN} = \text{FAD} + \text{PPi}$.

2.7.7.2. Scherer y Kornberg 1950.

c. $\text{ATP} + \text{panteteína-4'}\text{-fosfato} = \text{desfosfocofato A} + \text{PPi}$.

2.7.7.3. Hoagland y Novelli 1954.

d. $\text{GTP} + \text{fosfato de adenosilcobinamida} = \text{adenosilcobinamida-GDP} + \text{PPi}$ (síntesis aeróbica de la vitamina B12).

Sin número EC. Adenosilcobinamida fosfato guaniltransferasa. Barchielli *et al.* 1960.

e. $\text{GTP} + 5\text{-hidroxi-6-metilbenzimidazolilcobamida} = \text{cobinamida-GDP} + \text{a-ribazol} + \text{PPi}$ (síntesis anaeróbica de vitamina B12).

Sin número EC. Schulze *et al.* 1998.

3.5. Síntesis del ácido nucleico

$\text{NTP} + (\text{NMP})_n + \text{template} = (\text{NMP})_{n+1} + \text{template} + \text{PPi}$.

2.7.7.6-7; 2.7.7.48-49. Bessman *et al.* 1957.

3.6. Modificación de los ácidos nucleicos

a. Poliadenilación del mRNA

$n\text{ATP} + \text{ARN-3'-OH (sin molde)} = \text{ARN-3'-(AMP)}_n + n\text{PPi}$.

2,7.7.19. Edmonds y Abrams 1960

b. Adición de nucleótidos al ADN independiente del molde

$\text{NTP} + \text{ADN-3'-OH} = \text{ADN-3'-NMP} + \text{PPi}$,

2.7.7.31. Krakowet *et al.* 1961.

c. *CaPPing* del mRNA

$\text{GTP} + 5'\text{ppPur-ARNm} = \text{GpppPur-ARNm} + \text{PPi}$.

2.7.7.50. Martin y Moss 1975.

d. Formación del extremo aceptor del ARNt

$\text{NTP} + \text{ARNt-3'-OH} = \text{ARNt-3'-NMP} + \text{PPi}$.

2.7.7.21 ; 2.7.7.25 ; 2.7.7.52. Hecht *et al.* 1958.

3.7. Síntesis de oligonucleótidos

a. $(n+1)\text{ATP} = \text{pppA-2'-(P-5'-A)}_n + n\text{PPi}$.

Sin número EC. Justesen *et al.* 1980.

b. $2\text{GTP} = \text{bis-guanosiltetrafosfato} + \text{PPi}$.

2.7.7.45. Warner y Huang 1974.

3.8. Regulación de la glutamina sintetasa

a. $n\text{ATP} + \text{glutamina sintetasa (más activa)} = \text{glutamina sintetasa (AMP)}_n \text{ (menos activa)} + n\text{PPi}$.

2.7.7.42. Kingdon *et al.* 1967.

b. $\text{UTP} + \text{proteína II} = \text{proteína II(UMP)} + \text{PPi}$.

2.7.7.59. Mangum *et al.* 1973.

3.9. Modificación de coenzimas

$\text{ATP} + \text{FactoC42o} = \text{FactoC39o (Factor42o-AMP)} + \text{PPi}$.

Sin número de EC. Factor-390 sintetasa. Kengen *et al.* 1989.

3.10. Activación de L-malato para la síntesis de polimalato

$\text{ATP} + \text{L-malato} = \beta\text{-L-malyl-AMP} + \text{PPi}$.

Sin número de EC. β -l-malyl-AMP ligasa. Willibald *et al.* 1999.

4. $NTP + X = N-X + PPi + Pi$

4.1. *Síntesis de S-adenosilmetionina y adenosilcobalamina*

$ATP + L\text{-metionina} + H_2O = SAM + PPi + Pi$.

2.5.1.6; 2.5.1.17. Mudd y Cantoni 1958.

5. $NTP = NMP + PPi$

5.1. *Síntesis de nucleótidos cíclicos*

$NTP = cNMP + PPi$.

4.6.1.1-2; 4.6.1.6. RaIl y Sutherland 1962.

5.2. *Hidrólisis de NTP*

$NTP + H_2O = NMP + PPi$.

3.6.1.8; 3.6.1.12 ; 3.6.1.19; 3.6.1.23. Heppel y Rilmoe 1953.

5.3. *Síntesis de la histidina*

$N_5\text{-(fosforibosil)ATP} + \text{iliO} = N_5\text{-(fosforibosil)AMP} + PPi$.

3.6.1.31. Smith y Ames 1965.

5.4. *Síntesis del ácido fólico*

$H_2\text{-neopterina trifosfato} + H_2O = H_2\text{-neopterina monofosfato} + PPi$.

Sin número EC. Dihidroneopterina trifosfato pirofosfato. Suzuki y Brown 1974.

5.5. *Síntesis de puromicina*

$3'\text{-amino-3'-desoxiATP} = 3'\text{-amino-3'-desoxiAMP}$.

Sin número de EC. Proteína Pur7 de *Streptomyces alboniger*. Espinosa *et al.* 1999.

6. $\text{Fosforibosilpirofosfato} + X = X\text{-ribosa-5'-fosfato} + PPi$

6.1. *Síntesis de nucleótidos de novo*

a. nucleótidos de pirimidina

$PRPP + \text{orotato} = OMP + PPi$.

2.4.2.10. Liebetman *et al.* 1954.

b. nucleótidos de purina

$PRPP + L\text{-glutamina} + H_2O = 5\text{-fosforibosilamina} + L\text{-glutamato} + PPi$.

2.4.2.14. Goldwait *et al.* 1955.

6.2. *Síntesis de nucleótidos, reacción de salvamento*

$PRPP + N = NMP + PPi$.

2.4.2.7-9; 2.4.7.22. Kornberg *et al.* 1955.

6.3. Biosíntesis de aminoácidos

a. histidina; $\text{PRPP} + \text{ATP} = (\text{5-fosforibosil})\text{ATP} + \text{PPi}$.

2.4.2.17. Amesetal. 1961.

b. triptófano; $\text{PRPP} + \text{antranilato} = (\text{5-fosforibosil}) \text{antranilato} + \text{PPi}$.

2.4.2.18. Smith y Yanofsky 1960.

6.4. Biosíntesis de coenzimas

$\text{PRPP} + \text{nicotinamida} = \text{NMN} + \text{PPi}$.

2.4.2.11-12 ; 2.4.2.19-20. Preiss y Handler 1957.

6.5. Fosforibosilación del imidazolacetato

$\text{PRPP} + \text{imidazol-4-acetato} + \text{ATP} = (\text{5-fosforibosil})\text{imidazol-4-acetato} + \text{ADP} + \text{Pi} + \text{PPi}$.

6.3.4.8. Crowley 1964.

6.6. Síntesis de la pared celular micobacteriana

$\text{PRPP} + \text{poliprenilfosfato} = \text{poliprenilfosfato-5-fosforibosa} + \text{PPi}$.

Sin número EC. Poliprenilfosfato fosforibosiltransferasa. Scherman *et al.* 1996.

7. X-pirofosfato + Y = X-Y + PPi

7.1. Síntesis de esteroides, terpenos y robinómeros

$\text{R}_1\text{-PP} + \text{R}_2\text{-PP} = \text{R}_1\text{-R}_2\text{-PP} + \text{PPi}$ (R = grupo isopentenilo o su oligómero).

2.5.1.1 ; 2.5.1.10-11 ; 2.5.1.20-21 ; 2.5.1.28-33. Lynen *et al.* 1959.

7.2. Síntesis de coenzimas y pigmentos

$\text{X-PP} + \text{Y} = \text{X-Y} + \text{PPi}$.

2.5.1.3; 2.5.1.15; 2.5.1.34-36; 2.5.1.39-40. Caminier y Brown 1960. Sin número CE. 1,4-dihidroxi-2-naftoato octapreniltransferasa. Shineberg y Young 1976.

7.3. Modificación del ARNt

$\text{Isopentenil-PP} + \text{ARNt} = \text{isopentenil-ARNt} + \text{PPi}$.

2.5.1.8. Kline *et al.* 1969.

7.4. Síntesis de citoquinina

$\text{Isopentenil-PP} + \text{AMP} = \text{isopentenil-AMP} + \text{PPi}$.

2.5.1.27. Chen y Melitz 1979.

7.5. Síntesis de la pared celular de las arqueas

$\text{Geranilgeranil-PP} + \text{glicerilfosfato} = \text{geranilgeranilglicerilfosfato} + \text{PPi}$.

2.5.1.41-42. Zhang *et al.* 1990.

7.6. Farnesilación y geranilación de proteínas

$\text{Farnesil-PP} + \text{HS-proteína} = \text{farnesil-S-proteína} + \text{PPi}$

Sin número de EC. Reiss *et al.* 1990.

8. X-pirofosfato + H₂O = X + PPi

8.1. Hidrólisis del terpenilpirofosfato

Prenyl-PP + H₂O = prenol + PPi.

3.1.7.1 ; 3.7.1.3. Tsai y Gaylor 1966.

8.2. Hidrólisis de guanosina-3'',5' -bis(difosfato) (factor estricto)

ppGpp + H₂O = GDP + PPi.

3.1.7.2. Heinemeyer y Richter 1978.

9. X-pirofosfato = Y + PPi

9.1. Reacciones de ciclación en la síntesis de terpenos

X-PP = Y + PPi.

4.1.99.7 ; 4.6.1.5 ; 4.6.1.7-9 ; 4.6.1.11. Dueber et al. 1978.

10. X-pirofosfato = Y + PPi

10. Síntesis de pirofosfato de novo

10.1. Síntesis de PPi; utilizando la fuerza motriz de protones

2 ortofosfato = PPi + H₂O.

3.6.1.1. Baitscheffsky et al. 1966.

II. Preparación de soluciones

PBS IX, pH 7.2

Reactivo	Concentración
NaCl	138 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.1 mM

Buffer de lisis

Reactivo	Concentración
β mercaptoethanol	2 %
SDS	1%

EGTA	20 mM
Tris-HCl (pH 7.5)	2 mM
PMSF	0.1 mM
TPCK	0.1 mM
TLCK	0.1 mM

Buffer de carbonatos

Reactivo	Concentración
Na ₂ CO ₃	0.2 M
NaHCO ₃	0.2 M
H ₂ O	200 mL

Solución de revelado

Reactivo	Concentración
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0.1 M
C ₆ H ₈ O ₇	0.1 M
C ₆ H ₈ N ₂	0.004 g
H ₂ O ₂	4 µL

Buffer de transferencia pH 8.3

Reactivo	Concentración
Tris-OH	25 mM
Glicina	0.19 M
Metanol	4.95 M

Buffer TBST

Reactivo	Concentración
Tris Base	20 mM
NaCl	137 mM
Tween 20	1 %
H ₂ O bidestilada	1 L

III. Especificidad evaluada en pBLAST para cada péptido inmunogénico diseñado

- Resultados obtenidos para la pirofosfatasa citosólica (TgPPasa) [*Inorganic pyrophosphatase (Toxoplasma gondii)*] (5WRT)

type I inorganic pyrophosphatase PPase [Toxoplasma gondii RUB]

Sequence ID: [KFG63422.1](#) Length: 498 Number of Matches: 1

Range 1: 263 to 276 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
48.6 bits(107)	3e-05	14/14(100%)	14/14(100%)	0/14(0%)
Query 1	MQDLKKDGSLSREYA	14		
	MQDLKKDGSLSREYA			
Sbjct 263	MQDLKKDGSLSREYA	276		

protein FAM135B isoform X9 [Homo sapiens]

Sequence ID: [XP_011515375.1](#) Length: 1177 Number of Matches: 1

Range 1: 1039 to 1048 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
24.8 bits(51)	9.3	8/10(80%)	8/10(80%)	0/10(0%)
Query 1	MQDLKKDGSLS	10		
	MQ LKK GSL			
Sbjct 1039	MQDLKKDGSLS	1048		

transmembrane protein 16E [Mus musculus]

Sequence ID: [EDL21896.1](#) Length: 405 Number of Matches: 1

Range 1: 47 to 63 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
24.8 bits(51)	5.0	9/17(53%)	11/17(64%)	5/17(29%)
Query 2	QDLKKDGSLS-----REY	13		
	+DLKKDG L RE+			
Sbjct 47	EDLKKDGSLSLKAERRREF	63		

- Resultados obtenidos para pirofosfatasa membranal translocadora de protones (TgVP1) [*V-type H(+)-translocating pyrophosphatase VP1 [Toxoplasma gondii]* (B6KH90)]

V-type H(+)-translocating pyrophosphatase VP1 [Toxoplasma gondii ME49]

Sequence ID: [XP_002367213.1](#) Length: 816 Number of Matches: 1

[See 7 more title\(s\)](#) [▼ See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 112 to 127 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
54.1 bits(120)	5e-07	16/16(100%)	16/16(100%)	0/16(0%)
Query 1	GPLGDDNKRLTDPLYL	16		
	GPLGDDNKRLTDPLYL			
Sbjct 112	GPLGDDNKRLTDPLYL	127		

unnamed protein product [Homo sapiens]

Sequence ID: [BAH11659.1](#) Length: 382 Number of Matches: 1

Range 1: 247 to 254 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
25.2 bits(52)	9.2	7/8(88%)	7/8(87%)	0/8(0%)

```
Query 7   NKRLTDPL 14
          NKRL DPL
Sbjct 247 NKRLADPL 254
```

unnamed protein product [Mus musculus]

Sequence ID: [BAE25808.1](#) Length: 208 Number of Matches: 1

Range 1: 97 to 112 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
24.0 bits(49)	14	8/16(50%)	10/16(62%)	3/16(18%)

```
Query 4   GDDN---KRLTDPLYL 16
          GD+      RLTD LY+
Sbjct 97   GDEHPSMNRLTDALYM 112
```