



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Efecto inmunoprotector de péptidos inmunogénicos de la proteína
Toxolisina 1 en un modelo murino de toxoplasmosis aguda**

T E S I S

Que presenta

IBT. Brenda Yomara García Sánchez

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio No. 16: Bioquímica Celular de Patógenos Intracelulares, en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Zacatenco con apoyo del proyecto con número 51486 FORDECyT-PRONACES “CIENCIAS DE FRONTERA 2019 CONACYT” a cargo del Dr. Ricardo Mondragón Flores.

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** por el conocimiento transmitido durante el periodo de maestría y por los aportes en los seminarios departamentales.

Al **Departamento de Bioquímica**, por permitirme el acceso a las instalaciones, el equipo y material de apoyo proporcionado.

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

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca crédito otorgada de septiembre de 2021 a agosto de 2022, con número de CVU 1076877.

Agradecimientos

Agradezco al **Dr. Ricardo Mondragón Flores** titular del laboratorio 16 del departamento de Bioquímica, por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, por su asesoría e ideas que permitieron cumplir los objetivos de este trabajo.

Agradezco a mis asesores el **Dr. Edgar Morales Ríos** y el **Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes**; por su tiempo, comentarios e ideas que permitieron enriquecer este trabajo.

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 trabajo.

Agradezco al **Ing. José Claudio Jiménez Vargas** por brindarme el material necesario.

Agradezco a la **Q.F.B. Sirenia González Pozos** de la Unidad de Microscopía Electrónica por la asistencia técnica proporcionada durante el análisis de microscopía electrónica

Agradezco al **M. en C. Víctor Hugo Rosales G**; y al **Q.B.P. Wilfrido David Tapia Sánchez** de la Unidad de Citometría de flujo por la asistencia técnica proporcionada durante el análisis de citometría de flujo.

Agradezco al **M. en C. Noe Lagunas Ríos** por brindarme las bases de este trabajo.

Agradezco **Ing. Karina Araujo Ruiz, M.V.Z. Itzel Guadalupe Aguilar López** y **M. en C. Daniela Roa Velázquez**, por su asistencia y conocimiento proporcionado durante el desarrollo de diferentes técnicas.

Agradezco y dedico este logro a mis padres: **Blanca Rosa Sanchez López** y **Patricio Raúl Garcia Flores**, quienes día a día me han enseñado a ser una mejor humano. Gracias a ellos he podido concluir con una meta más en el ámbito profesional. Por sus frases de aliento, amor y apoyo incondicional.

A mi hermanos y hermana **Raúl, Mauricio** y **Luz**, me ha sabido guiar, dar consejos y tolerar en los momentos de estrés ansiedad.

A mi princesa hermosa (**Gordis**), **Chata, Super Man, Dana** y **Orejas**, que son los seres vivos que me mostraron su lealtad y amor todos los días

A **Esteban Acosta**, por permitirme ser parte de su vida y compartir este logro juntos. Por su amor, comprensión y apoyarme en todo momento.

A mis viejos amigos, por estar siempre presentes. A mis nuevos amigos, **Fer, Kari** y **Esteban** en verdad solo nosotros sabemos lo que nos tocó pasar para llegar a final de esta etapa.

A mis amigos de laboratorio: **Karina, Itzel, Mónica, Claudio** y **Dr. Mondragón** una familia más. Con quienes compartí los mejores Gansitos, experimentos éxitos y cada tropiezo.

A dos nenes encantadores **Isaac** y **Matías**, por regalarnos más tiempo de su mamá Moni.

Índice

Agradecimientos	III
Índice de figuras.....	IX
Índice de tablas	XI
Abreviaturas	XII
Resumen	XIII
Generalidades.....	5
Taxonomía	5
Formas parasitarias de <i>T. gondii</i>.....	6
Taquizoíto	6
Bradizoíto	7
Esporozoíto	8
Organelos secretores	9
Micronemos	10
Roptrías	10
Gránulos densos.....	11
Mecanismo de invasión celular de <i>T. gondii</i>	12
Mecanismo de invasión pasiva	12
Mecanismo de invasión activa	13
Respuesta innata	14
Respuesta humoral.....	15
Respuesta celular	17
Papel de las citocinas durante la infección	18
Diseño para el desarrollo de vacunas contra <i>T. gondii</i>.....	25
Antecedentes directos	32
Justificación	37
Hipótesis	37
Objetivos	37
Objetivo general	37
Objetivos particulares <i>in silico</i>.....	37

Objetivos particulares <i>in vivo</i>	38
Estrategia experimental	39
Análisis <i>in silico</i> para el diseño de péptidos inmunogénicos.....	39
Distribución de grupos experimentales	40
Protocolo de inmunización y determinaciones	41
Metodología	42
Análisis bioinformático	42
Predicción del péptido activador de linfocitos B (Péptido A)	42
Construcción del péptido A	42
Predicción de epítomos de linfocitos T (Péptido B).....	43
Construcción del dipéptido B	43
Predicción de la alergenicidad y propiedades fisicoquímicas de cada construcción	44
Animales	44
Parásitos	44
Protocolo de inmunización y recolección de suero	45
Preparación de extractos totales de Taks	45
Obtención de proteínas de excreción/secreción	46
Cuantificación de proteína	46
Precipitación de proteína por el método de Metanol-Cloroformo	46
SDS-PAGE	47
Western Blot (WB)	47
Ensayo de inmunofluorescencia	48
Determinación semicuantitativa de inmunoglobulinas por ELISA	48
Determinación semicuantitativa de citocinas por citometría de flujo	49
Reto 1000 Taks (Dosis letal)	50
Análisis estadístico	50
Resultados	51
Análisis bioinformático	51
Los parámetros de alergenicidad y fisicoquímicos predichos del PPA y PPB	55

Caracterización inmunoquímica de PPA, PPB y TLN1m	56
Expresión de inmunoglobulinas inducidas por PPA y PPB.....	61
Expresión de citocinas inflamatorias inducidas por PPA y PPB.....	63
IFN- γ	63
TNF- α	64
IL-6.....	66
IL-2.....	67
Expresión de citocinas regulatorias inducidas por PPA y PPB.....	69
IL-10.....	69
IL-4.....	70
Supervivencia ante el reto letal contra Taks.....	70
Expresión de inmunoglobulinas inducidas por PPA post-infección.....	71
Expresión de citocinas inflamatorias inducidas por PPA post-infección..	72
Expresión de citocinas regulatorias inducidas por PPA post reto de	
infección.	73
Supervivencia ante un segundo reto letal contra Taks.	74
Discusión	75
Conclusión.....	86
Perspectivas	87
Referencias	88
Anexos	97

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de un taquizoíto de <i>T. gondii</i>	7
Figura 2. Bradizoito de <i>T. gondii</i> en quiste	8
Figura 3. Esporozoíto de <i>T. gondii</i> recién excretado dentro de un ooquiste.....	9
Figura 4. Proceso de invasión pasiva de <i>T.gondii</i>	13
Figura 5. Proceso de invasión activa de <i>T. gondii</i>	14
Figura 6. Dinámica de la respuesta humoral durante la infección por <i>T. gondii</i> ..	16
Figura 7. Activación de la respuesta celular ante la infección por <i>T.gondii</i>	18
Figura 8. Mecanismos efectores del IFN- γ	20
Figura 9. Participación de IL-2 en la respuesta inmune contra <i>T. gondii</i>	21
Figura 10. Participación de IL-10 en la respuesta inmune contra <i>T.gondii</i>	24
Figura 11. Participación de IL-4 en la respuesta inmune contra <i>T. gondii</i>	25
Figura 12. Caracterización de TLN1	33
Figura 13. Reconocimiento de proteínas del citoesqueleto con sueros humanos positivos a toxoplasmosis aguda.....	34
Figura 14. Proteínas detectadas en spots reconocidos por IgM humana con mayor número de epítomos accesibles y antigénicos para linfocitos B.....	35
Figura 15. Número de epítomos predichos con elevada ($IC_{50} < 50$ nM) e intermedia (50 nM $< IC_{50} < 100$ nM) afinidad de unión para cada alelo MHC analizado, reportados por IEDB.	36
Figura 16. Modelo de la estructura 3D de Toxolisina 1 madura (TLN1m)	52
Figura 17. Modelo de la estructura 3D del péptido B para la activación de células T CD8+ y T CD4+.....	53
Figura 18. Diagrama de TLN1.....	54
Figura 19. Identificación del PPA y PPB con los sueros representativos correspondientes a cada Ag.....	57
Figura 20. Identificación del TLN1m con los sueros correspondientes a cada Ag	58
Figura 21. Localización de TLN1m en Taks extracelulares	59

Figura 22. Distribución de TLN1m en los Taks durante su proliferación en células HEp-2	60
Figura 23. Análisis de los isotipos de IgM específicos para PPA y PPB, en sueros pre inmunes e inmunes	61
Figura 24. Análisis de los isotipos de IgG específicos para PPA y PPB, en sueros pre inmunes e inmunes.	62
Figura 25. Perfil de IFN- γ en ratones inmunizados con PPA y PPB.	64
Figura 26. Perfil de TNF- α en ratones inmunizados con PPA y PPB.	65
Figura 27. Perfil de IL-6 después de la inmunización de ratones con PPA y PPB	67
Figura 28. Perfil de IL-2 generado después de la inmunización de ratones con PPA y PPB.	68
Figura 29. Perfil de IL-10 generado después de la inmunización de ratones con PPA y PPB.	69
Figura 30. Perfil de IL-4 después de la inmunización con PPA y PPB.	70
Figura 31. Respuesta de supervivencia de los ratones inmunizados con PPA y PPB ante un reto de infección con dosis letales de Taks.	71
Figura 32. Análisis de los isotipos de IgM e IgG, en el suero pre inmune e inmune de los ratones inmunizados con PPA y PPB y después de la infección por <i>T. gondii</i>	72
Figura 33. Expresión de citocinas pro-inflamatorias ante la administración del PPA y posterior al reto de infección por <i>T. gondii</i>	73
Figura 34. Expresión de citocinas regulatorias ante la inmunización con PPA y posterior a la infección por <i>T. gondii</i>	74
Figura 35. Evaluación de la supervivencia ante la segunda infección con 1,000 Taks.	75

Índice de tablas

Tabla 1. Estrategias terapéuticas reportadas contra toxoplasmosis	28
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas	55
Tabla 3. Nivel de IFN- γ producido por cada ratón inmunizado con PPA y PPB ...	64
Tabla 4. Nivel de TNF- α producido por cada ratón inmunizado con PPA y PPB..	65
Tabla 5. Nivel de IL-6 producida por cada ratón inmunizado con PPA y PPB	67
Tabla 6. Nivel de IL-2 producida por cada ratón inmunizado con PPA y PPB	68

Abreviaturas

° C	Grados centígrados
AlphaFold 2	AF2
BSA	Albumina sérica bovina
E/S	Excreción/secreción
ET	Extracto total
Hep-2	Carcinoma epidermoide humano cepa-2
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
PAF	Paraformaldehído
PPA	Péptido A
PPB	Péptido B
RGD	arginina-glicina-aspartato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TLN1	Toxolisina 1
TLN1m	Toxolisina 1 madura
TM	TiterMax
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VP	Vacuola parasitófora

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que infecta a organismos de sangre caliente. La infección inicia con la ingesta de ooquistes esporulados liberados en las heces de gatos infectados o por la ingesta de carne mal cocida contaminada con quistes tisulares. Después de la infección, los parásitos se diferencian taquizoítos (Taks) que atraviesan el epitelio intestinal y se distribuyen por todo el cuerpo. La respuesta inmunitaria contra *T. gondii* es de tipo celular y humoral. Cuando *T. gondii* alcanza la lámina propia, los macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células dendríticas, participan en la producción de anticuerpos (Ac) y de citocinas. Proteasas excretadas/secretadas por *T. gondii*, modifican a las uniones intercelulares de células epiteliales, facilitando su diseminación tisular. Es posible considerar a las proteasas, como antígenos (Ag) de interés en la búsqueda de estrategias contra la toxoplasmosis. Se han utilizado parásitos vivos, muertos, atenuados, proteínas purificadas y recombinantes y ADN de *T.gondii*. Sin embargo, ninguna de las vacunas ha inducido una inmunización exitosa contra el parásito, por lo que sigue siendo objeto de estudio. En nuestro grupo de trabajo recientemente se han identificado proteínas inmunogénicas del citoesqueleto con efecto inmunoprotector, incluyendo a la Toxolisina 1 (TLN1). TLN1 es una metaloproteasa de 250 KDa (pro-proteína) y de 181 KDa (proteína madura), localizada en roptrias y secretada en la invasión de *T. gondii*. En el presente trabajo, se evaluó la inducción de la respuesta inmunitaria humoral y celular por la inmunización con péptidos inmunogénicos de TLN1 madura (TLN1m), así como su efecto en inmunoprotección en un modelo murino de toxoplasmosis aguda. Los péptidos sintetizados se inocularon en grupos de ratones evaluando la respuesta humoral a partir de los niveles séricos de IgM e IgG y la respuesta celular por medio de la determinación del patrón de citocinas como interleucina (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y del TNF- α . Se evaluó la supervivencia de los animales inmunizados ante el reto con dosis letales de Taks. Adicionalmente se realizó la localización de TLN1m en Taks extracelulares e intracelulares y se confirmó la inmunoreactividad de los Ac generados por medio de WB.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects warm-blooded organisms, including humans. The infection begins with the ingestion of sporulated oocysts released in the feces from infected cats or by the ingestion of undercooked meat contaminated with tissue cysts. After infection, the parasites differentiate into tachyzoites that traverse the intestinal epithelium and are distributed throughout the body. The immune response against *T. gondii* is cellular and humoral. When *T. gondii* reaches the lamina propria, macrophages, neutrophils, lymphocytes, and dendritic cells participate in the production of Ab and cytokines. Proteases excreted/secreted by *T. gondii*, modify the intercellular junctions of epithelial cells, facilitating their tissue dissemination. It is possible to consider proteases as antigens of interest in the search for strategies against toxoplasmosis. To date there are no vaccines available against toxoplasmosis. Vaccines with live, attenuated, killed parasites, recombinant proteins, DNA and nanoparticles have been evaluated, although the results have been partially successful. Our group reported an immunoprotective effect of *T. gondii* cytoskeleton proteins in a model of toxoplasmic encephalitis. Additionally, in the doctoral work of Lagunas-Cortés, immunogenic proteins were identified in the cytoskeleton, including Toxolysin 1 (TLN1). TLN1 is a zinc metalloprotease M16A secreted in the invasion of *T. gondii* and located in rhoptries with a MW of 250 KDa (pro-protein) and 181 KDa (mature protein). In the present work, the induction of the humoral and cellular immune response by immunization with TLN1 immunogenic peptides was evaluated, as well as its effect on immunoprotection in a murine model of acute toxoplasmosis. The peptides synthesized by GeneScript were inoculated into groups of mice evaluating the humoral response from the serum levels of IgM and IgG and the cellular response by determining the pattern of cytokines such as interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α . The survival of animals immunized against challenge with lethal doses of tachyzoites was evaluated. Additionally, the localization of TLN1m in extracellular tachyzoites was made and the immunoreactivity of the Ac generated by means of WB was confirmed

Introducción

T. gondii es un parásito intracelular obligado con distribución cosmopolita que invade a todas células nucleadas de animales de sangre caliente (Sullivan & Jeffers, 2012; Black et al., 2000). Este parásito requiere ubicarse al interior de una VP para su proliferación, ya que depende de la célula hospedera para obtener varios nutrientes esenciales, ya que no los adquiere de su propia vía metabólica (Coppens et al., 2000).

Cuando *T. gondii* infecta felinos, generalmente por la ingesta de roedores o aves infectadas, se lleva a cabo la reproducción sexual del parásito al interior de los enterocitos intestinales entre la forma masculina denominada microgametocito y la femenina denominada macrogametocito, por esta razón los felinos son considerados como hospederos definitivos (Black et al., 2000). El macrogametocito es fertilizado por el microgametocito que es biflagelado, dando lugar a la formación de un ooquiste que es excretado en forma no esporulada (no infectiva) en las heces del gato, contaminando fuentes de agua, pastos y hortalizas, etc. En un periodo de 7-10 días bajo condiciones de humedad y temperatura templada, se lleva a cabo la maduración del ooquiste generando en su interior 8 esporozoítos altamente infectivos. La desecación destruye al ooquiste. Los animales de granja o el humano se infectan al ingerir los ooquistes maduros, y por el proceso digestivo, se rompe la pared quística liberándose los esporozoítos que invaden a los enterocitos intestinales para diferenciarse rápidamente a Taks que es una forma altamente invasiva y dinámica. En estos hospederos, los Taks proliferan a través de una reproducción asexual conocida como endodiogenia y al interior de una vacuola parasitófora (VP). Los Taks pueden dividirse desde las 4 horas, saturando el espacio intravacuolar lo que genera finalmente la ruptura de la célula con la liberación de los parásitos, a estos se les conoce como hospederos intermediarios. Desde el intestino, el parásito inicia su diseminación tisular para distribuirse por todo el organismo (Dubey, 1994; Munoz et al., 2011). La presencia del parásito activa la respuesta inmunitaria del hospedero, con la producción de anticuerpos específicos,

activación de células efectoras y liberación de citocinas. La presencia de IFN- γ y del TNF- α , permite que los parásitos se diferencien al interior de la VP en bradizoítos y se transformen las células invadidas en quistes tisulares. Los quistes tisulares, se encuentran distribuidos en todos los tejidos, pero principalmente en músculo, cerebro y ojo, y en el embarazo, en la placenta y en el feto (Dubey et al., 1998). La infección tanto de los hospederos intermediarios como de los definitivos también puede llevarse a cabo por el consumo de carne cruda o mal cocida contaminada con quistes tisulares. A las 18 h post infección oral del parásito, estos se detectan en los ganglios linfáticos mesentéricos, y en la circulación sanguínea a las 24 h (Betancourt et al., 2019). Existen dos formas en las que se desarrolla la diseminación parasitaria por el organismo, la primera consiste en la invasión con proliferación y ruptura de la célula infectada, luego de lo cual atraviesan las barreras biológicas por la liberación de proteasas que alteran a los endotelios y epitelios, permitiendo el flujo del parásito. La segunda se refiere al comportamiento migratorio en los epitelios y endotelios, mediante la invasión y su transporte al interior de células fagocíticas como células dendríticas (CD), macrófagos y neutrófilos (Aliberti et al., 2002).

La prevalencia de toxoplasmosis en la población está relacionada con su ubicación geográfica, a nivel mundial se han reportado más de mil millones de individuos infectados (Hoffmann et al., 2012). Específicamente en Estados Unidos y en Reino Unido se estima que un porcentaje del 16 al 40 % de la población se encuentra infectada, mientras que en México representa aproximadamente un intervalo del 34-65 % de prevalencia de Ac dependiendo de la zona geográfica, y con la mayor prevalencia en las zonas costeras del país (Hill et al., 2005; Velasco et al., 1992)

En humanos inmunocompetentes, la toxoplasmosis, ocasiona síntomas parecidos a los de una gripa normal con dolor muscular y fiebre transitoria. En contraste, en personas inmunocomprometidas puede causar ceguera y encefalitis con muerte del individuo. Adicionalmente, en mujeres embarazadas y dependiendo del periodo del embarazo en el cual se infecta, puede ocasionar desde coriorretinitis en el producto, daño cerebral y malformaciones en el feto, e incluso aborto. Es

posible que nazcan bebés asintomáticos, sin embargo, en la adolescencia pueden manifestar diversas alteraciones neurológicas (Barragan & David Sibley, 2002). La parásitosis en mujeres embarazadas se conoce como toxoplasmosis congénita.

La respuesta inmune del hospedero es compleja, e incluye respuestas inmunitarias celulares y humorales comenzando cuando los esporozoítos o bradizoítos invaden los enterocitos. En el momento que *T. gondii* alcanza la lámina propia, las células inmunes como macrófagos, neutrófilos, linfocitos y CD participan en las respuestas inmunitarias, especialmente en la producción de Ac, citocinas y en la presentación de antígenos (Ag) (Sher et al., 2017). La respuesta inmunitaria celular tiene un papel fundamental en el control de la infección crónica (con bradizoíto dentro de quistes tisulares) y aguda (con Taks en proliferación) por *T. gondii*. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ son responsables de la inmunidad protectora, mediante la producción de interleucina -2 (IL-2) e IL-12. Estas citocinas son necesarias para la regulación de la producción de IFN- γ (Aliberti, 2005). Otras citocinas, como IL-4 e IL-10, tienen una función vital en el equilibrio de las respuestas inmunitarias (Filisetti & Candolfi, 2004; Wagner et al., 2015). Por otra parte, los Ac también tienen un papel importante en el control de la infección, bloqueando la adhesión del parásito a la célula hospedera y generando la muerte de los Taks recubiertos con Ac o con factores del complemento por fagocitosis por macrófagos activados (Kang et al., 2000). Estudios recientes de nuestro grupo, han reportado que proteasas excretadas/secretadas por *T. gondii*, modifican a las uniones intercelulares de células epiteliales, alterando la migración a través de la barrera epitelial (Ramírez-Flores et al., 2019). Por lo que es posible que las proteasas puedan considerarse como componentes antigénicos de interés en la búsqueda de estrategias contra la toxoplasmosis.

El tratamiento contra la toxoplasmosis ha evolucionado de tal forma que hay varias alternativas farmacológicas disponibles. Aunque la combinación exitosa de la pirimetamina, un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, junto con la sulfadiazina, una sulfonamida que inhibe a la sintetasa del ácido dihidrofólico, se sigue utilizando ampliamente, y con éxito en encefalitis toxoplásmica, este tratamiento no es recomendado en mujeres embarazadas. La combinación de trimetropin con

pirimetamina ha mostrado mejores resultados respecto a la mortalidad en pacientes con VIH. En mujeres embarazadas se ha utilizado combinaciones de sulfonamidas con espiramicina, y en recién nacidos la espiramicina (Galván-Ramírez et al., 2017). Otros fármacos que se han estado evaluando en modelos murinos de toxoplasmosis incluyen a la dapsona, las combinaciones de claritromicina con minociclina, la azitromicina con pirimetamina y la azitromicina con sulfadiacina, la atovaquinona con pirimetamina, y atovaquinona con sulfadiacina (Galván-Ramírez et al., 2017)

La inmunoterapia también ha sido utilizada como una alternativa terapéutica en las que se han usado a nivel experimental y con éxito en modelos murinos de toxoplasmosis incluyen a, IFN- γ , IL-2, TNF e IL-1. La administración de IFN- γ en combinación con antibióticos, presenta una actividad sinérgica en toxoplasmosis murina con roxitromicina, pirimetamina, clindamicina y azitromicina (Galván-Ramírez et al., 2017).

A la fecha no hay vacunas disponibles contra la toxoplasmosis en humanos. En los últimos años se han propuesto protocolos de inmunización contra *T. gondii* que han incluido el uso de parásitos vivos, atenuados, muertos, proteínas recombinantes y ADN aunque los resultados han sido exitosos parcialmente.

En el desarrollo de una vacuna exitosa, deben considerarse aspectos tales como el tipo de antígeno o inmunógeno, la ruta de administración, así como del adyuvante, que en conjunto puede influir en la respuesta inmunitaria inducida. Específicamente, Titermax (TM) se ha reportado como un adyuvante menos tóxico y más eficaz, que potencializa la capacidad antigénica del péptido mediante el acarreador, el cual contiene tres ingredientes esenciales: un nuevo copolímero en bloque, CRL-8300, escualeno (un aceite metabolizable) y un mono oleato de sorbitán (Bennett et al., 1992).

A la fecha, solo se ha comercializado la vacuna llamada ToxoVax, la cual es producida por Intervet Schering-Plough Animal Health, y que se caracteriza por ser una vacuna atenuada de la cepa S48 de *T. gondii* que ha controlado de manera exitosa la infección en ovejas en países como Escocia. Aunque ToxoVax ha disminuido la tasa de abortos, no ha erradicado la infección por completo. Además de ser es un producto caro, siempre existe la posibilidad de la reversión y

transformación de la cepa S48 en una forma patógena, por lo que no es apropiada para el uso humano (Buxton, 1993; Wilkins, 1988)

Dentro de los estudios referentes al desarrollo de alternativas inmunoprotectoras contra la toxoplasmosis, se destaca el trabajo realizado por nuestro grupo, el cual reportó un efecto inmunoprotector de proteínas del citoesqueleto de *T. gondii* en un modelo de encefalitis toxoplásmica (Martínez-Gómez et al., 2009). Adicionalmente, está el trabajo realizado por Lagunas-Cortes, quién en su tesis de doctorado (en proceso), identificó diversas proteínas inmunogénicas en la fracción de citoesqueleto del parásito incluyendo a la Toxolisina 1 (TLN1). TLN1 es una metaloproteasa de zinc M16A funcional secretada durante la invasión de *T. gondii* con 50 % de homología a la enzima degradativa de insulina isoforma 3 e isoforma X2 en el caso de humano y con la enzima degradativa de insulina isoforma X2 de ratón con un 48 % de identidad. TLN1 tiene un peso molecular (PM) de 250 KDa (pro-proteína) y 181 KDa (madura), debido a que sufre un corte inusual en el C-terminal antes de que se dirija a las roptrías y el cual es importante para la correcta clasificación en el organelo prematuro. Además, se ha reportado que no cataliza su propia maduración proteolítica y tanto su extremo N-terminal como su C-terminal se asocian en un complejo resistente a los detergentes y forman multímeros (Hajagos et al., 2012).

Con base en lo anterior, el presente trabajo se enfocará al estudio de péptidos de la TLN1m en su capacidad de inducción de la respuesta inmunitaria y su efecto inmunoprotector en un modelo murino de toxoplasmosis aguda.

Generalidades

Taxonomía

T. gondii se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma. Dominio: Eukaryota, Reino: Protista, *Phylum*: Apicomplexa, Clase: Conoidasida, Orden: Eucoccidiorida, Familia: Sarcocystidae, Género: *T.*, Especie: *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* ID: 5811 (NCBI 2022).

Formas parasitarias de *T. gondii*

Existen tres estadios parasitarios infecciosos durante el ciclo de vida de *T. gondii*: 1. el taquizoíto de alta virulencia y de rápida movilidad e infectividad; 2. el bradizoíto, de lenta movilidad y proliferación, localizado dentro de quistes tisulares; y 3. el esporozoíto, presente en el interior de ooquistes maduros y que son excretados en las heces de gatos infectados (Dubey, 1998). De los tres estadios, el taquizoíto, es el más estudiado, dado que es la forma más virulenta y de fácil mantenimiento en el laboratorio tanto por infección de cultivos de células de mamífero como por infección intraperitoneal en un modelo murino.

Taquizoíto

El taquizoíto, es la forma infectiva asexual de *T. gondii*, tiene la capacidad de invadir a todas las células nucleadas de los tejidos de hospederos intermediarios y de hospederos definitivos, así como a eritrocitos, aunque no prolifera en ellos (Dubey, 1998).

El taquizoíto tiene forma de media luna, con un tamaño aproximado de 6 a 8 micras (Otify, 2012), su extremo anterior o apical es característica del *Phylum* Apicomplexa ya que contiene organelos de gran importancia involucrados en la adhesión y penetración a la célula hospedera, como el conoide, los micronemos y las roptrías (6-8 roptrías). En su extremo posterior, se ubica principalmente el núcleo rodeado por el retículo endoplásmico y gránulos densos que participan en la formación de la VP.

Adicionalmente, el taquizoíto contiene organelos como: anillos polares, películo, un citoesqueleto subpelicular formado por un conjunto de 22 microtúbulos subpeliculares organizados desde el anillo polar así como una red submembranal de filamentos que envuelve a todo el parásito, microporos, gránulos de amilopectina (escasos o ausentes), apicoplasto y una única mitocondria alargada localizada cerca del núcleo (Dubey, 1998). **(Fig. 1)**

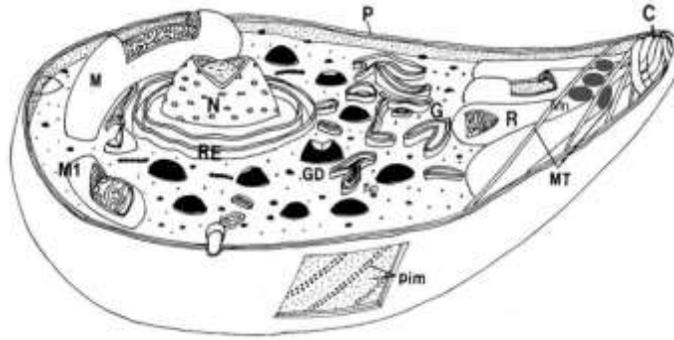


Figura 1. Diagrama de un taquizoíto de *T. gondii*. P, membrana plasmática; C, conoide; MT, microtúbulos; Mn, micronemos; R, roptrias; N, núcleo; pim, partículas intermembranales; RE, retículo endoplásmico; Ap, apicoplasto; GD, gránulos densos y M, mitocondria. Figura de R. Mondragón. Tomada de Muñiz y Mondragón, 2009.

Bradizoíto

El bradizoíto, es la forma de lenta reproducción de *T. gondii* y se localiza dentro de los quistes tisulares los cuales están distribuidos en diferentes tejidos, pero son más comunes en músculo (corazón), neuronas (cerebro) y ojo. El quiste tisular mide entre 50 a 70 micras y contiene aproximadamente entre 1000 y 2000 bradizoítos que poseen forma de media luna con un tamaño aproximado de 7 x 1.5 μm (Ferguson & Hutchison, 1987; Gómez de León et al., 2014)

Dentro de las características de los bradizoítos se encuentran la presencia de un núcleo situado hacia el extremo posterior; el complejo apical que es el responsable de la invasión a la célula hospedera, y que está formado por numerosos gránulos de amilopectina, anillo apical 1 y 2, conoide, membrana interna, micronemo (abundantes y con una distribución submembranal), plasmalema, roptrias (1-3 más electrodensas), microtúbulo subpelicular y anillos polares 1 y 2, (Dubey, 1998; Gómez de León et al., 2014; Weiss & Kim, 2000); (**Fig.2**).

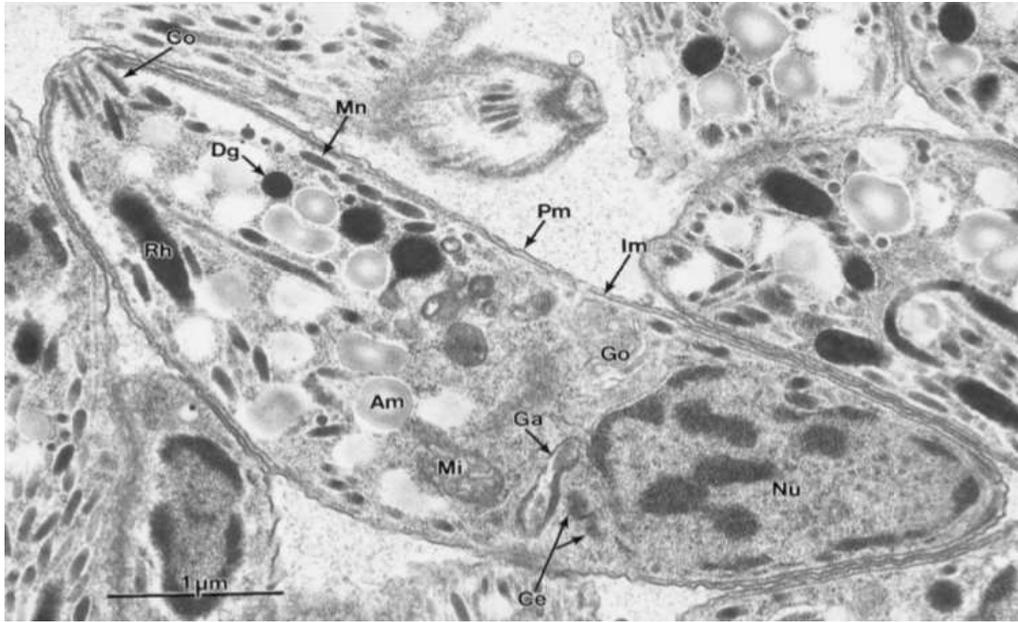


Figura 2. Bradizoito de *T. gondii* en quiste. Am, gránulos de amilopectina; Ce, centriolos; Co, conoide; Dg, granulo denso; Ga, Golgi adjunto (apicoplasto); Vaya, Golgi complejo; Im membrana interna; Mi, mitocondria; Mn, micronema; Nu, Núcleo; Pm, plasmalema; Rh, roptría. (Dubey et al., 1998)

Esporozoito

Los esporozoítos son el tercer estadio infeccioso de *T.gondii*, y están localizados al interior de ooquistes maduros. El ooquiste al ser excretado en las heces de los hospederos definitivos esporula después de dos o cinco días, generando una forma quística altamente infecciosa que contiene en su interior ocho esporozoítos que miden aproximadamente 6 a 8 micras x 2 micras. Estructuralmente el esporozoíto se caracteriza por tener una mayor presencia de micronemos, roptrías y gránulos de amilopectina y tener un núcleo sub-terminal. (Fig. 3); (Dubey et al., 1998).

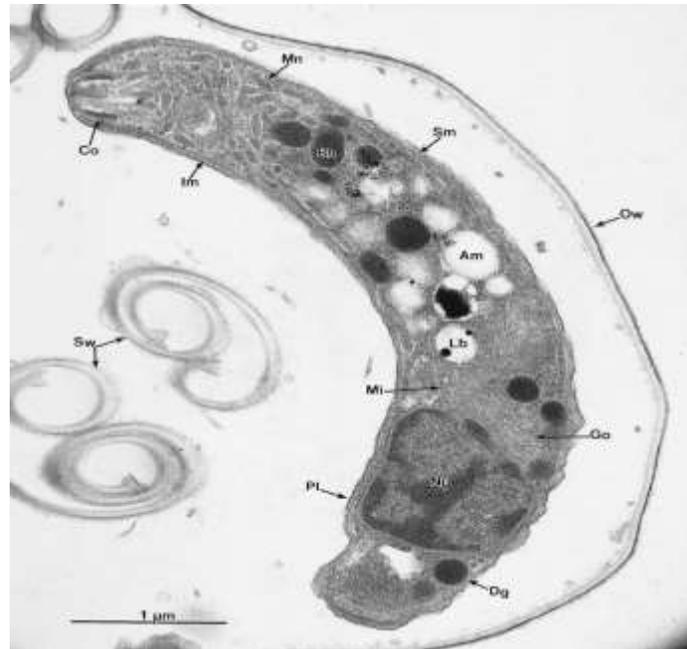


Figura 3. Esporozoíto de *T. gondii* recién excretado dentro de un ooquistes. Am, amilopectina; Co, conoide; Dg, gránulo denso de electrones; Go, complejo de Golgi; Im, complejo de membrana interna; Lb, cuerpo lipídico; Mi, mitocondria; Mn, micronema; Ow, pared del ooquistes; Pl, plasmalema; Rh, rohoptry; Sm, microtúbulo subcelular; Sw, pared del esporozoite (Dubey et al., 1998)

Organelos secretores

T. gondii contiene tres organelos secretores; las roptrías, los micronemos y los gránulos densos (Black et al., 2000; Carruthers & Sibley, 1997; Kim, 2004; Leriche & François Dubremetz, 1991). Los micronemos y las roptrías están involucrados en la invasión celular ubicados preferentemente en la parte apical del parásito (Carruthers & Sibley, 1997; Leriche & François Dubremetz, 1991). Los gránulos densos participan en el desarrollo intracelular del parásito, en la biogénesis de la VP y en la modificación de la expresión génica de la célula hospedera, distribuidos en el citoplasma del parásito (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). De manera general, estos organelos se deben secretar de manera secuencial para realizar la invasión y la proliferación del parásito en la célula blanco (Carruthers & Sibley, 1997).

Micronemos

Los micronemos son pequeños organelos vesiculares con forma ovoide de 30 nm de diámetro ubicados predominantemente en el extremo apical, contienen un conjunto de proteínas denominadas como proteínas MIC, que participan al inicio del proceso de invasión ya que permiten tanto la adhesión del parásito a la célula blanco como la motilidad de deslizamiento ejerciendo un efecto de lubricación intermembranal (Joiner & Francois, 1993; Carruthers & Sibley, 1997). Se ha reportado que este tipo de proteínas son secretadas por un incremento de calcio intracelular y puede inducirse *in vitro* y en ausencia de células hospedero utilizando ionóforos para calcio como la ionomicina (Carruthers et al., 1999). Se han descrito al menos 13 proteínas MIC que incluyen proteínas tanto solubles como transmembranales que presentan diferentes dominios de adhesión. Las proteínas MIC1, MIC3 y MIC4 tienen un dominio extracelular adhesivo que permite unir la superficie del parásito con la membrana de la célula blanco (Carruthers et al., 2000; Garcia-Re et al., 2000). La eliminación de MIC1 reduce considerablemente la invasión del *T. gondii* en fibroblastos, sugiriendo que es necesaria esta proteína para dicho proceso (Cérède et al., 2005). MIC2 es movilizada desde los micronemos para ocupar la superficie apical del parásito al momento de la invasión celular para posteriormente re-localizarse en el extremo posterior del parásito al momento de la interiorización de la célula hospedera, esta proteína puede ser recuperada en sobrenadantes de Taks expuestos a ionóforos, sugiriendo su liberación por el parásito (Carruthers et al., 1999). Además, se ha reportado que la expresión de las proteínas MIC, depende del estadio en que se encuentre el parásito, por ejemplo, MIC6 y MIC8 se expresan en Taks, mientras que los genes de MIC7 y MIC9 son expresados predominantemente en bradizoítos (Meissner & Soldati 2000).

Roptrías

Las roptrías son organelos secretores en forma de sáculos alargados con dos aparentes sub-compartimentos, uno con apariencia alveolada y un delgado ducto

insertado al interior del conoide (Gómez de León et al., 2014; Tilney, 1998) El extremo anterior de las roptrías se caracteriza por ser electrodensos visto al microscopio electrónico, mientras que la porción posterior contiene una serie de componentes membranosos empacados en forma vesicular (Porchet-Hennere & Nicolas, 1983). Dentro de las roptrías se encuentran las proteínas RON (derivadas del cuello), y las ROP (derivadas de la parte abultada posterior). Adicionalmente se sabe que también hay lípidos en el contenido de las roptrías como colesterol y fosfatidilserinas que podrían participar en la formación de la VP. (Besteiro et al., 2008; Foussard et al., 1991; Leriche & François Dubremetz, 1991).

Gránulos densos

Los gránulos densos son pequeños organelos esferoidales electrodensos que miden aproximadamente 200 nm de diámetro, ubicados por todo el cuerpo del parásito (Cesbron-Delauw, 1994; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). La cantidad de gránulos densos tiene cierta variación de acuerdo con el estadio del parásito, se encuentran más predominantes en el taquizoíto a diferencia de los bradizoítos y esporozoítos. (Mercier et al., 2005) Las proteínas secretadas por los gránulos densos son denominadas como GRA, NTPasas, TgPI (inhibidores de proteasas), cilofilina y otras enzimas (Cesbron-Delauw, 1994; Mercier et al., 2005). A la fecha, se han estudiado al menos 40 proteínas GRA (GRA1-gRA40) (Nadipuram et al., 2016). Las proteínas GRA 1, 2, 4 y 6 son secretadas en el espacio intravacuolar dando origen a la red vesículo-tubular, la cual se extiende desde la membrana del parásito, hasta la VP llenando el lumen intravacuolar.

Por otra parte, se han propuesto que las proteínas GRA 3, 5, 7,8, 10 y 14 son proteínas que constituyen parte de la membrana de la VP, confiriendo cierta protección a los parásitos por medio de la acidificación y fusión lisosomal, de tal manera que los parásitos no son degradados por los mecanismos de defensa de la célula hospedera (Joiner et al., 1990; Sibley, 1985).

Mecanismo de invasión celular de *T. gondii*

T. gondii posee la capacidad de infectar a todas las células nucleadas, incluyendo células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) y no fagocíticas (epiteliales, de tejido conectivo, muscular, etc.); (Dubey, 2008, 2009). Por ello requiere de estrategias para invadir, replicarse y exteriorizarse. Se han descrito dos tipos de mecanismos: la invasión pasiva y la invasión activa, y se caracterizan en función del tipo de célula hospedera que infectan (Morisaki et al., 1995; Sibley et al., 1985).

Mecanismo de invasión pasiva

La invasión pasiva es el tipo de mecanismo que el parásito utiliza para invadir células con capacidad fagocítica, como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas y ocurre en un tiempo aproximado de dos a 15 min. (Morisaki *et al.*, 1995). En la invasión pasiva, los fagocitos son las células efectoras y da inicio con la adhesión del parásito a la membrana del fagocito mediada por opsoninas que posteriormente interactúan con los receptores apropiados en la superficie del fagocito, como son las lectinas que pueden intervenir en la reorganización de microfilamentos de actina y la formación de filopodios que rodean al parásito para finalmente introducirlos en un fagosoma. El fagosoma, es modificado en la composición de su membrana por componentes secretados por el parásito transformándolo así en una VP la cual no es fusogénica con lisosomas (Jones et al., 1972; Morisaki *et al.*, 1995; Sibley et al., 1985; Galván y Mondragón, 2001) protegiéndose así el parásito de su destrucción por la digestión enzimática. Una vez dentro de la VP, el parásito induce una desregulación metabólica sobre la célula hospedera, que le permite replicarse asexualmente por el proceso conocido como endodiogenia para ser exteriorizado con la muerte consecutiva de la célula (**Fig. 4**) (Galván y Mondragón, 2001).

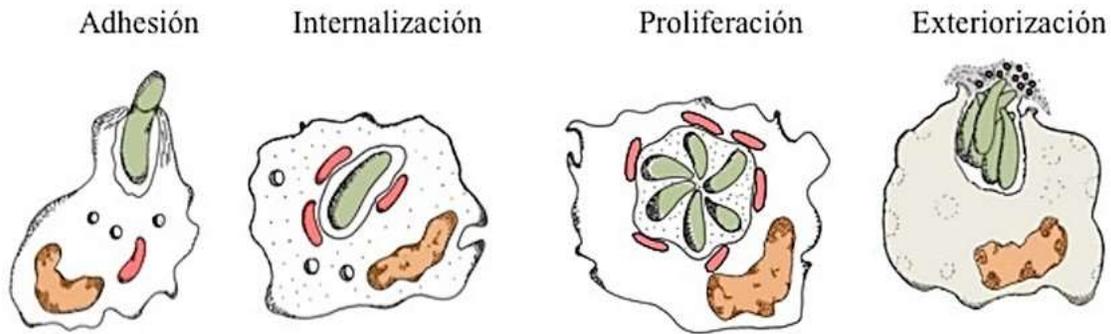


Figura 4. Proceso de invasión pasiva de *T.gondii*. El parásito se adhiere a los macrófagos, neutrófilos y/o células dendríticas. Estas células organizan prolongaciones en la membrana que rodea a los Taks; seguida de la internalización de los parásitos en un fagosoma, el cual es modificado en la composición de su membrana por componentes secretados por *T.gondii* transformándolo así en una VP evitando su destrucción y posterior proliferación del parásito intravacuolar por endodiogenia para ser exteriorizado con la muerte consecutiva de la célula. Tomada de Galván y Mondragón, 2001.

Mecanismo de invasión activa

La invasión activa por Taks involucra una serie de eventos (**Fig. 5**): Iniciando con la adhesión del parásito sobre la membrana plasmática de la célula hospedera, gracias a proteínas de los micronemos que son secretadas (Carruthers y Sibley, 1997; Huynh et al., 2003). En la siguiente etapa, previo a la penetración, el parásito elige un sitio blanco, protruye el conoide, y secreta el contenido de las roptrías, generando una horadación en la membrana de menos de 1 μm , por donde el parásito se internalizará a través de movimientos tipo tornillo (Dubremetz *et al.*, 1998; Werk, 1985) generando una invaginación membranal y una vesícula endocítica que aloja al parásito. Inmediatamente después, se secretan lípidos y proteínas desde los gránulos densos para modificar esa vesícula endocítica en un compartimento que le conferirá protección al parásito, esa nueva estructura se conoce como VP (Sibley *et al.*, 1995); A nivel intravacuolar, el parásito se replica mediante un proceso asexual llamado endodiogenia (Sibley *et al.*, 1995). Cuando los parásitos saturan el espacio intravacuolar, se exteriorizan, lisando a la célula e infectando a células vecinas (Radke & White, 1998).

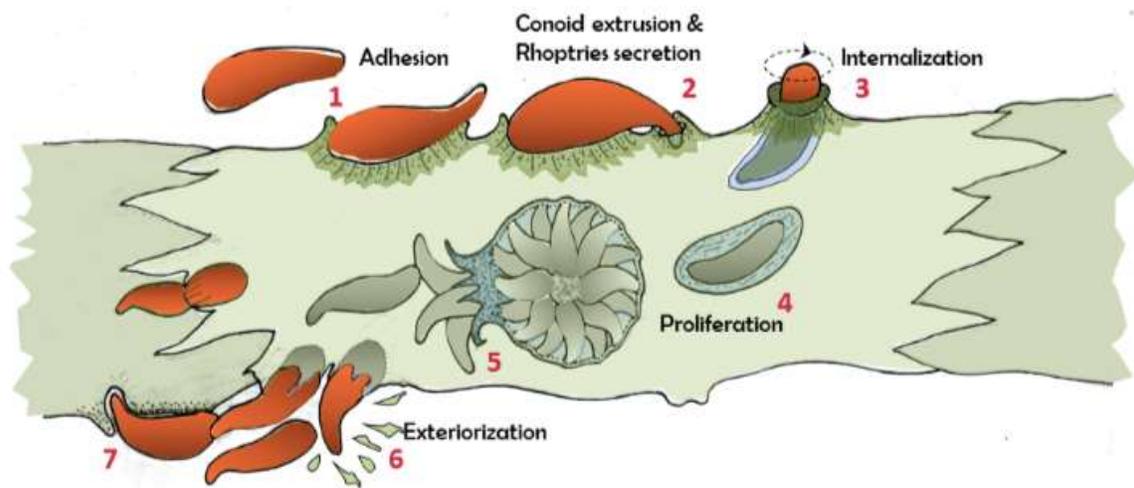


Figura 5. Proceso de invasión activa de *T. gondii*. 1) El parásito se adhiere a la superficie de la célula y utiliza su motilidad basada en actina-miosina para invadir la célula hospedera (secreción de proteínas MIC) 2) selección de un sitio específico, protrusión del conoide sobre la membrana de la célula hospedera y secreción del contenido de las roptrias, 3) internalización mediante movimientos rotativos, 4) generación de la VP, secreción de proteínas GRA, 5) división por endodiogenia y 6) exteriorización e 7) infección de otra célula. Tomado de Castro-Elizalde, 2013; Cortesía de R. Mondragón, 2011.

Respuesta innata

Después de la infección de los hospederos intermediarios, el *T. gondii* evade los mecanismos innatos de defensa del intestino delgado y atraviesa la lámina propia directamente (Barragan & David Sibley, 2002). Los enterocitos tienen la capacidad de secretar citocinas una vez infectados por el parásito permitiendo reclutar CD en la lámina propia, donde serán invadidas por el parásito, promoviendo la diseminación de la infección a lugares distantes. Adicionalmente *T. gondii* tiene la capacidad de secretar/excretar diversas proteínas que permitirán el reconocimiento del parásito por las CD y macrófagos, que producen IL-12 a partir del reconocimiento del parásito por los receptores tipo Toll (TLR), lo que desencadena la síntesis de IFN- γ por parte de las células NK, NKT y T (Courret et al., 2006).

Respuesta humoral

El papel de los Ac y de los factores séricos del complemento en la eliminación de *T. gondii* sigue siendo incierto. Sin embargo, la respuesta inmunitaria humoral también participa contra el parásito. Los Ac son la primera línea de defensa, los cuales se producen en respuesta a la infección por *T.gondii*, y en individuos con una infección crónica pueden mantenerse títulos altos de Ac contra *T. gondii* por toda la vida (Suzuki, 2002.). Los Ac y los factores del complemento, actúan sobre parásitos extracelulares, liberados por la lisis de células infectadas, lisándolos a partir de la vía clásica del complemento o al opzonizarlos, activar su destrucción por macrófagos circundantes. Se ha reportado que, aunque en ratones con deficiencia de Ac, no se afectó el desarrollo de la infección aguda, sin embargo, sí desempeñan un papel en la limitación de la replicación del taquizoíto en los ratones, especialmente en el pulmón y en el cerebro (Kang et al., 2000). La IgM, es la primera inmunoglobulina que se incrementa desde el segundo día posterior a la infección, y su detección indica una infección aguda (Filisetti & Candolfi, 2004). Actualmente se sabe que, en algunos casos, la IgM puede detectarse en suero hasta un año después de la infección (Montoya & Remington, 2008). Después de la respuesta primaria, los niveles de IgM descienden y se presenta un aumento de los niveles séricos de IgG (Filisetti & Candolfi, 2004) ver **Fig. 6**.

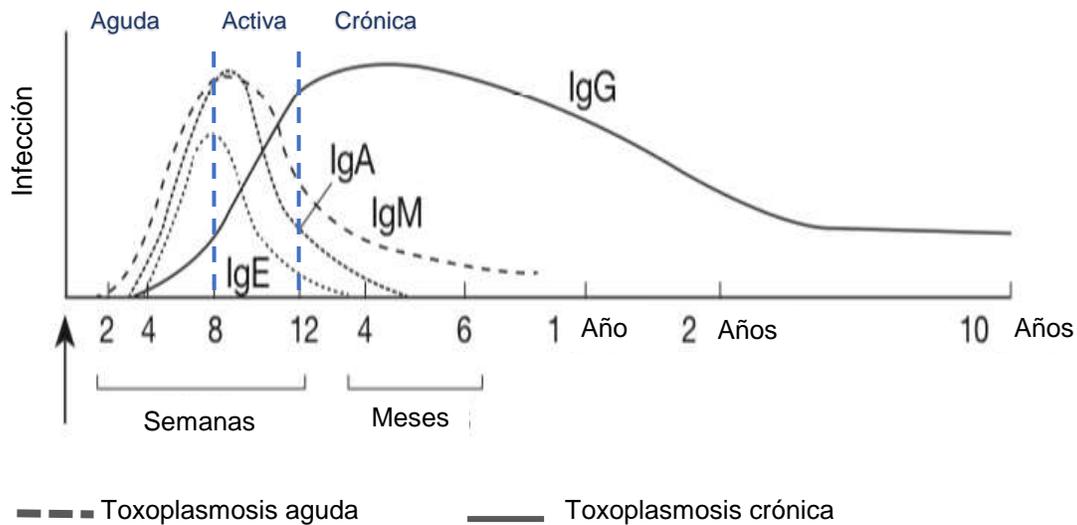


Figura 6. Dinámica de la respuesta humoral durante la infección por *T. gondii*. Una vez iniciada la infección, el primer Ac en aparecer es la IgM, la presencia de esta inmunoglobulina se relaciona con la fase aguda de la enfermedad, al finalizar esta fase, los niveles de IgM disminuyen y son paulatinamente remplazados por el aumento IgG, que persisten a lo largo de años y se relacionan con la fase crónica de la enfermedad. (Tomado de: Joynson y Wreghitt 2001).

Adicionalmente, la inmunoglobulina IgM es la principal activadora del complemento y debido a su estructura, es un excelente aglutinante que posee niveles altos de toxicidad y su blanco principal son las proteínas ubicadas en la superficie del parásito (Filisetti & Candolfi, 2004). Por otra parte, la IgG también tiene actividad citotóxica y opsonizadora, debido a que los macrófagos presentan receptores para la porción Fc de las IgG (Martin et al., 1998) y juega un papel principal en proteger al feto ante la infección, ya que es capaz de atravesar la barrera placentaria (Filisetti & Candolfi, 2004). Adicionalmente a la producción de Ac por los linfocitos B, se ha reportado que también éstas células tienen la capacidad de potencializar la producción de IFN- γ por las células T CD4+ y CD8+ durante el curso de la respuesta inflamatoria Th1 contra la infección con *T.gondii* (Menard et al., 2007).

Respuesta celular

La respuesta celular requiere del procesamiento y presentación del Ag para que ocurra la activación de la respuesta inmunitaria. En el caso de *T. gondii*, se han reportado dos vías de activación de la respuesta inmunitaria celular, la endógena y la exógena.

La **vía endógena** inicia con la secreción de proteínas de roptrias, en parásitos intracelulares, las cuales son procesadas en proteosoma, y de ahí son dirigidas al retículo endoplásmico, donde tendrán un segundo procesamiento por la aminopeptidasa ERAP, posteriormente ocurre el ensamblaje al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, y su translocación a la membrana plasmática de la célula invadida donde serán presentados a los linfocitos T CD8+ que actúan como un mediador clave de la respuesta inmunitaria adaptativa al parásito. Los linfocitos T CD8+ proporcionan protección ante desafíos con *T. gondii* (Parker C W Roberts & Akhander, 1991; Suzuki & Remington, 1988). Adicionalmente, son la principal población implicada en el control de la infección crónica y la prevención de la infección reactivada en el cerebro (Gazzinelli et al., 1992; Wang et al., 2005); (**Fig. 7A**).

Por otra parte, la **vía exógena** comienza con la endocitosis de Ag exógenos que el parásito libera como es el caso de la profilina una proteína citoplásmica asociada a los filamentos de actina, la cual es secretada/excretada por *T.gondii* y reconocida por las CD. En esta vía lisosomal las proteínas son degradadas y ensambladas al complejo mayor de histocompatibilidad clase II, para dirigirse a la superficie celular donde será reconocido por los receptores tipo integrina de los linfocitos T CD4+ inmaduros promoviendo la activación de Células Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (**Fig. 7B**)

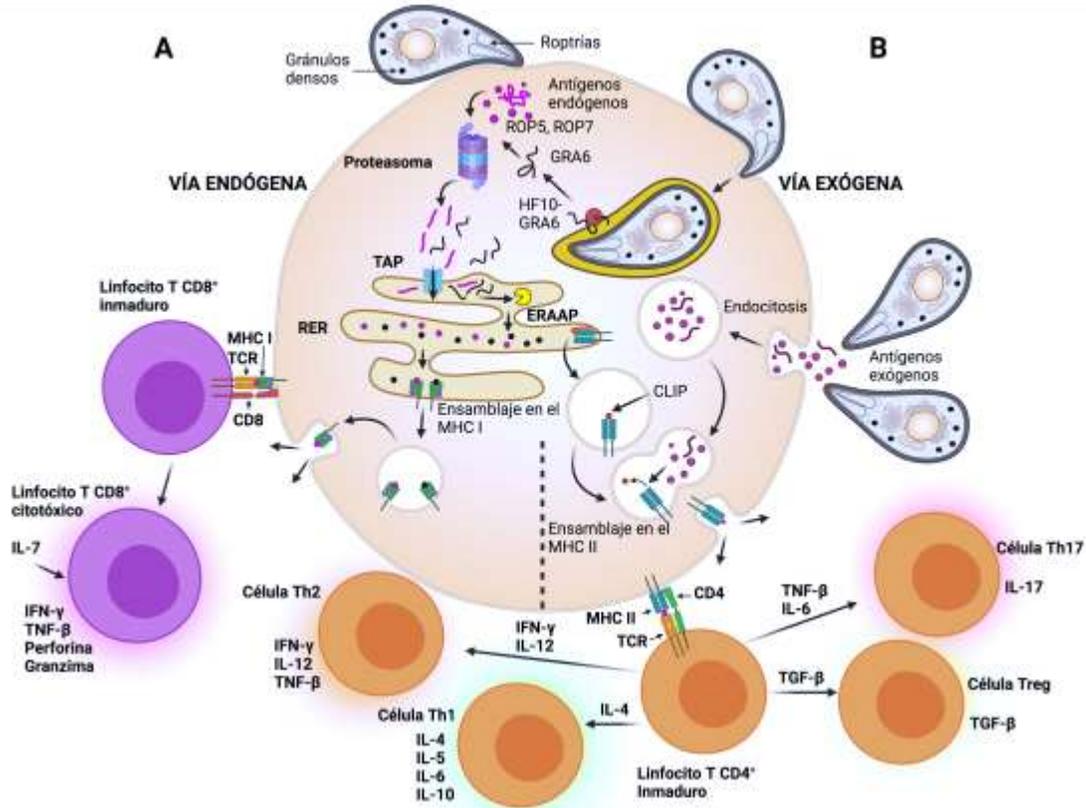


Figura 7. Activación de la respuesta celular ante la infección por *T.gondii*. Para el procesamiento y presentación del Ag a través de los complejos MHC I y MHC II se requieren dos vías. A) La vía endógena y B) la vía exógena para la producción de diferentes citocinas. Cortesía de Lagunas et al., 2022

Papel de las citocinas durante la infección

El equilibrio entre la respuesta Th1 y Th2 se da a partir de las células secretoras de las citocinas proinflamatorias IFN- γ , IL-2 e IL-12, las cuales promueven la transformación en células Th1 y las células que liberan a las citocinas regulatorias IL-14, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-4, siendo IL-4 la encargada de promover la transformación de células vírgenes a Th2, por lo que ambos grupos de citocinas, es decir proinflamatorias y regulatorias son esenciales para la defensa ante la infección por parte del hospedero (Filisetti & Candolfi, 2004).

IFN- γ

IFN- γ contribuye a la inhibición o destrucción de *T. gondii* a partir de diferentes mecanismos y la posterior activación de células T (CD4+ y CD8+), células naturales killer (NK), macrófagos y neutrófilos. La importancia de IFN- γ está vinculado a sus efectos posteriores, principalmente por la regulación de expresión de más de 1,000 genes implicados en la defensa inmunitaria autónoma de las células, la regulación de las respuestas inmunitarias y de procesos no relacionados con la inmunidad (Boehm et al., 1997). Adicionalmente, participa en la activación de los mecanismos no oxidativos representados principalmente por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que tienen actividades antimicrobianas (Green et al., 1990) como el óxido nítrico (ON) que es sintetizado por el óxido nítrico sintasa (iNOS) a través del sustrato L-arginina. En macrófagos activados por IFN- γ , se ha reportado que, durante la fase crónica de la toxoplasmosis, se inhibe la polifерación parasitaria intracerebral. A pesar de la participación del ON contra el parásito es necesario que haya un equilibrio en sus niveles, ya que su exceso puede causar la destrucción masiva de células del hospedero e incluso la muerte. Los niveles del ON son regulados, por diferentes citocinas que desencadenan la producción de arginasa-1, que degrada la L-arginina, evitando la producción de ON (Rutschman et al., 2001). Por otra parte, los mecanismos no dependientes de oxígeno tal como la producción de indoleamina 2,3- dioxigenasa 1 (IDO1) (estimada por IFN- γ), degradan a residuos de triptofano esencial para el crecimiento de *T. gondii* (Pfefferkorn et al. 1986); (**Fig. 8**).

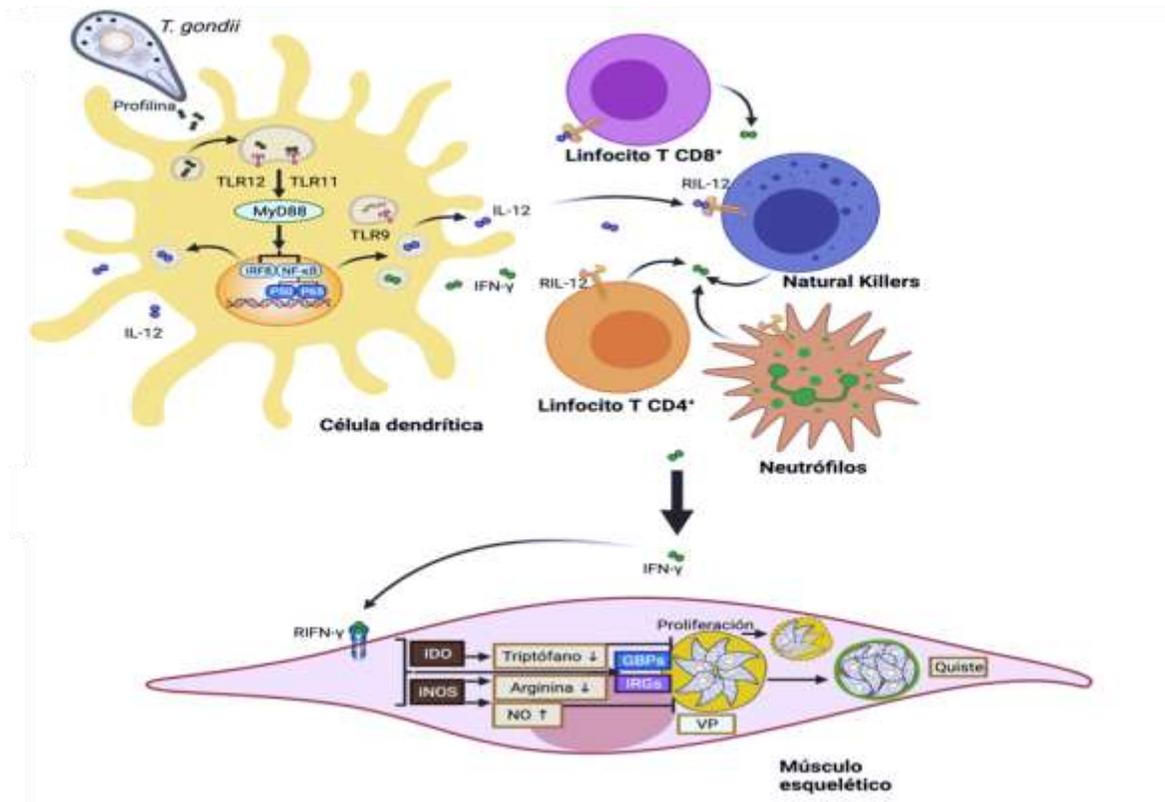


Figura 8. Mecanismos efector del IFN- γ . Una vez que *T. gondii* es reconocido por las células presentadoras de Ag, estas tienen la capacidad de secretar IL-12, la cual activa a Linfocitos T CD8+/CD4+, células natural killer, neutrófilos y CD productoras de IFN- γ . Los macrófagos activados por IFN- γ producen diferentes enzimas como indoleamina 2,3 deoxigenasa y óxido nítrico sintasa inducible, la cuales inhiben la proliferación del parásito. Cortesía de Lagunas et al., 2022

TNF- α

El TNF- α es otra de las citocinas clave para controlar la infección por *T. gondii*. Una vez activados los macrófagos por IFN- γ , son expuestos a TNF- α mejorando los efectos antimicrobianos, incluida la inhibición del crecimiento del parásito intracelular. TNF- α generalmente actúa como una molécula co-estimuladora, debido a que en macrófagos tratados con solo TNF- α , no tiene efecto inhibitor de la proliferación del parásito, mientras que en macrófagos con Ac anti-TNF- α , disminuye la producción de especies reactivas intermediarias después del tratamiento con IFN- γ recombinante (Langermans et al., 1992). A pesar de que TNF- α tiene un papel importante, no es esencial ya que en ratones que carecen de

receptores que reconoce TNF- α no mueren durante la primera etapa de infección; sin embargo, se observa una mayor carga de quistes por la replicación incontrolada de Taks en el cerebro, mostrando que TNF- α tiene una mayor participación en etapas posteriores a la infección (Yap *et al.*, 1998).

IL-2

IL-2 es secretada principalmente por células CD4+ y en menor proporción por las CD y células natural killer, ésta citocina interviene en la supervivencia durante la toxoplasmosis aguda en humanos y ratones, debido a que promueven la activación de los linfocitos T CD8+, los cuales tienen la capacidad de producir citotoxicidad sobre los parásitos o las células infectadas con *T. gondii* (Miller *et al.*, 2009). Adicionalmente se ha reportado que IL-2 activa de manera indirecta el crecimiento y proliferación de linfocitos B por medio de la IL-4 (García *et al.*, 2009); (**Fig. 9**).

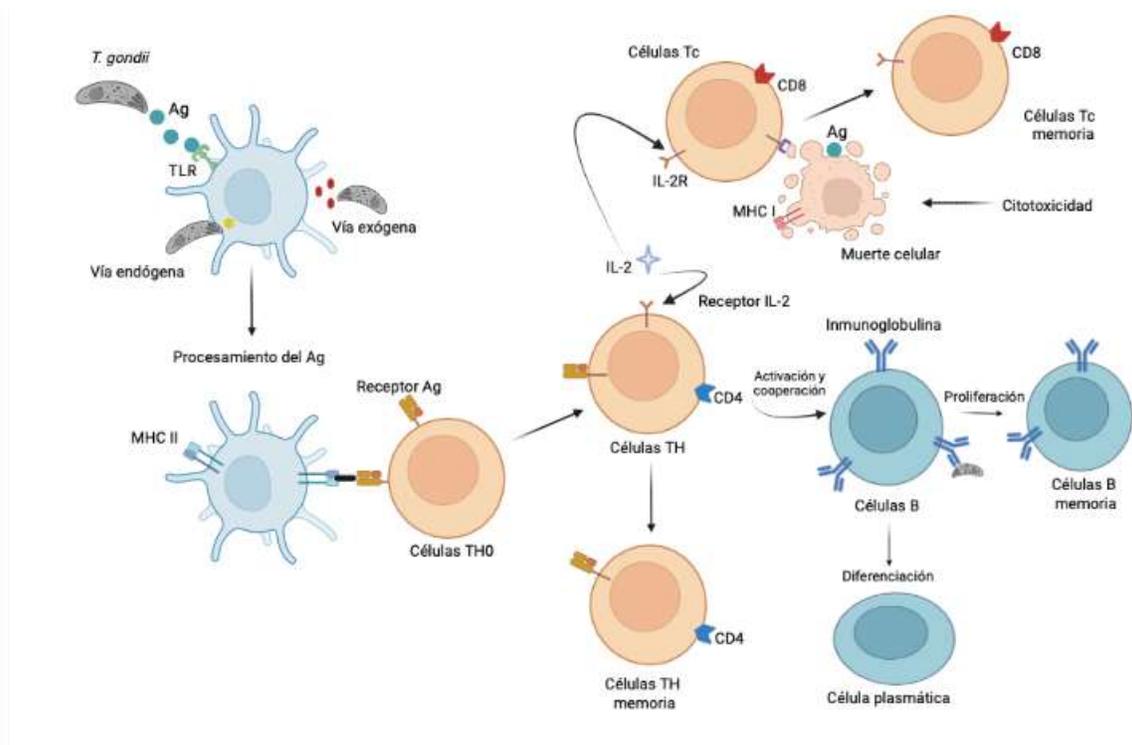


Figura 9. Participación de IL-2 en la respuesta inmune contra *T. gondii*. Una vez reconocido el parásito se inicia el procesamiento del antígeno y el ensamble al complejo mayor de histocompatibilidad clase II para ser presentado a los receptores de los linfocitos T CD4 inmaduros, los cuales una vez activados secretan IL-2 que activa linfocitos T CD8 al ser reconocida por su receptor generando células T citotóxicas que promueven la muerte del parásito y de las células infectadas con *T.gondii*. Por otra parte, la activación de linfocitos T CD4 promueven la activación de células B que proliferan produciendo células B de

memoria y en otro caso de diferencia es células plasmáticas productoras de Ac. Modificada de García *et al.*, 2009

IL-12

Durante la infección por *T. gondii*, la IL-12, es indispensable para la inducción de una respuesta inmune. IL-12 es secretada por macrófagos y CD que inducen la producción de IFN- γ por parte de las células NK y los LT CD4+ y CD8+(Gazzinelli *et al.*, 1993), lo que inhibe la secreción de IgE y actúa de forma sinérgica con otras citocinas (Hunter *et al.*, 1994; Sher *et al.*, 1993; Tripp *et al.*, 1993). Durante la infección por *T. gondii*, se ha demostrado que la producción de IL-12 es crucial en los primeros días, debido a que los ratones que fueron administrados con IL-12 exógena tienen una mayor supervivencia contra dosis letales en comparación con los ratones que se tratan con Ac de bloqueo para IL-12 (Brenier *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha reportado que la capacidad de las células para producir IL-12 durante la infección depende de la activación de los receptores tipo Toll (TLR) a través de la molécula adaptadora “factor de diferenciación mieloide 88” (MyD88) estimulando la vía de señalización para la síntesis de IL-12 (Scanga *et al.*, 2002; Yarovinsky *et al.*, 2005). Finalmente, otras células que participan en la producción de IL-12 son los neutrófilos, sin embargo, es controversial su participación debido a la interrupción temporal en la producción de IFN- γ durante la infección crónica (Suzuki -Kensuke Joh *et al.*, 1994).

IL-6

IL-6 es otra citocina necesaria para el desarrollo de una inmunidad protectora contra este patógeno, estimula la producción de Ac y ejerce un efecto proinflamatorio estimulando la generación de proteínas de fase aguda y aumenta de la actividad citotóxica de las células NK. Se ha reportado que ratones deficientes en IL-6 son incapaces de iniciar una rápida respuesta proinflamatoria contra el parásito, lo que permite una mayor proliferación *T. gondii*. Además del aumento de la mortalidad debido a la carga parasitaria y a la excesiva respuesta inflamatoria que ésta induce después de la infección (Jebbari *et al.*, 1998).

IL-10

Los linfocitos con patrón de citocinas Th2 también contribuyen a la modulación de la respuesta inmune celular contra parásitos intracelulares, mediante la síntesis de citocinas regulatorias como IL-10. IL-10 es necesaria para evitar el daño causado por una respuesta TH1 exacerbada (**Fig. 10A**) y mantener la homeostasis (**Fig. 10B**), por lo que cumple un doble papel en la supresión de las células de la respuesta inmune del hospedero inhabilitando la producción de IFN- γ e inhibiendo así la proliferación de los LT. Esta respuesta antagoniza el desarrollo de la respuesta Th1 y desactiva a los macrófagos con inhibición de la síntesis de IL-12, disminución de IFN- γ y de ON y ROI por parte de los macrófagos facilitando así la supervivencia del parásito (Wilson et al., 2005). Se ha demostrado que en ratones tratados con anti-IL-10 e infectados con *T. gondii* mueren rápidamente debido a la respuesta inflamatoria manifestando una enfermedad asociada a la "tormenta de citocinas" a pesar de la restricción efectiva del crecimiento del parásito (Jankovic et al., 2010). Por otra parte, en macrófagos tratados con IL-10 no son capaces de activarse por IFN- γ para destruir al parásito; por lo tanto, esta citocina es necesaria para regular la respuesta inflamatoria (Villegas et al., 2000).

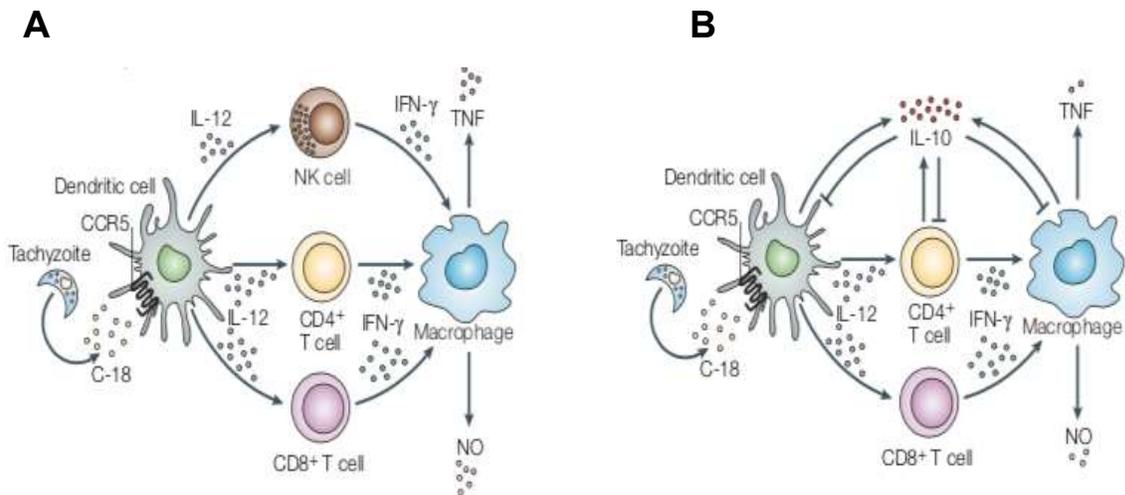


Figura 10. Participación de IL-10 en la respuesta inmune contra *T.gondii*. **A)** Una vez reconocido el parásito a partir de proteínas que este libera, las CD secretan IL-12 que activa a los linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IFN-γ, que activará macrófagos productores de NO que elimina al parásito generando protección **B)** Con la finalidad de evitar una respuesta TH1, la IL-10 interviene como un mecanismo de regulación. Tomada de (Aliberti, 2005)

IL- 4

IL-4 es la principal citocina moduladora, equilibra la síntesis de ON en el hospedero, a partir de la producción de arginasa-1, que degrada la L-arginina, el sustrato para la síntesis de ON, bloqueando su producción. Como se mencionó anteriormente, demasiado ON puede causar destrucción perjudicial de la célula hospedero, por lo que la aparición de una respuesta secundaria Th2 es necesaria para evitar el daño ocasionado por la propia reacción inflamatoria estimulada por una respuesta Th1 exacerbada. (Dupont et al., 2012; Ortiz-Alegría et al., 2010). (**Fig. 11**)

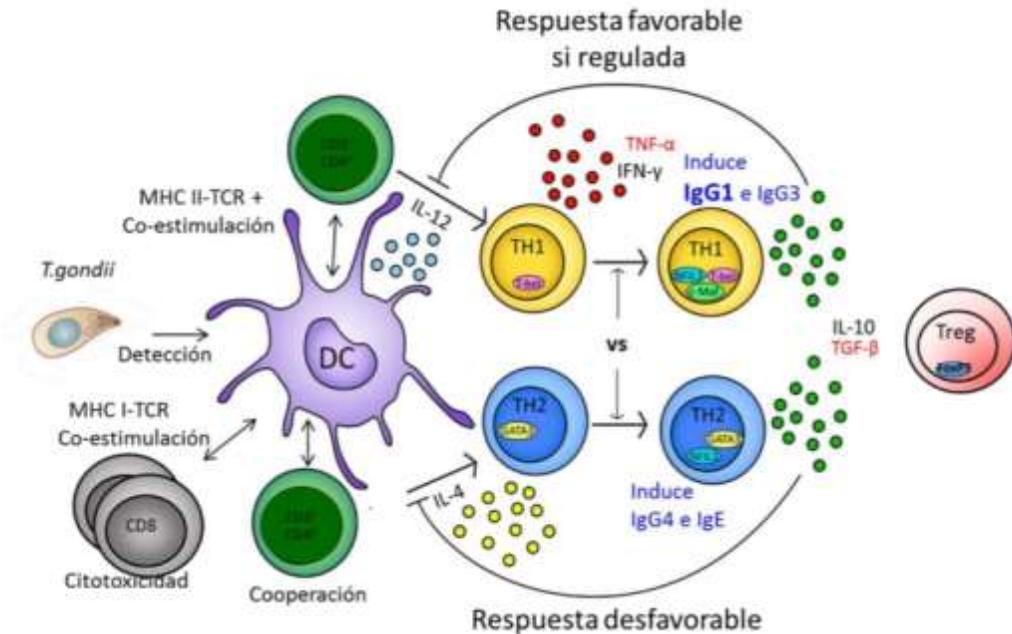


Figura 11. Participación de IL-4 en la respuesta inmune contra *T. gondii*. IL-4 activa la respuesta secundaria Th2 para evitando el daño ocasionado por la propia reacción inflamatoria estimulada por una respuesta Th1 exacerbada. Modificado de Correa et al., 2017

Diseño para el desarrollo de vacunas contra *T. gondii*

La toxoplasmosis generalmente se evidencia con síntomas, que varían desde cefalea, fatiga, coriorentinitis, fiebre elevada hasta linfadenopatía en un pequeño porcentaje de los individuos infectados (Joynson & Wreghitt, 2001). Sin embargo, en la mayoría de individuos inmunocompetentes se muestra de forma asintomática y autolimitada, por lo que del 80 % al 90 % de los casos no son diagnosticados (Galvan & Mondragón, 2001), por tal motivo, es difícil el diagnóstico de tanto de la toxoplasmosis aguda como crónica y la prevención de la toxoplasmosis congénita.

A pesar de lo anterior, hasta el momento no hay vacunas disponibles para uso humano contra la toxoplasmosis. Actualmente, solo se han desarrollado con éxito una vacuna llamada ToxoVax a partir de parásitos S48 vivos atenuados y que tiene licencia solo para uso en ovejas productoras de lana a quienes les induce una protección inmunitaria contra la infección congénita hasta 18 meses después de la

vacunación (Buxton *et al.*, 1993). En los últimos 20 años, se han desarrollado una variedad de estrategias en el diseño de vacunas de primera generación a partir de parásitos fijados o muertos por calor, extractos completos, fracciones subcelulares y cepas atenuadas o de baja virulencia y de nueva generación a base de proteínas recombinantes, vacunas de ADN y subunidades multiepitópicas (multiantígeno) que toman en consideración tres aspectos (ver **Tabla 1**). El primero, el uso de Ag principalmente de organelos secretores como son micronemos (MIC), roptrías (ROP) y gránulos densos (GRAs) que están presente en todo el ciclo de vida del parásito, el segundo, la ruta de administración (intraperitoneal, intramuscular, intravenosa y/o subcutánea) y el tercero, el adyuvante, cuyo uso tiene como objetivo, prolongar la persistencia del antígeno, estimular la proliferación inespecífica de los linfocitos y aumentar la inflamación local. En la mayoría de los modelos experimentales donde se han estudiado la toxoplasmosis generan una protección de manera parcial, relacionado con el aumento de Ac y producción de citocinas tanto inflamatorias como regulatorias (Hossein Abdollahi *et al.*, 2013; Leyva *et al.*, 2001, Martínez-Gómez *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014).

De manera más específica Hossein Abdollahi *et al.*, 2013 han estudiado extractos excretados/secretados del parásito acompañado del adyuvante Freud, en la fase final de la inmunización en modelos Balb/C, en donde se incrementaron los niveles de IL-10, que inhibe la proliferación de los linfocitos B y T, y se induce la homeostasis en las respuestas del sistema inmunitario, haciéndolo un buen candidato para la vacunación animal. Por otro lado, Martínez-Gómez *et al.*, 2009 a partir de extractos de citoesqueleto con adyuvantes como *L. casei* y Freund incompleto generaron un aumento de Ac y disminución de quistes relacionado con el aumento de la supervivencia (ver **Tabla 1**).

Aparte de los estudios que han tenido como objetivo analizar de manera general extractos proteicos, se han utilizado Ag específicos como ROP-2, ROP-13, ROP-38, GRA-14, Proteasa 1 (TgASP1), Catepsina 1 (TgCP1) y Profilina en vacunas de ADN complementados con adyuvantes (Gao *et al.*, 2018; Leyva *et al.*, 2001; Pagheh *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2013) que tiene un papel en

la activación de la respuesta inmune frente a la infección por *T. gondii*, la cual se evidenciada por los diferentes isotipos de inmunoglobulinas como IgG, IgG1, IgG2a y de citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ . Adicionalmente se observó un efecto parcial de inmunoprotección asociado a la disminución de quistes tisulares en algunos casos (ver **Tabla 1**).

También se han investigado alternativas con base en el desarrollo de proteínas recombinantes que incluyen Ag individuales o en combinación como SAG1, HSP70, GRA7, profilina, el factor inhibidor de la migración de macrófagos (TgMIF), proteínas cinasas dependientes del calcio (TgCDPK3) y proteínas 14-3-3 que son una familia de proteínas de expresión ubicua de todas las células eucariotas (Tg14-3-3) (Arcon et al., 2021, Czarnewski et al., 2017; Qu et al., 2011; Liu et al., 2021). Estos estudios evaluaron si el protocolo de inmunización con proteínas recombinantes de *T. gondii* podían provocar respuestas humorales y celulares después de la inmunización final, identificadas a partir de los niveles séricos de IgG1 e IgG2a y de la producción de los tipos de citocinas, permitiendo inducir una respuesta inmunitaria mixta Th1/Th2, con un ligero sesgo hacia la respuesta de tipo Th1 (ver **Tabla 1**).

Finalmente, se han propuesto diseños de multiantígenos, basados en el uso de diferentes proteínas con potencial inmunogénico o en secuencia específicas de las mismas como principio activo de la vacuna. Wang *et al.*, 2011 diseñaron un multiantígeno potencial con proteínas SAG1, GRA1 y GRA4 en adyuvante de Freund, lo que permitió al modelo experimental una mayor supervivencia ante la infección por el parásito, vinculado con el aumento en los niveles de IgG y de la producción de IFN- γ , IL-2 e IL-4, que intervienen en la inhibición del crecimiento de *T. gondii* y en la protección de la respuesta Th1 exacerbada (ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Estrategias terapéuticas reportadas contra toxoplasmosis

Modelo experimental	Infección	Antígeno	Adyuvante	Tipo de inmunógeno	Sistema de administración	Efecto del tratamiento	Referencia
Ratones hembra Balb/C (8-10 semanas)	Taks de <i>T. gondii</i> (RH)	Excretados/ Secretados (E/S)	Freund	Extracto proteico	Intraperitoneal	↑IL-10 (10 veces)	Hossein Abdollahi et al., 2013
Ratones hembra NIH (Adultas)	20 quistes <i>T. gondii</i> (ME49)	Proteínas del citoesqueleto	<i>L. casei</i> y Freund incompleto	Extracto proteico	Intraperitoneal	↑Supervivencia ↑IgM ↓Quistes cerebrales	Martínez-Gómez et al., 2009
Ratones BALB/c, C57Bl/6 y CBA/J	Taks de <i>T. gondii</i> (RH)	ROP2	NA	Vacuna ADN	Intraperitoneal	↑IgG1 e IgG2a ↓Carga de quistes	Leyva et al., 2001
Ratones Kunming hembra (6-8 semanas)	Taks de <i>T. gondii</i> (RH)	ROP38	NA	Vacuna ADN	Intraperitoneal	↑IgG, IgG2a/IgG1 ↑IFN-γ e IL-2 ↑CD4+ CD8+	Wu et al., 2014

							↓Carga de quistes	
Ratones hembra BALB/c (6-8 semanas de edad)	1 × 10 ³ Taks RH	TgMIF TgCDPK3 Tg14-3-3	Freund (Completo/incompleto)	Proteína recombinante	Intraperitoneal	↑IgG ↑IFN-γ e IL-4 ↑Supervivencia ↓Quistes cerebrales	Liu et al., 2021	
Ratones Balb/C	Taks de <i>T. gondii</i> (RH)	TgASP1 (Proteasa 1)	NA	Vacuna and	Intramuscular	↑IgG2a. ×IgG1 ↑ IFNγ ×IL-10 e IL-4	Zhao et al., 2013	
Ratones BALB/c (8 semanas)	Taks de <i>T. gondii</i> (RH)	TgCPC1 (Catepsina 1)	α-galCer.	Vacuna de ADN	Intramuscular	↑ IgG, IgG2a ↑IFN-γ, IL-2 ↑Supervivencia (12 días)	Han et al., 2017	
Ratones BALB/c y Kunming (6-8 semanas de edad)	10 Taks GJS	SAG1 GRA1	GRA4 Freund	Multiantígeno	Intramuscular	↑IgG ↑IFN-γ, IL-4 e IL-2 ↑Supervivencia	Wang et al., 2011	

Ratones Kunming (6-8 semanas de edad)	10 quistes tisulares de la cepa PRU	Profilina	N/A	ADN		Intramuscular	↑IgG e IgG2a ↑IFN- γ , IL-2 e IL-4 ↓Quistes cerebrales	Gao et al., 2018
Ratones BALB/c (6-8 semanas de edad)	<i>T. gondii</i>	ROP13/ GRA14	Nanoadyuvantes de hidróxido de aluminio	ADN		Intramuscular	↑IgG e IgG2a ↑IFN- γ ↑Supervivencia	Pagheh et al., 2021
Ratones BALB/c (8 semanas)	NA	Multiepitopos SAG1 GRA2 GRA7 ROP16	pEGFP-RANTES (pRANTES)	Vacuna de ADN		Intramuscular	↑ IgG y IgG2a ↑ IFN- γ ↑Supervivencia	Cao et al., 2015
Ratón cepa ICR (6-7 semanas)	Taks de <i>T. gondii</i> (RH)	SAG1	Ginsenósido Rg1	Proteína recombinante		Subcutánea	↑ IgG y IgG2a ↑ IL-4, IFN- γ ↑Supervivencia (8 días)	Qu et al., 2011
Ratones C57BI/6	<i>T. gondii</i> (ME49)	HSP70	Alum adjuvant	Proteína recombinante		Subcutánea	× IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ ↓Carga de Quistes	Czarnewski et al., 2017

Ratones hembra BALB/c (6-8 semanas de edad)	20 quistes de tejido de <i>T. gondii</i> Me49 (dosis subletal)	GRA7 Profilina	Freund	Proteína recombinante	Intradérmica	↑IgG ↑Células CD4+ ↑IFN-γ e IL-10 →IL-4 e IL-5	Arcon et al., 2021
---------------------------------------------	----------------------------------------------------------------	----------------	--------	-----------------------	--------------	---------------------------------------------------------	--------------------

↑ indica mayor nivel de producción ó supervivencia; ↓indica disminución del nivel de producción ó supervivencia; X indica que no hay cambio nivel de producción ó supervivencia.

Antecedentes directos

En la actualidad se han identificado factores de virulencia tales como las proteasas, que permiten la diseminación del parásito por todo el organismo del hospedero. En nuestro laboratorio se han identificado en extractos totales (ET) y en productos de excreción/secreción (E/S) de Taks aislados de ratón, al menos nueve proteasas que dependen de Ca^{2+} y seis proteasas que dependen del pH. Recientemente en nuestro grupo, se identificó una metaloproteasa denominada TLN1 en fracción de citoesqueleto con potencial inmunogénico con base en el análisis bioinformático.

TLN1 es una metaloproteasa previamente descrita por Hajagos *et al.* (2012) ubicada en roptrias mediante co-localización con ROP13 (**Fig. 12A**). TLN1 cuenta con 1,645 aa en donde destacan 13 repeticiones en tándem de 11 aa, un péptido señal, el dominio de unión al zinc (HXXEH) necesario para la catálisis y los dominios característicos de las proteasas M16A. Además, identificaron que TLN1 tiene asociación con complejos resistentes a los detergentes y que antes de localizarse en las roptrias se somete a una escisión proteolítica en el C-terminal formando una TLN1m de 181 KDa (**Fig. 12B**).

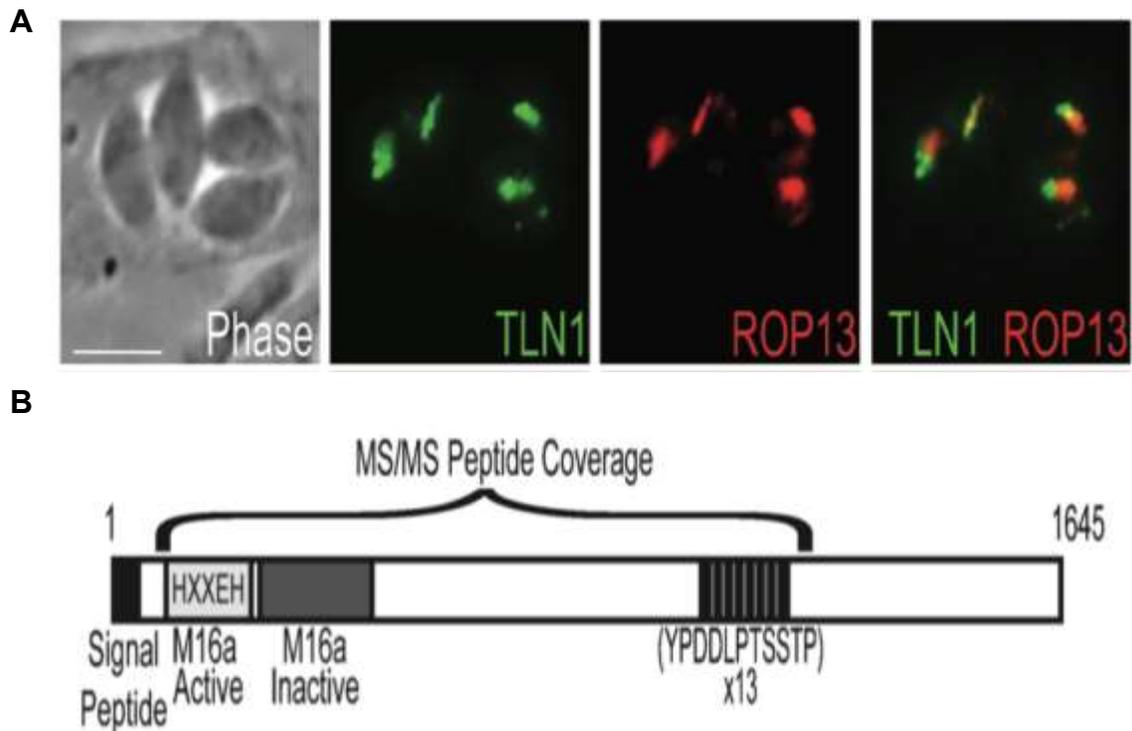


Figura 12. Caracterización de TLN1. A) Co-localización de TLN1 y ROP13 en las roptrias de Taks; **B)** Diagrama que muestra las características de TLN1, la metaloproteasa cuenta con 1645 aa, un péptido señal, un sitio activo HXXEH de unión al zinc, necesario para la catálisis. TLN1 sufre un corte en el extremo C-terminal formando una proteína madura de 181 KDa (Hajagos et al., 2012)

En el trabajo de tesis de doctorado de Lagunas Cortéz (en proceso) se caracterizó la inmunoreacción de sueros humanos positivos a toxoplasmosis aguda en extractos de citoesqueletos de Taks por medio de WB en geles 2D e identificando IgM humana. Se seleccionaron cuatro de los spots inmunoreconocidos más evidentes localizados tanto en el inmunoblot como en los geles 2D de isoelectroenfoque (IEF), se cortaron y se analizaron por espectrometría de masas. Se identificaron 65 proteínas en dentro de las cuales se destacan las proteínas MIC, GRA y ROP (**Fig.13**).

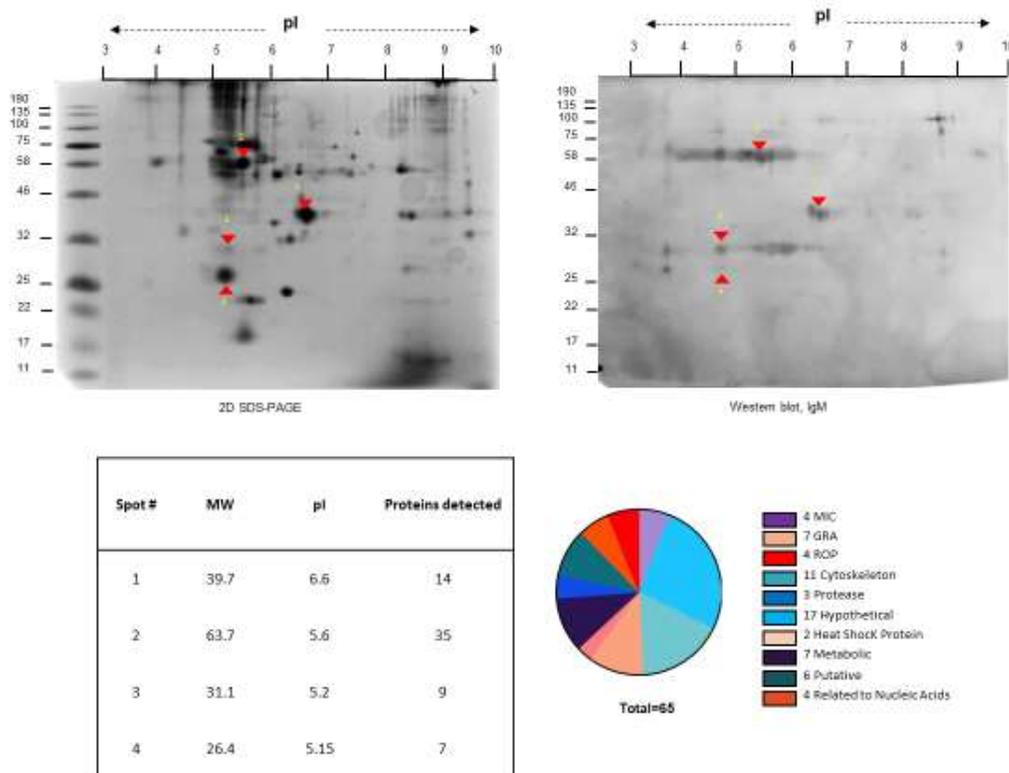


Figura 13. Reconocimiento de proteínas del citoesqueleto con sueros humanos positivos a toxoplasmosis aguda. Apartir de SDS-PAGE 2D de 120 µg del citoesqueleto y de Western Blot 2D de IgM humana, se identificaron spot localizados tanto en el gel como en el inmunoblot, cada spot se analizó por espectrometría de masas, donde las proteínas detectadas se clasificaron según su función. Tomada de (Lagunas Cortes, 2022, datos en

Posteriormente, las proteínas encontradas en los 4 spots, se analizaron mediante estrategias bioinformáticas a fin de identificar las proteínas con mayor número de epítomos accesibles y antigénicos para linfocitos B, en donde destacó TLN1 con 16 epítomos accesibles y 16 epítomos antigénicos para linfocitos B (**Fig.14**).

ID	Proteína	Spot	PI	MW	Emini Surface Accessibility	Kolaskar and Tongaonkar antigenicity
TGGT1_248500	Hypothetical protein	1	6.38	37.5	10	9
TGGT1_319560	MIC3	1,2	6.66	40.52	8	14
TGGT1_210960	Putative replication factor C subunit 4	1	6.62	39.94	7	10
TGGT1_250060	RNA polymerase I RPA12	1	6.2	37.7	7	12
TGGT1_212260	Sjogren's syndrome/scleroderma Autoantigen 1	1	6.7	38.48	10	11
TGGT1_228190	Putative eukaryotic initiation factor-3, subunit 5	1	7.7	38.46	11	8
TGGT1_283510	Hypothetical protein	1	6.51	38	14	8
TGGT1_269885B	Metalloprotease toxolysin TLN1	1	8.02	62.3	16	16
TGGT1_267390	DNA-directed RNA polymerase I RPAC1	1	6.84	38.96	8	10
TGGT1_247550	Heat shock protein HSP60	2	5.7	60.9	10	24
TGGT1_261440	ARM repeats containing protein	4	4.74	30.9	8	10
TGGT1_313380	Hypothetical protein	4	5.29	32.02	7	9
TGGT1_203310	GRA7	4	4.85	25.8	8	5

Figura 14. Proteínas detectadas en spots reconocidos por IgM humana con mayor número de epítomos accesibles y antigénicos para linfocitos B. El análisis bioinformático a partir de Koloaskar and Tongaonkar y Emini Surface, predijo las proteínas con mayor cantidad de epítomos en los spots seleccionados, donde destaca TLN1. Tomada de (Lagunas Cortes, 2022, datos en proceso de publicación).

Teniendo en cuenta que TLN1 es la proteasa que presentó el mayor número de epítomos inmunogénicos predichos para la activación linfocitos B, con 16 epítomos lineales y 16 accesibles, fue de interés evaluar el potencial antigénico de esta proteína para células T. El análisis se realizó con base a la afinidad de unión de secuencias peptídicas de la TLN1 a los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) humano y ratón, este último por ser el modelo de estudio. Se obtuvieron secuencias proteicas de elevada afinidad de unión ($IC_{50} <$

50 nM) 15 y 22 para alelos de MHC-I y 83 y 19 para alelos MHC-II, para humano y ratón, respectivamente (**Fig.15**)

MHC I		MHC II	
Alelo (humano)	# de epítomos	Alelo	# de epítomos
HLA-A*01:01	1	HLA-DRB1*01:01	83
HLA-B*07:02	14		
Total	15	Total	83
Alelo (ratón)		Alelo (ratón)	
H-2-Db	1	H2-IAb	18
H-2-Dd	1	H2-IAd	1
H-2-Kb	8	H2-IEd	0
H-2-Kd	4		
H-2-Kk	7		
H-2-Ld	1		
Total	22	Total	19

Figura 15. Número de epítomos predichos con elevada ($IC_{50} < 50$ nM) e intermedia (50 nM $< IC_{50} < 100$ nM) afinidad de unión para cada alelo MHC analizado, reportados por IEDB. HLA-A*01:01 y HLA-B*07:02: alelos MHC-I de humano; HLA-DRB1*01:01: alelos MHC-II de humano; H-2-Db, H-2-Dd, H-2-Kb, H-2-Kd, H-2-Kk y H-2-Ld: alelos MHC-I de ratón; H2-IAb, H2-IAd y H2-IEd: alelos MHC-II de ratón. Tomada de (Lagunas Cortes, 2022, datos en proceso de publicación).

Justificación

La TLN1 de *T. gondii* se detectó en una fracción de citoesqueleto de pacientes seropositivos a toxoplasmosis aguda (presencia de IgM). Además, el análisis bioinformático indicó que la TLN1 cuenta con un mayor número de epítomos disponibles y antigénicos para linfocitos B, lo que representa una posible molécula inmuno-relevante debido a la alta inmunogenicidad. Con base en lo anterior, consideramos a la TLN1 un blanco molecular para el diseño de estrategias que nos permitan generar inmuno-protección ante retos letales con el parásito en un modelo murino de toxoplasmosis aguda.

Hipótesis

Los péptidos inmunogénicos de TLN1 activan respuestas inmunitarias de tipo humoral con generación de Ac neutralizantes y de tipo celular con participación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con actividad citotóxica en células invadidas por *T. gondii*, lo que generará un efecto inmunoprotector en un modelo murino de toxoplasmosis aguda.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la inducción de la respuesta inmunitaria humoral y celular por péptidos inmunogénicos de TLN1, así como su efecto en inmunoprotección en un modelo murino de toxoplasmosis aguda.

Objetivos particulares *in silico*

1. Realizar análisis bioinformático de toxolisina 1 madura (TLN1m) a fin de seleccionar un péptido con epítomo inmunogénico que active respuesta humoral y un péptido con epítomo inmunogénico que active la respuesta celular.

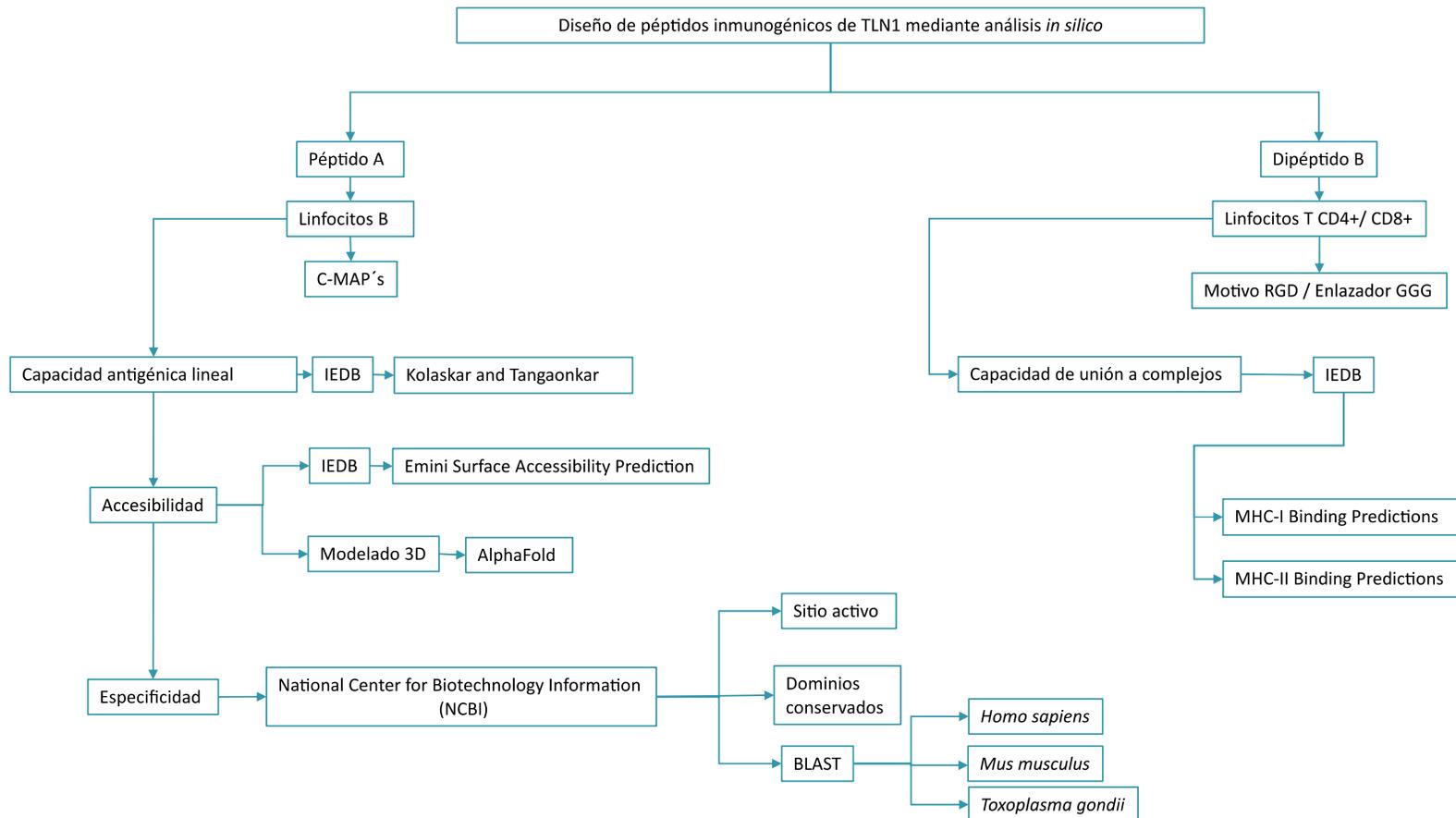
2. Diseñar un péptido de TLN1 con capacidad antigénica lineal y accesibilidad para la activación de linfocitos B (Péptido A).
3. Diseñar un péptido de TLN1 con la capacidad antigénica de epítomos para la activación de linfocitos T CD4+/CD8+ (Péptido B).
4. Determinar la especificidad de los péptidos diseñados, por medio del BLAST frente a *Homo sapiens* (Humano), *T. gondii* y *Mus musculus* (Ratón) a fin de evitar reacciones cruzadas inespecíficas, mediante la detección de los dominios conservados y el sitio activo de la TLN1m.
5. Desarrollar el modelo 3D de TLN1m y de las construcciones de los péptidos predichos, a partir de Alpha Fold.

Objetivos particulares *in vivo*

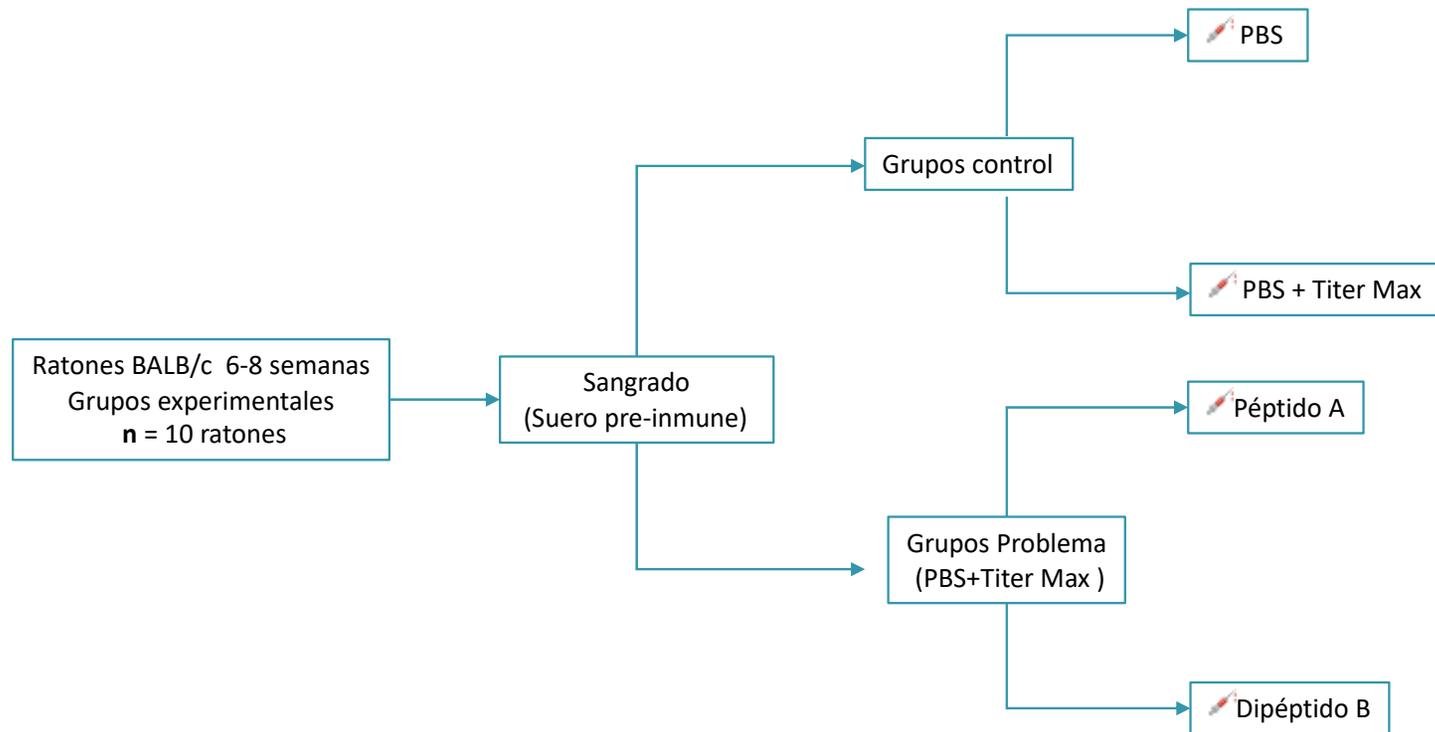
1. Obtener los péptidos inmunogénicos seleccionados, mediante su síntesis por la compañía Gene Script.
2. Inmunizar grupos de 10 ratones BALB/c con los epítomos inmunogénicos, utilizando como adyuvante, TM. Se tendrá un grupo control en los que se inoculará: PBS más TM.
3. Realizar la inmunolocalización de la TLN1m en Taks extracelulares e intracelulares utilizando los sueros de los ratones inmunizados.
4. Determinar los niveles séricos de los isotipos IgM e IgG contra los péptidos inmunogénicos.
5. Identificar el patrón de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α en suero de los ratones inmunizados.
6. Determinar la supervivencia de ratones BALB/c inmunizados ante la infección intraperitoneal con dosis letales de Taks de la cepa RH de *T. gondii*.

Estrategia experimental

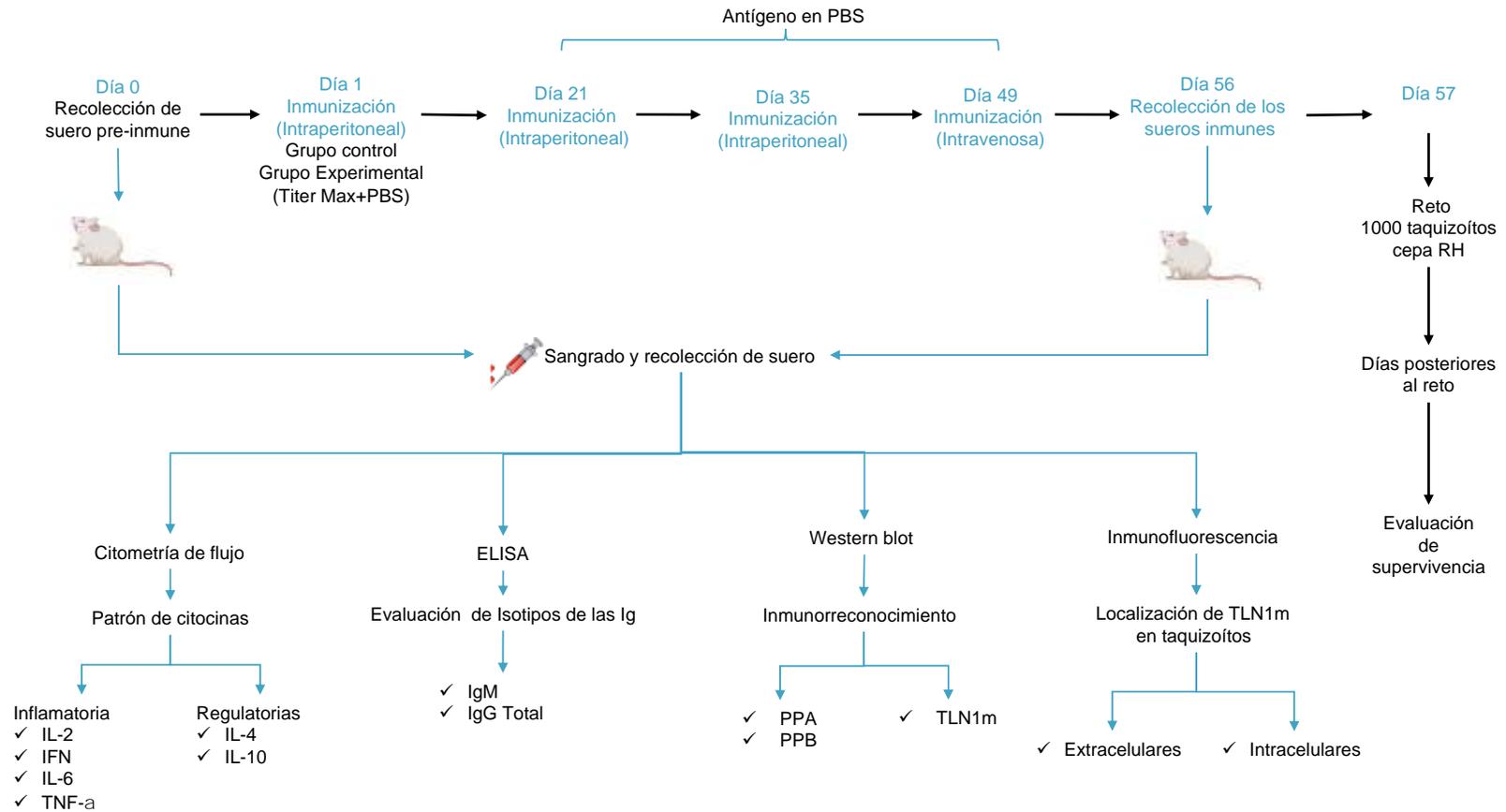
Análisis *in silico* para el diseño de péptidos inmunogénicos



Distribución de grupos experimentales



Protocolo de inmunización y determinaciones



Metodología

Análisis bioinformático

Predicción del péptido activador de linfocitos B (Péptido A)

El análisis bioinformático de antigenicidad de la TLN1m de *T. gondii* se desarrolló mediante el servidor Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB), que contiene base de datos con epítomos para Ac. Para realizar la predicción antigénica y con mayor accesibilidad de epítomos lineales se seleccionaron los métodos de Koloaskar and Tongoankar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) y Emini Surface (Emini et al., 1985), respectivamente. Koloaskar and Tongoankar se basa en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, así como su frecuencia de aparición en epítomos consenso, con lo que asigna un valor de corte, por encima del cual los epítomos se consideran antigénicos, mientras que Emini Surface evidencia la probabilidad de accesibilidad de la superficie, a partir de un modelo matemático dando un valor para cada epítomo accesible. Los epítomos predichos simultáneamente se seleccionaron para cada una de las construcciones.

Construcción del péptido A

El epítomo para la activación de linfocitos B, de la predicción previamente explicada, se utilizó para diseñar el péptido A (PPA). La secuencia candidata para la producción de Ac se sintetizó con cuatro MAP's en el extremo C-terminal. Las MAP's son secuencias de aminoácidos trifuncionales para construir moléculas ramificadas a base de péptidos, con la finalidad de estimular el sistema inmunitario, principalmente generando la resistencia del péptido ante la degradación proteolítica, debido a que el uso de péptidos se ha limitado en gran medida por su corta vida media *in vivo* ya que suelen ser digeridos por proteasas y peptidasas (Bracci et al., 2003; Posnett et al., 1988; Tam, 1988).

Predicción de epítomos de linfocitos T (Péptido B)

Por otra parte, se realizó el análisis de epítomos para células T de TLN1m, el cual se desarrolló de igual manera con el servidor IEDB, empleando las herramientas de predicción de secuencias peptídicas con capacidad de unión a moléculas MHC-I y MHC-II, que pueden ser potencialmente reconocidos por el receptor de células T (TCR) de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocitos cooperadores (CD4+), respectivamente, provocando su activación. La selección de los epítomos citotóxicos (CTL) se realizó de acuerdo con la puntuación de inmunogenicidad, la cual indica la probabilidad de provocar una respuesta inmunitaria (cuanto mayor sea la puntuación, mayor será la probabilidad de respuesta inmunitaria). La predicción de epítomos de linfocitos T cooperadores (HTL) para TL1m, se hizo con base en los alelos de ratón (H2-IAb, H2-IAc y H2-IDd). Los epítomos resultantes se clasificaron en función de sus valores de IC_{50} y de las puntuaciones percentiles de cada epítomo predicho. Sólo se seleccionó uno de los epítomos con el rango percentil más bajo para el MHC clase II y con valores de $IC_{50} < 50$ nM para el diseño de cada construcción. (cuanto menor sea la puntuación del percentil, mayor será la afinidad de unión del epítomo a los receptores HTL).

Construcción del Péptido B

Para diseñar el péptido B (PPB), los epítomos para la activación de linfocitos T CD4+ y T CD8+, de las predicciones antes descritas, se utilizaron para generar la secuencia candidata con la capacidad de unión al complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II. Adicionalmente, la construcción contiene un dominio arginina-glicina-aspartato (RGD) en el extremo N-terminal, el más representativo de los motivos de adhesión celular y parece mejorar la unión de los péptidos a receptores específicos, ya que funciona como una molécula de co-reconocimiento, por diferentes receptores tipo integrinas en las células de la respuesta inmunitaria (Yano et al., 2003, 2005). Además, se realizó el modelo del PPB en el servidor de AlphaFold, para evitar un plegamiento que evite el procesamiento del Ag (Jumper et al., 2021).

Predicción de la alergenicidad y propiedades fisicoquímicas de cada construcción

Para determinar el potencial de alergenicidad de cada construcción se utilizaron AllerTOP v2.0 y AllergenFP. El caracterizar este potencial, evitaría diseñar un péptido que, al inocularse en los animales, se generara una reacción de hipersensibilidad o alergia. El algoritmo AllerTOP v2.0 utiliza descriptores E de aminoácidos, transformación de covarianza automática y cruzada, y los métodos de aprendizaje automático de *k*-nearest más cercanos para clasificar los alérgenos. AllergenFP identifica los alérgenos y los no alérgenos utilizando un enfoque de huella dactilar sin alineación y basado en descriptores.

Mediante el servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) se analizaron varios parámetros fisicoquímicos de cada construcción, entre los que se incluyen el valor del punto isoeléctrico teórico (pI), el índice de inestabilidad, la vida media *in vitro* e *in vivo*, el índice alifático, el PM y los parámetros de la media general de la hidropatía (GRAVY).

Animales

Los ratones macho de la cepa BALB/c (6-8 semanas) se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (22-24 °C), humedad relativa (50-55 %), ciclo luz/oscuridad (12 x 12 h) para su adaptación durante siete días. Se distribuyeron en cuatro grupos experimentales (n=10/grupo). Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco. Los animales se mantuvieron de acuerdo con lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Parásitos

Se utilizaron Taks de la cepa RH de *T. gondii* que se mantuvieron mediante inoculaciones intraperitoneales en ratones macho BALB/c, de seis a ocho semanas

de edad, de acuerdo con lo reportado previamente (Díaz- Martín et al, 2022). Después de tres o cuatro días post-inoculación, se sacrificaron por medio de dislocación cervical y los Taks se cosecharon mediante exudados peritoneales con PBS estéril (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, pH 7.2). La suspensión rica en Taks se purificó mediante ciclos de centrifugaciones (1,700 rpm/10 min) y mediante resuspensión del pellet de parásitos en PBS estéril. Adicionalmente, se realizó una purificación con la finalidad de eliminar macrófagos y otros contaminantes celulares con el pasaje de la muestra a través de filtros de policarbonato de 5 µm de diámetro. Los Taks purificados se contaron en cámara de Neubauer y se ajustó el número dependiendo del ensayo a realizar. Para mantener la cepa se re-infectaron nuevos ratones vía intraperitoneal.

Protocolo de inmunización y recolección de suero

Los péptidos fueron diluidos con PBS y mezclados hasta homogeneidad en una relación V : V con el adyuvante TM. Una vez preparados se administraron de manera intraperitoneal y/o intravenosa. Los ratones BALB/c, fueron inmunizados cuatro veces por vía intraperitoneal o intravenosa. Al día 1, 21, 35, 49 y 56 del protocolo de inmunización, los animales fueron sangrados vía seno retro-orbital al día uno y 56. La sangre extraída se incubó a 37° por 30 min y posteriormente se centrifugó a 2,000 rpm/10 min, el suero recolectado se almacenó a 4°C hasta su uso. A partir de los sueros se realizó la caracterización inmunoquímica de PPA, PPB y TLN1m. Además, se evaluó el patrón de citocinas, así como de Ac.

Preparación de extractos totales de Taks

Los Taks purificados se solubilizaron en buffer de lisis (2% β mercaptoethanol, 1% SDS, 20 mM EGTA, 2 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM TPCK y 0.1 mM TLCK). Posteriormente, la muestra se sonicó a 40 Hz 3 veces durante 40 seg (Procesador Ultrasónico GE 130PB Cole-Parmer, Vernon Hills, USA). Se realizó la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para Western Blot se utilizaron 100 µg de proteína total.

Obtención de proteínas de excreción/secreción

Los Taks purificados se resuspendieron en DMEM estéril sin suero. La suspensión de parásitos se incubó a 37 °C por 4 h, al término de la incubación se realizaron tres centrifugaciones a 1,700 rpm a TA para la separación de los parásitos, se recuperó el sobrenadante considerado como E/S. Los productos E/S se precipitaron mediante la técnica de metanol-cloroformo, la proteína precipitada se resuspendió en buffer de lisis para su análisis a partir de Western Blot (20 µg de proteína total). Al término de la recolección de los productos de E/S, se determinó la viabilidad de los parásitos mediante su suspensión en Cytox green en dilución 1:5,000 del stock comercial, (SYTOX-green nucleic acid stain (Molecular Probes, Eugene, OR.). La viabilidad fue por arriba del 96 %.

Cuantificación de proteína

Se determinó la concentración de proteínas en las muestras obtenidas por el método de Bradford. Para ello se preparó una curva de calibración con BSA, en un rango de 50 a 500 µg/ml. Para la muestra se realizó una dilución en PBS (1:50). Para la determinación de proteínas, se tomaron 10 µl del estándar de Albumina serica bovina (BSA) o de la muestra (extracto total (ET) o E/S), se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (1:4 Bradford-agua bidestilada) en placas de 96 pozos, se incubó durante 5 min en oscuridad y se leyó la absorbancia a 595 nm (MicroPlate Reader S80XR, BioRad). A partir de la curva de calibración, se observó la concentración proteica de la muestra, y se ajustó a la cantidad necesaria. Para Western Blot se utilizaron 20 µg y 50 µg de proteína total.

Precipitación de proteína por el método de Metanol-Cloroformo

La precipitación de las fracciones correspondientes al proceso de purificación se llevó a cabo por el método de metanol-cloroformo-agua en la proporción de 4:1:3, se mezcló por vortex y se centrifugó a 4800 rpm durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se agregaron 3 partes de metanol para posteriormente centrifugarse a 4800 rpm a 4 °C por 5 min, y se decantó prácticamente la totalidad

del sobrenadante, dejando un volumen de alrededor de 500 μ L que se colocó en un eppendorf de 1.5 mL, donde se centrifugó por última vez a 4800 rpm por 5 min a 4 °C. El pellet (proteína precipitada) se resuspendió en buffer de lisis para Western Blot (2% β mercaptoethanol , 1% SDS, 20 mM EGTA, 2 mM Tris-HCl a pH 7.5, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM TPCK y 0.1 mM TLCK).

SDS-PAGE

Se realizó la separación proteica mediante electroforesis en geles al 7.5 % de acrilamida-bis acrilamida en condiciones reductoras (con β -mercaptoetanol). Los geles se tiñeron con nitrato de plata, para lo cual el gel se lavó con H₂O bidestilada por 15 min en agitación, posteriormente se colocó en 100 mL de buffer de fijación (40 % metanol y 50 μ L de formaldehído al 37 % en agua bidestilada), seguido de 2 lavados con 50 mL de H₂O bidestilada durante 5 min en agitación y se colocaron 50 mL de una solución de tiosulfato de sodio (J.T Baker, México) a 0.2 g/L por 1 min en agitación a TA. Posteriormente se lavó 2 veces con 50 mL de H₂O bidestilada por 20 seg y se colocó en una solución de nitrato de plata (J.T Baker, México) al 0.1% por 10 minutos. Finalmente se colocaron 50 mL de la solución reveladora (3% de carbonato de sodio (J.T Baker, México) y 0.0004% de tiosulfato de sodio en agua bidestilada), hasta que se visualizaron las bandas y se colocaron 50 mL de ácido cítrico (J.T Baker, México) 2.3 M para término de la reacción.

Western Blot (WB)

Se tomaron 20 μ g ó 50 μ g de proteína separada por electroforesis (SDS PAGE) en geles de poliacrilamida al 7.5 % y 15 %. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia semi seca (120 V por 60 minutos). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 6 % en buffer TBST (20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, 0.1 % tween 20 en 1 L de H₂O bidestilada) durante 120 minutos. Las membranas se incubaron con los Ac primarios diluidos en PBS a 1:150 (suero pre inmune e inmune) durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Al siguiente día las membranas se lavaron con buffer TBST (5

veces) y se incubaron con los Ac secundarios correspondientes (1:7000) durante 120 minutos. La unión de los cuerpos de detectó por quimioluminiscencia.

Ensayo de inmunofluorescencia

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la TLN1m en Taks extracelulares y en proliferación intracelular en células Hep-2 (Carcinoma epidermoide humano cepa-2). Las muestras se fijaron con paraformaldehído (PAF) al 2 % (Electron Microscopy Science, Washington, PA) en PBS durante 40 min a TA, seguido del lavado con PBS (3 veces). Las muestras se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, MO) 0.2 % en PBS durante 5 min y se realizaron 3 lavados con PBS. A continuación, las muestras se bloquearon con Suero Fetal Bovino (SFB) 1.5 % en PBS y se incubaron en agitación a TA por 30 min. Se añadieron los sueros pre inmune e inmune y se dejaron incubando a 25 °C durante 1 h y posteriormente a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se lavó con PBS y se añadió el Ac secundario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), se incubó con durante 2 h a TA, se realizaron lavados con PBS (7 veces). Para teñir el núcleo se colocó una disolución 1:1000 de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Oregon) a TA durante 10 min, se realizaron lavados con PBS (7 veces). La muestra se montó con Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) y se tomaron fotografías en un microscopio de fluorescencia Axioskop2 *mot plus* (Zeiss) empleando los filtros para detectar cada tipo de compuesto fluorescente: en el canal 1 FITC (Excitación: 495, Emisión: 517) y canal 2 DAPI (Excitación: 358, Emisión: 464) y a través del objetivo 100X con aceite de inmersión. Para procesar las imágenes se empleó el programa AxionVision de ZEISS.

Determinación semicuantitativa de inmunoglobulinas por ELISA

Las placas de 96 pozos se recubrieron con 100 µL (1 µg/pozo) del antígeno (PPA y PPB) en buffer de carbonatos (0.2 M Na₂CO₃ 16 mL, , 0.2 M Na₂HCO₃ 34 mL y 200 mL H₂O) se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día las placas se lavaron cinco veces en agitación constante por 5 minutos con PBST (PBS+ 0.05 %

Tween 20). Las placas se bloquearon con 200 μ L de leche descremada al 5% en PBST durante 30 min a 37 °C, posteriormente las placas se lavaron con 200 μ L de PBST (cinco veces). Las muestras de suero se diluyeron en PBST (1:250) empleando 100 μ L/pozo y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Se utilizaron sueros pre inmunes como controles. Las placas se lavaron cinco veces con PBST y se colocaron Ac secundarios anti-conejo IgG-HRP de ratón (Sigma-Aldrich) y anti-conejo IgM-HRP de ratón (Sigma-Aldrich) a 1: 5000. Las placas se incubaron 2 h a 25 °C. Después de lavar cinco veces con PBST. La unión de los Ac se evidenció colocando 100 μ L de la solución de revelado (0.1 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0.1 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 0.004 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$ y 4 μ L H_2O_2), hasta la aparición de un color amarillo. Para detener la reacción se adicionaron 100 μ L de ácido sulfúrico 2N. Finalmente la determinación se hizo en un espectrofotómetro Model680RX Bio-Rad a una longitud de onda de 490 nm. Para cada muestra, los valores de absorbancia obtenidos se extrapolaron, de acuerdo con la curva estándar de dilución en serie de ocho puntos realizada en paralelo en cada placa realizada con el suero de referencia de ratón (Bethyl. No. Cat. RS10-101, lote 6). Los valores se presentan como μ g/mL.

Valores asignados (de acuerdo con la hoja técnica):

1. IgG = 9.5 mg/mL
2. IgG1 = 3.0 mg/mL
3. IgG2a = 2.5 mg/mL
4. IgG2b = 2.6 mg/mL
5. IgG3 = 1.4 mg/mL
6. IgA = 5.5 mg/mL
7. IgM = 0.5 mg/mL
8. Albúmina = 30 mg/mL

Determinación semicuantitativa de citocinas por citometría de flujo

Para la determinación semicuantitativa de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α se utilizó el KIT ELISA tipo sándwich (LEGENDplex™ MU Th Cytokine Panel (12-plex) w/ FP V03). El kit incluye un buffer de ensayo, microesferas premezcladas conjugadas con un Ac específico en su superficie a diferentes citocinas, un cóctel

de Ac de detección biotinilados y fluorocromo estreptavidina ficoeritrina. La preparación se realizó en tubos Eppendorf mediante la adición de la mezcla del buffer de ensayo, las microesferas conjugadas y los sueros pre inmune o inmune, en la proporción de 6:3:6, se mezcló por vortex y se incubó por 90 min en agitación a TA, posteriormente, se realizó un lavado con PBS, tras el lavado, se agregaron 3 partes del cóctel de Ac de detección biotinilados. La mezcla se incubó por 30 min en agitación a 25 °C, seguido de un lavado con PBS. Finalmente, los complejos de microesferas de captura-analito-Ac se evidenciaron colocando 3 partes del fluorocromo estreptavidina ficoeritrina, para su posterior lectura en el citómetro de flujo. Cada concentración de citocinas en los sueros se extrapolo a partir de una curva estándar de dilución en serie de ocho puntos realizada en paralelo con las muestras. Los valores se presentan como pg/mL.

Reto 1000 Taks (Dosis letal)

Al finalizar el protocolo de inmunización, los ratones fueron retados con 1000 Taks de la cepa RH por vía intraperitoneal, para determinar la supervivencia ante la infección en el modelo agudo. 35 días posteriores al reto, los animales sobrevivientes fueron infectados con una segunda dosis letal, permitiendo evaluar el efecto inmunoprotector de los Ag correspondiente.

Análisis estadístico

Las gráficas se presentaron con valores promedio \pm error estandar, se realizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de multiples comparaciones entre los distintos grupos, usando el software GraphPad Prism 9. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Resultados

Los resultados que se describen a continuación se encuentran en orden correspondiente a los objetivos propuestos, cada experimento se realizó por triplicado.

Análisis bioinformático

Para el diseño de las diferentes construcciones (Péptidos A y B), se utilizó la secuencia de la proteína TLN1m (TGME49_269885) de *T. gondii*, recuperada de la base de ToxoDB en el formato FASTA. A partir IEDB se realizó la máxima predicción antigénica y de accesibilidad del epítipo lineal, usando para ello los métodos respectivos de Koloaskar and Tongoankar y Emini Surface.

La secuencia que se determinó de TLN1m para el reconocimiento por linfocitos B a fin de generar anticuerpos se definió como péptido A con la secuencia aminoácida de VLELMHPH, que se localiza entre los aminoácidos 778 al 786 con un score de antigenicidad de 1.11 y de accesibilidad de 0.165. Debido que la estructura de las proteínas puede facilitar la comprensión mecánica de su función. El desarrollo de métodos computacionales para predecir las estructuras tridimensionales de la secuencia proteica ha sido de gran ayuda han sido de gran ayuda en casos en donde no se conoce la estructura cristalizada, tal como es el caso de TLN1m. Con la finalidad de confirmar la accesibilidad del péptido A se desarrollo el diseño 3D de TLN1m, la cual fue modelada a partir de AlphaFold2 (AF2). Como primer paso este algoritmo utilizó más de 7, 000 secuencias disponibles en la base de datos de referencia, con la finalidad de realizar alineamientos múltiples con el metodo de detección por homología (HMMer y HHblits); (**Fig. 16A**) con lo cual, un modulo separado genera un mapa de contacto, la abundancia de las secuencias disponibles y la calidad de las secuencias no covalentes, para predecir un *score* de calidad llamado pLDDT. El mapa pLDDT interpreta como las distancia entre las posiciones nativas y predichas 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, el cual se muestra como mapa de calor (Jumper et al., 2021; Mirdita *et al.*, 2021) (**Fig.16B**). Como se observa en la **Fig. 16A** y **Fig. 16B**, la confianza en la predicción estructural de TLN1m por parte de AF2, se encuentra en la parte superior izquierda del plegamiento, aproximadamente a partir de aminoácido uno hasta el 500. Esto se debe principalmente a la disponibilidad de información en la base de datos con la que trabaja el algoritmo. Finalmente, en el modelo tridimensional de AF2 se detectó la localización del péptido A (**Fig. 16C**), al cual se le añadieron cuatro MAP's elegidas como coadyuvante en el extremo C-terminal de acuerdo con lo reportado anteriormente (Posnett et al., 1988; Tam, 1988)

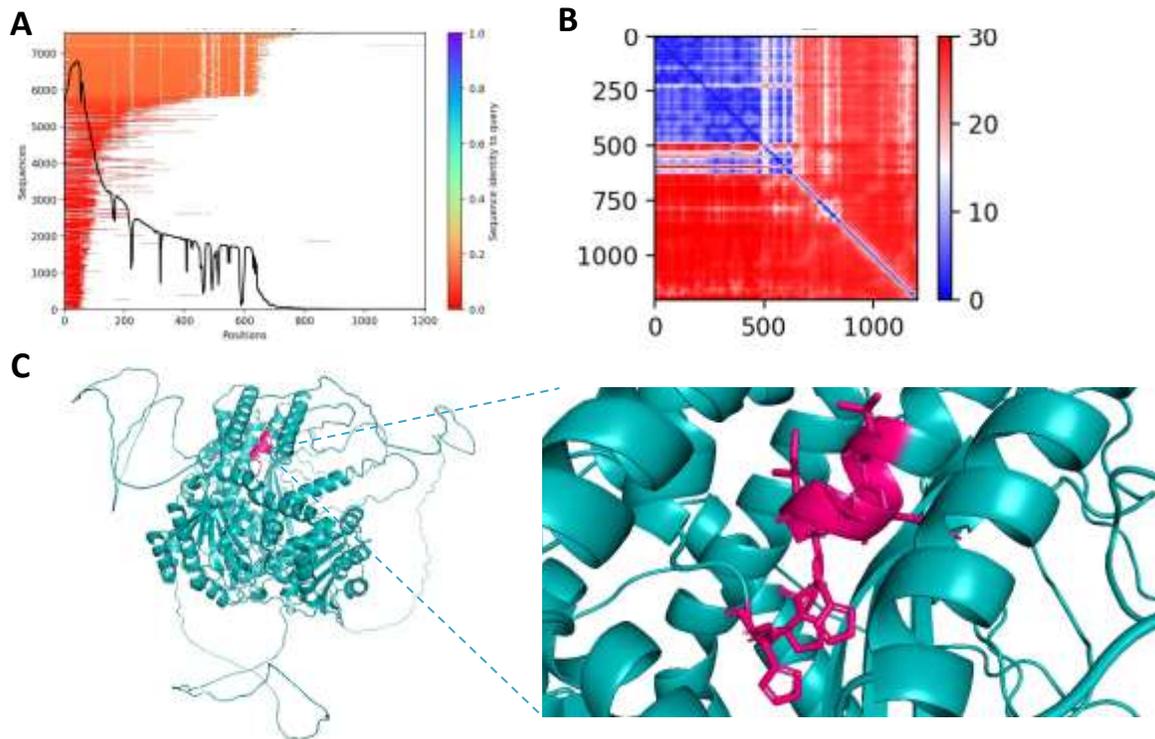


Figura 16. Modelo de la estructura 3D de Toxolisina 1 madura (TLN1m). A) Histograma de las secuencias utilizadas, B) Mapa de calor del modelado de TLN1m y C) Ubicación del PPA (VLELIMHPH) en el modelo 3D de la proteína obtenido del servidor AlphaFold2

Por otra parte, se realizó el análisis de epítomos para células T de TLN1m, a fin de determinar secuencias peptídicas que activarían tanto a los linfocitos T CD4+

(Epítipo HTL) y T CD8+ (Epítipo CTL) . Para ello se siguió el mismo procedimiento anterior utilizando el servidor IEDB y las herramientas de predicción de secuencias peptídicas con capacidad de unión a moléculas MHC-I y MHC-II, que pueden ser potencialmente reconocidos por el TCR de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y cooperadores (CD4+), respectivamente, provocando su activación. La secuencia candidata para unión a moléculas MHC-I fue, VRLLVLRSSIHR (Epítipo CTL), que se localiza a partir del aminoácido 1219 al 1232 y la secuencia para unión a moléculas MHC-II fue, IPSPMELGVTM (Epítipo HTL), se encuentra entre el aminoácido 722 y 732. Una vez identificadas las secuencias de interés, se realizó el modelado 3D a partir de AF2 (**Fig.17A**), el cual genero un mapa de calor a partir de los alineamientos múltiples con las secuencia disponibles de las bases de datos de referencia. Como se observa en la **Fig. 17B**, la confiabilidad se encuentra mayormente en el centro del plegamiento y, en menor medida, en los extremos. Ambas secuencias se unieron utilizando enlazadores GGG que se añadieron en la posición intraepitope, enlazando así los epítipos HTL y CTL; adicionalmente la construcción contiene un dominio RGD en el extremo N-terminal (Yano et al., 2003, 2005)

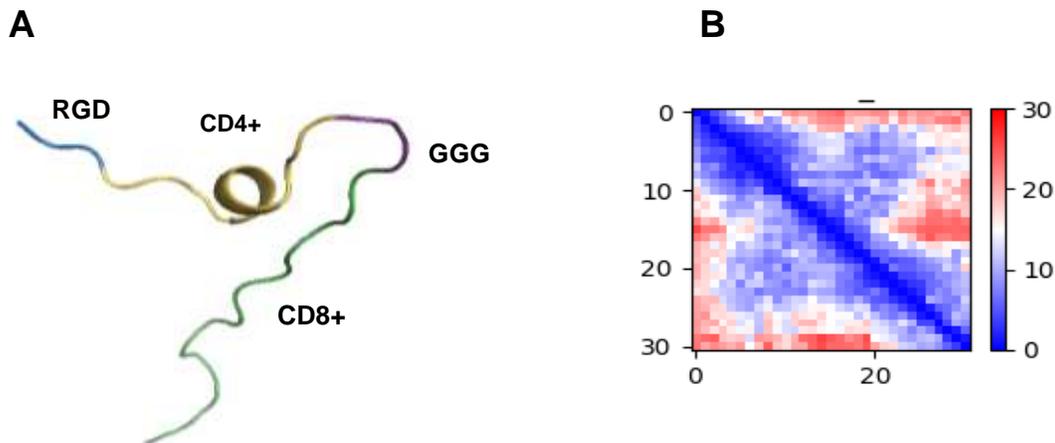


Figura 17. Modelo de la estructura 3D del péptido B para la activación de células T CD8+ y T CD4+. A) El modelo 3D obtenido del servidor AlphaFold y B) Mapa de calor del modelado del dipéptido

A fin de determinar que los epítomos seleccionados de TLN1 fueran exclusivos de esa proteína y no presentaran reactividad cruzada con secuencias similares en otras proteínas diferentes de *T. gondii* o de humano o de ratón, se realizó un alineamiento múltiple de secuencia con las especies *T. gondii* (**Anexo I**), *Homo sapiens* (**Anexo II**) y *Mus musculus* (**Anexo III**). La secuencia completa de la TLN1 se encontró prácticamente con un 100 % de cobertura e identidad para la mayoría de cepas de *T. gondii*. Sin embargo, en el caso de humano se encontró una similitud con la enzima degradativa de insulina isoforma 3 e isoforma X2 con valores del 50 % para cada una y en ratón con la enzima degradativa de insulina isoforma X2 con un 48 % de cobertura de secuencia e identidad particularmente en las regiones que corresponden a la de actividad de proteasa, particularmente con los dos dominios tipo insulina o peptidasa M16A que abarca los residuos 1424 al 1625 y del 72 al 712 de la TLN1 (**Fig. 18**), y que en consecuencia fueron descartados para ser considerados en la selección de las secuencias del PPA y PPB. Adicionalmente no se consideró el extremo C-terminal debido a que durante la maduración proteolítica de TLN1, esta zona es escindida antes de llegar a las roptrias.

En relación con la secuencia del PPA se realizó un Blast P frente a las especies mencionadas anteriormente (**Anexo IV**), con la finalidad de que los anticuerpos generados contra la TLN1m, no reaccionarán de manera inespecífica con proteínas en humano o ratón o con otras proteínas no relacionadas de *T. gondii*.

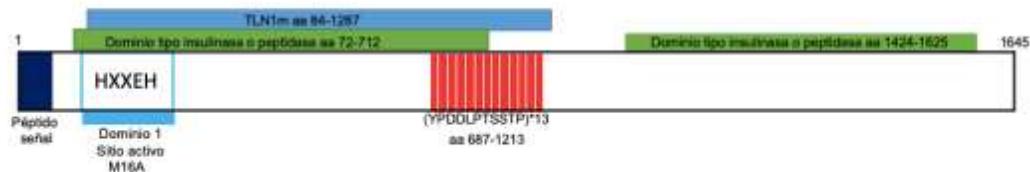


Figura 18. Diagrama de TLN1. Incluye un péptido señal predicho, el dominio de unión al zinc (HXXEH) necesario para la catálisis, dos dominios con homología a dominios similares a la insulina o peptidasa M 16 como sugiere la base de datos de dominios conservados del NCBI. Además, TLN1 tiene 13 repeticiones en tándem de 11 aminoácidos. Figura modificada de (Hajagos et al., 2012).

Los parámetros de alergenicidad y fisicoquímicos predichos del PPA y PPB

Todas las pruebas de alergenicidad realizadas por los servidores AllerTOP v2.0 y AllergenFP tanto para el PPA como PPB mostraron que las construcciones diseñadas no son un alérgeno, descartando la presencia estornudos, inflamación, tos y asma alérgica, entre otros causados por la hipersensibilidad del sistema inmune ante agentes externos. Por otra parte, los parámetros fisicoquímicos mostraron que su peso molecular de 1.08 KDa (PPA) y de 3.41 KDa (PPB), recientemente. Sin embargo, se reportado que un peso superior a 18,974 KDa, beneficia la antigenicidad de la secuencia de interés (Foroutan *et al.*, 2020). El valor pl teórico para el PPA y PPB de 5.98 y 12, respectivamente. Estos valores indican la naturaleza ácida y básica de las construcciones como se ha reportado por Foroutan *et al.*, 2020 con valores de 6.65 y por Ghaffari *et al.*, 2020 con un pl de 9.30. La vida media se estimó en 100 h y 1 h en reticulocitos de mamíferos in vitro, >20 h y 2 min en *E. coli in vivo*. El índice de inestabilidad de los PPA y PPB fue de 69.33 y 96.72, lo que clasifica la proteína como poco estable (un índice de inestabilidad >40 indica inestabilidad). Además el valor del índice alifático fue de 162.22 (PPA) y 1.03.55 (PPB), mientras que la puntuación GRAVY para el PPA y PPB fue de -0.744 y -0.15, respectivamente indicando su capacidad hidrófila (Ghaffari *et al.*, 2020) (**Tabla 2**). De manera general, los parámetros fisicoquímicos son similares a los reportados anteriormente (Foroutan *et al.*, 2020, Ghaffari *et al.*, 2020; Onile *et al.*, 2020). No obstante, se debe considerar la inestabilidad predicha de los péptidos, por lo que las construcciones podrian ser útiles y adecuadas para su uso en modelos experimentales.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas

	pl	Índice de inestabilidad	Vida media in vitro	Vida media in vivo	Índice alifático	PM (KDa)	GRAVY
PPA	5.98	69.33	100 h	>20 h	162.22	1.08	0.744
PPB	12	96.72	1 h	2 min	103.55	3.41	- 0.15

Caracterización inmunoquímica de PPA, PPB y TLN1m

Una vez que se recolectaron los sueros de los animales inmunizados con los respectivos péptidos, se realizó el inmunorreconocimiento de un suero representativo con los péptidos PPA y PPB y con la proteína completa TLN1m presente en extractos totales de *T. gondii*. En la **Figura 19** se muestra el WB con un suero representativo de uno de los animales inmunizados contra los péptidos PPA y PPB respectivamente. Se corrieron 10 µg de cada péptido en un PAGE-SDS al 15 % y posteriormente los geles se transfirieron a una membrana de NC como se detalla en la sección de metodología. En el WB se detecta una banda de 1.08 KDa para el PPA y una banda de 3.41 KDa para el PPB. Como control de carga se realizó un SDS-PAGE de cada péptido administrado (**Fig.19**). Esto demostró que la respuesta de Ac fue específica o mayoritaria hacia el péptido inoculado.

Por otra parte, utilizando los mismos antisueros contra cada péptido, se logró identificar a la TLN1m en ET y en E/S con un peso molecular de 181 KDa (**Fig. 20**). Lo que indica que lo Ac generados son policlonales específicos de esta proteína. Además, la presencia de la TLN1m en los productos de E/S demuestra que es una proteína que es secretada/excretada por el parásito.

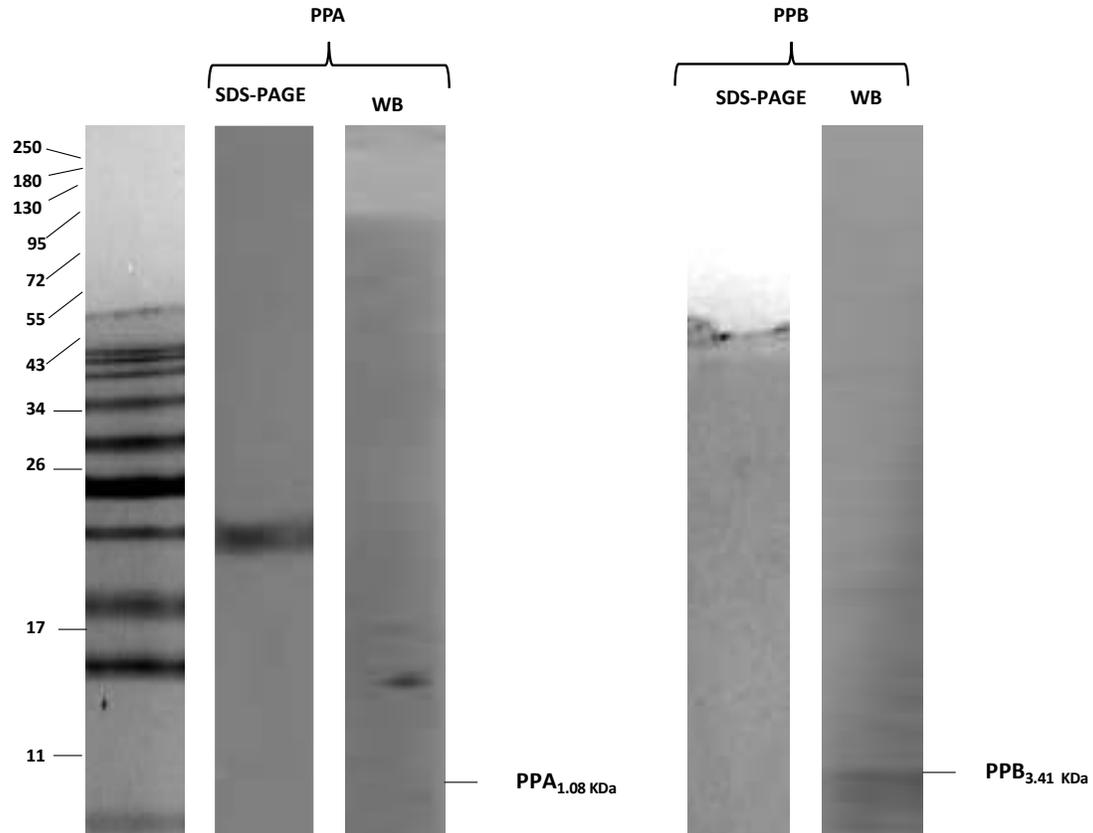


Figura 19. Identificación del PPA y PPB con los sueros representativos correspondientes a cada Ag. El Western Blot de PPA y PPB (10 mg) con antisuero correspondientes muestra la migración de PPA al tamaño previsto de 1.08 KDa y de PPB a 3.41 KDa. Los SDS-PAGE (7.5 %) se utilizaron como control positivo de la presencia de los péptidos evaluados. n=3.

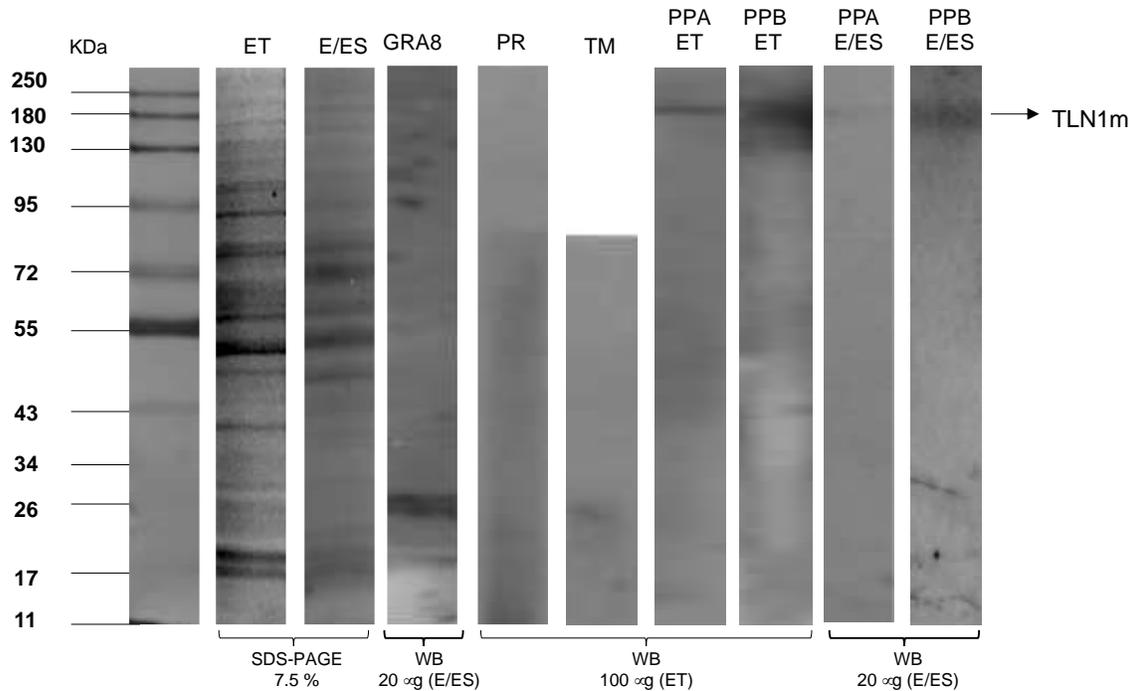


Figura 20. Identificación del TLN1m con los sueros correspondientes a cada Ag. El Western Blot de ET y de E/ES de *T. gondii* con antisuero TLN1m muestra la migración de TLN1m al tamaño previsto de ~180 kDa (TLN1₁₈₁). Los SDS-PAGE se utilizaron como control de carga y como control negativo suero pre inmune (PR) y Titer Max (TM) n=3.

Una vez determinada la especificidad de los Ac, se realizó la localización de TLN1m en parásitos extracelulares mediante IF y utilizando un suero representativo. Se observó la distribución de la TLN1m evidenciada con FITC como vesículas asociadas a la superficie de los Taks y hacia el extremo posterior, sugiriendo la secreción de esta proteína (**Fig. 21**) Los núcleos se marcaron con DAPI. De acuerdo con la disposición de los núcleos y de la marca de la TLN1m, es evidente que esta marca se dirige hacia el extremo posterior, toda vez que los núcleos en los Taks están ubicados hacia el extremo posterior del parásito. El control negativo de suero pre inmune, no mostró reactividad de los parásitos evidenciando la especificidad de los sueros inmunes. Esta aparente secreción/excreción de TLN1m, está corroborada por su detección en productos E/S mediante WB antes descrito (**Fig.20**)

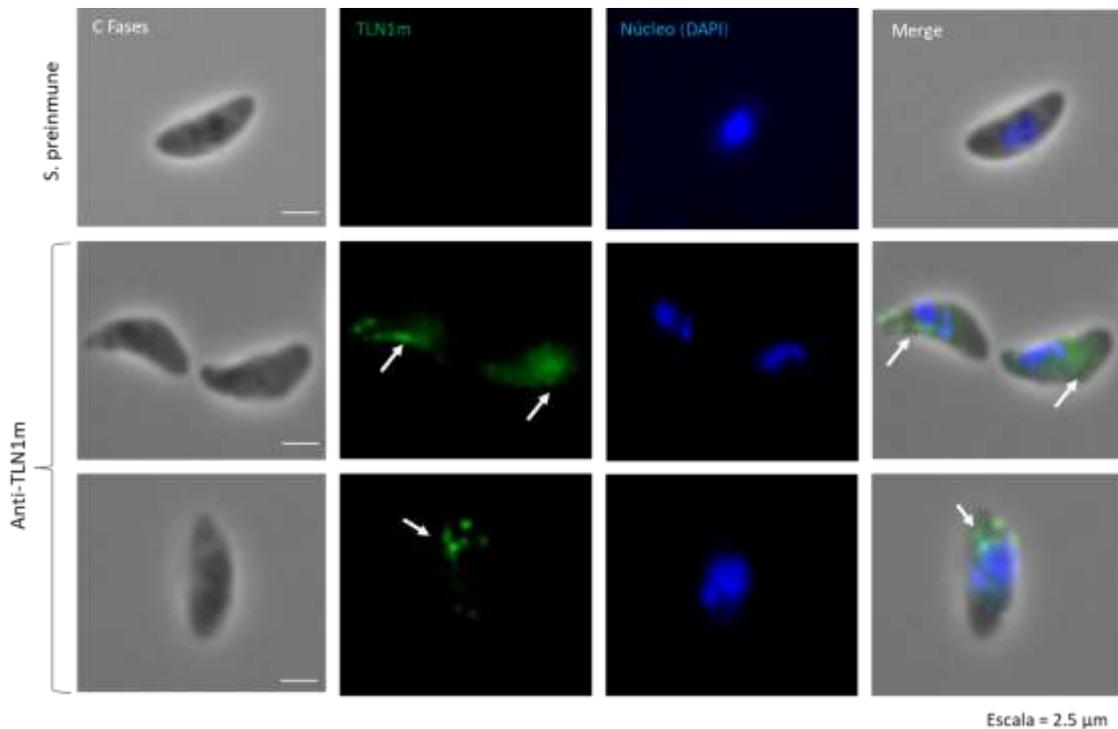


Figura 21. Localización de TLN1m en Taks extracelulares. Los Taks fueron fijados se procesaron para inmunofluorescencia para la detección de la proteína TLN1m (FITC) y el núcleo (DAPI). Las flechas indican la ubicación de TLN1m y su coincidencia con la disposición hacia el extremo posterior. n= 3. Escala = 2.5 μ m

Por otra parte, se realizó la localización de TLN1m en Taks intracelulares, con la finalidad de observar la localización de esta proteína durante la proliferación. La inmunolocalización de TLN1m se hizo a diferentes tiempos de la proliferación, de tal manera que se tenían VPs con 2, 4, 8 y 16 parásitos intravacuolares (**Fig. 22**). Lo que se observó fue la detección constante de la TLN1m en la zona apical de todos los parásitos tal y como se muestra en las flechas de la **Fig. 22**. Como se esperaba, el control negativo de suero pre inmune no mostró reactividad de los parásitos o en las células hospederas. En relación con la TLN1m se propone que es secretada desde la parte apical, y por su ubicación en las roptrias, reportada por Hajagos *et al.*, 2012 a partir de una colocalización con ROP13. Sin embargo, no es absoluta sugiriendo que esta proteína podría estar almacenada en los micronemos. En contraste con lo observado en los Taks extracelulares, en los parásitos intravacuolares, no se detectan vesículas fluorescentes lo cual podría sugerir que, durante la proliferación intracelular, no se secreta esta proteasa, ya que tampoco se

detecta en el espacio intravacuolar o en el citoplasma de la célula invadida. Posiblemente en el estadio extracelular pudiera haber señales que inducen su secreción tal vez para contribuir en el proceso de invasión o en el de diseminación tisular del parásito

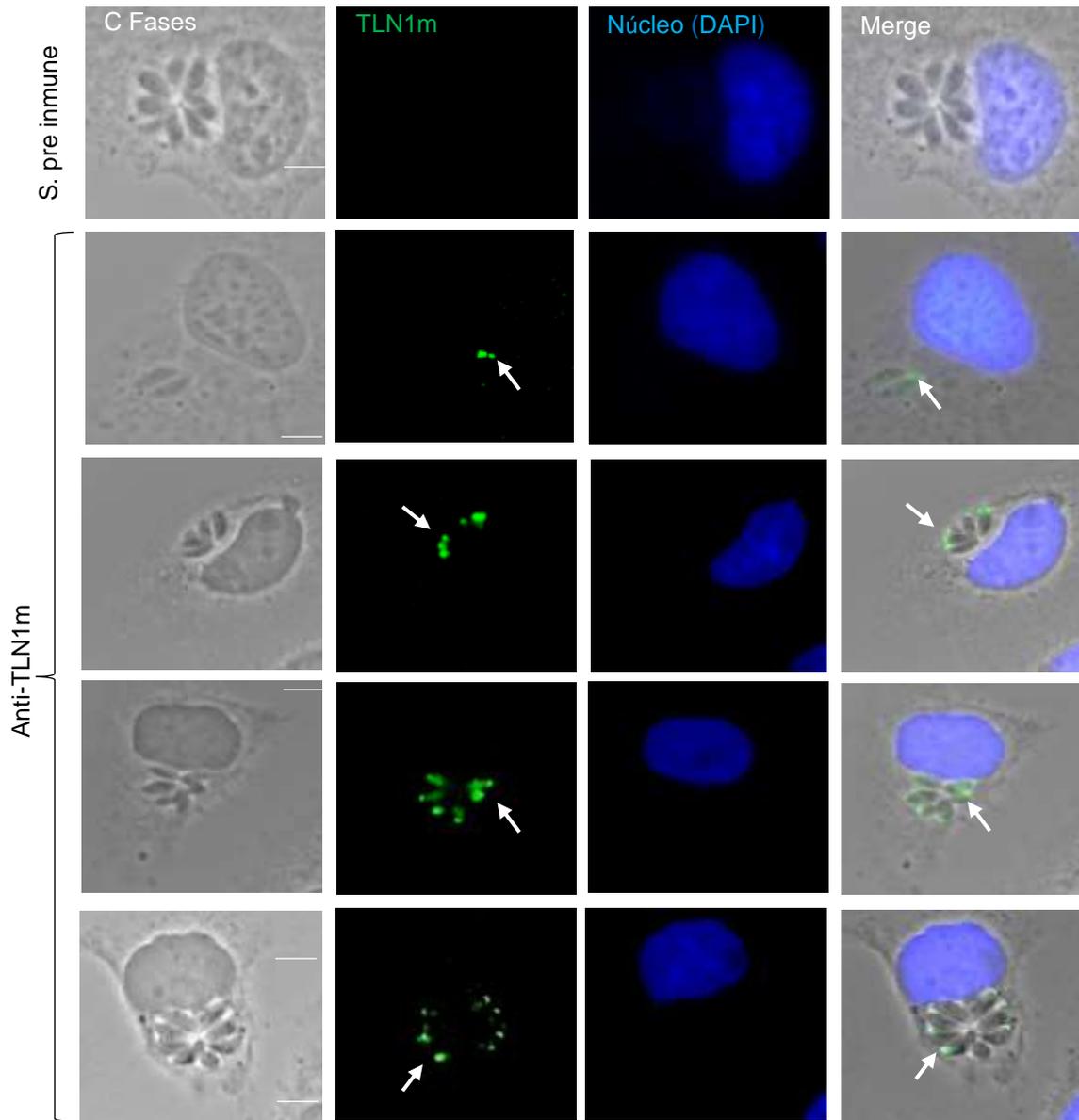


Figura 22. Distribución de TLN1m en los Taks durante su proliferación en células HEP-2. Contraste de fases, Verde: TLN1 marcado con FITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las flechas indican la ubicación apical de TLN1m en los parásitos. n= 3. Escala= 2.5 μ m.

Expresión de inmunoglobulinas inducidas por PPA y PPB

Se analizó la producción de los isotipos de inmunoglobulinas, mediante la técnica de ELISA de cada muestra colectada de suero pre inmune e inmune. Mediante el uso de un suero de referencia de ratón (Bethyl. No. Cat. RS10-101) que contiene cantidades conocidas de diferentes isotipos y subclases de anticuerpos, fue posible determinar de forma cuantitativa, las concentraciones de algunos isotipos y subclases de inmunoglobulinas. Para las propiedades del suero de referencia de ratón, favor de revisar la sección de metodología. En relación con la IgM, la inmunización de los ratones con los péptidos de PPA y PPB indujo la producción de anticuerpos específicos del isotipo IgM de forma significativa al día 56 del protocolo de inmunización. Para el PPA, que fue diseñado para activar a los linfocitos B, se obtuvieron 53.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgM (**Fig. 23A**) mientras que para el PPB diseñado para favorecer el reconocimiento y unión a moléculas MHC-I y MHC-II, que pueden ser potencialmente reconocidos por el TCR de linfocitos T CD8+ y CD4+, se produjeron 5.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgM (**Fig. 23B**). En contraste, con los controles de adyuvante (TM) y de PBS no se detectó la producción de IgM específica para los péptidos correspondientes.

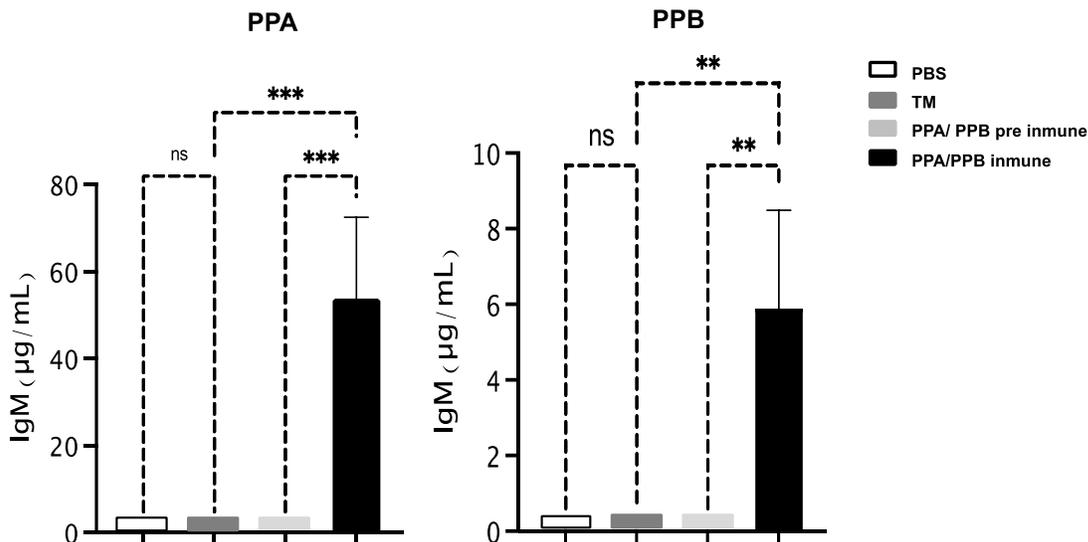


Figura 23. Análisis de los isotipos de IgM específicos para PPA y PPB, en sueros pre inmunes e inmunes. PPA) Corresponde a ratones inmunizados con PPA + TM y **PPB)** corresponde a ratones inmunizados con PPB + TM. Para los controles (TM y PBS), los ratones fueron inoculados con PBS o con TM. La cuantificación se realizó con ayuda de un

suero de referencia de la compañía Bethyl Laboratories INC(Waltham, MA). Las barras representan el promedio (n=10) ± error estándar ^{***}, ^{**}vs. control (p<0.001 y p<0.01, respectivamente).

Similarmente, se realizó la dererminación de los niveles de IgG en los sueros pre inmunes e inmunes recolectados. La inmunización con PPA y PPB produjo un incremento significativo de los niveles de IgGs específicas para cada péptido inmunizado al día 56 del protocolo de inmunización. La inmunización con el PPA generó 2.03 µg/mL de IgG (**Fig. 24A**) mientras que el PPB produjo 0.31 µg/mL de IgG (**Fig. 24B**). Respecto a los controles de adyuvante (TM) y PBS no se detectó una producción de IgG específica de los Ag correspondientes.

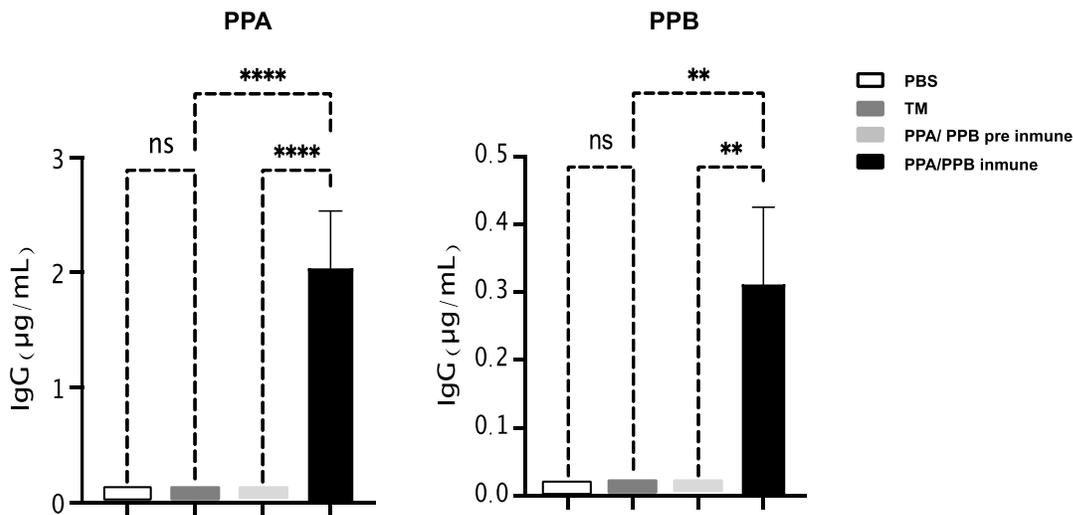


Figura 24. Análisis de los isotipos de IgG específicos para PPA y PPB, en sueros pre inmunes e inmunes. PPA) corresponde a ratones inmunizados con PPA + TM y PPB) corresponde a ratones inmunizados con PPB+ TM. Para los controles (TM y PBS), los ratones fueron inoculados con PBS o con TM. La cuantificación se realizó con ayuda de un suero de Referencia de la compañía Bethyl Laboratories INC(Waltham, MA). Las barras representan el promedio (n=10) ± error estándar. ^{**}, ^{****}vs. control (p<0.01y p<0.0001, respectivamente).

Expresión de citocinas inflamatorias inducidas por PPA y PPB

Debido al papel que juegan las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias durante la infección por *T. gondii*, se decidió estudiar la expresión de las diversas citocinas después de la inmunización con PPA y PPB.

En relación con las citocinas proinflamatorias, se determinaron los niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2.

IFN- γ

Primeramente, se realizó la determinación de IFN- γ mediante citometría de flujo a cada suero pre inmune e inmune del PPA al día 56 del protocolo de la inmunización (**Fig. 25A**). En la Figura 25A, se muestran los niveles promedio basales e inmune de 11.26 pg/mL y 9.47 pg/mL, respectivamente, los cuales estadísticamente no muestran diferencias significativas. Por otra parte, con los sueros pre inmunes e inmunes de ratones inmunizados con el PPB (**Fig. 25B**) se obtuvo un valor promedio basal de 7.95 pg/mL. Interesantemente, aunque los valores de IFN- γ en los sueros inmunes mostraron un incremento de 12.52 pg/mL, la diferencia con respecto al valor basal, no fue estadísticamente significativa. De manera más específica se muestran las concentraciones de IFN- γ producida por cada grupo de ratones inmunizados con su respectivo Ag y los grupos control de adyuvante (TM) y de PBS (**Tabla 3**).

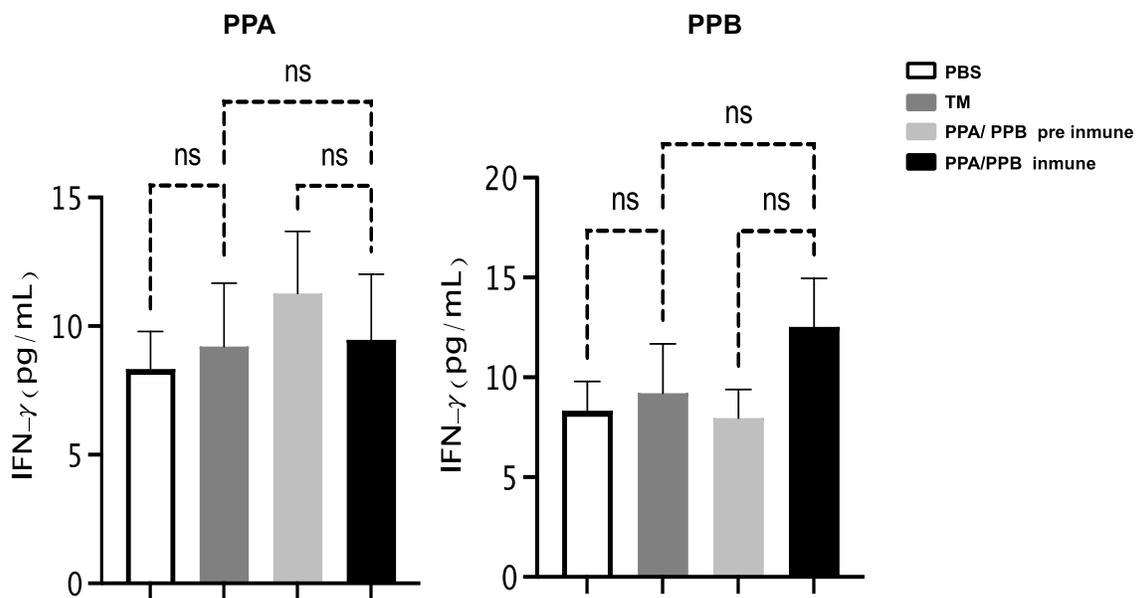


Figura 25. Perfil de IFN- γ en ratones inmunizados con PPA y PPB. Al día 56 del protocolo de inoculación, se recolectaron los sueros de los animales inmunizados y controles y se determinó la concentración de IFN- γ por medio citometría de flujo. Las barras representan el promedio (n=10) \pm error estándar. ns (no significancia) vs control (p<0.05).

Tabla 3. Nivel de IFN- γ producido por cada ratón inmunizado con PPA y PPB

Ratón	IFN- γ (pg/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	3.82	7.1	3.82	16.94	9.67	8.53	15.33	3.82	7.77	6.52
TM	25	9.44	21.36	9.86	3.82	3.82	3.82	7.34	3.82	3.82
PPA pre inmune	3.82	16.11	17.61	7.19	3.82	12.93	21.37	3.82	3.83	22.19
PPA inmune	9.61	4.32	20.73	4.43	5.16	3.82	12.87	3.82	3.82	26.12
PPB pre inmune	5.82	3.82	8.59	14.92	4.26	16.01	3.82	9.25	9.23	3.82
PPB inmune	6.42	17.86	3.82	9.19	26.15	17.04	7.27	8.00	7.14	22.38

TNF- α

Posteriormente se realizó la determinación del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , que es otra citocina proinflamatoria en los animales inmunizados con PPA y PPB. Los resultados de citometría de flujo mostraron los niveles basales en 119.91 pg/mL y los niveles inmunes de 142.96 pg/mL en ratones inmunizados con el PPA (**Fig. 26A**). No obstante, se nota una tendencia a incrementarse los niveles de la citocina, el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa. Similarmente, la inmunización con el PPB (**Fig. 26B**), no mostró diferencias significativas entre la

concentración basal de 85.51 pg/mL e inmune de 121.87 pg/mL. Adicionalmente, se muestran los niveles de TNF- α detectada por cada ratón inmunizado con los Ags correspondientes y el grupo control (**Tabla 4**).

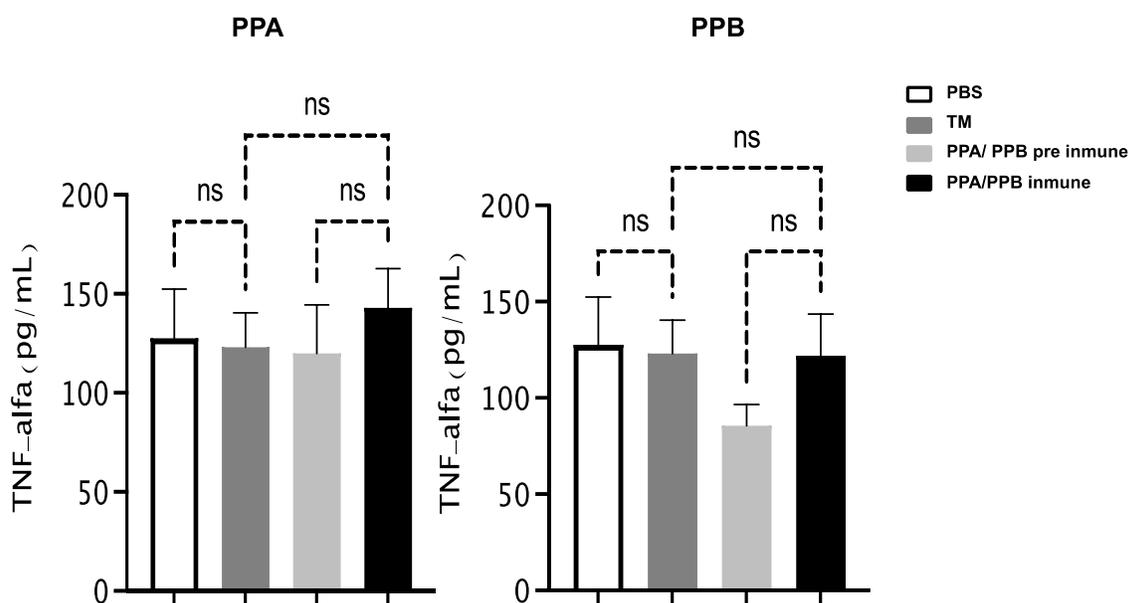


Figura 26. Perfil de TNF- α en ratones inmunizados con PPA y PPB. Al día 56 del protocolo de inoculación, se recolectaron los sueros de los animales inmunizados y controles y se determinó la concentración de TNF- α por medio citometría de flujo. Las barras representan el promedio (n=10) \pm error estándar ns (no significancia) vs control ($p < 0.05$).

Tabla 4. Nivel de TNF- α producido por cada ratón inmunizado con PPA y PPB

Ratón	TNF- α (pg/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	70.12	70.12	134.31	70.12	299.44	70.12	70.12	138.53	222.97	130.7
TM	70.12	218.18	179.72	70.12	180.68	136.46	104.46	130.03	70.12	70.12
PPA pre inmune	70.12	70.12	74.34	185.31	115.37	71.55	154.6	307.54	72.6	77.56
PPA inmune	187.72	129.98	70.12	122.5	244.3	134.6	197.03	203.12	70.12	70.12
PPB pre inmune	70.12	70.12	98.61	70.12	83.97	70.12	70.12	70.12	70.12	181.72
PPB inmune	70.12	70.12	152.75	70.12	243.31	143.56	232.19	70.12	96.34	70.12

IL-6

Por otro lado, se determinó la concentración de IL-6 tanto en los sueros pre inmune como inmunes. La IL-6 es una citocina antiinflamatoria a través de efectos inhibidores sobre $TNF\alpha$ e IL-1, también promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas, sin embargo, también se ha propuesto que tiene una actividad proinflamatoria.

En relación con la determinación de IL-6 en los sueros inmunes y pre inmunes después de la inmunización de los ratones con PPA, se obtuvo un valor basal promedio de 10.65 pg/mL en los sueros pre inmunes, mientras que, en los sueros inmunes, fue de 12.04 pg/mL. El análisis estadístico no demostró diferencias significativas en los ratones control y los inmunizados con cualquiera de los dos péptidos (**Fig. 27A**). Similarmente, en los ratones inmunizados con el PPB, los sueros pre inmunes mostraron un valor de 12.43 pg/mL y los sueros inmunes, un valor promedio de 11.49 pg/mL. Ambos valores no presentaron diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 27B**). Debido a la variación extraordinaria en las concentraciones detectadas en algunos animales, se decidió descartarlos del estudio (**Tabla 5**).

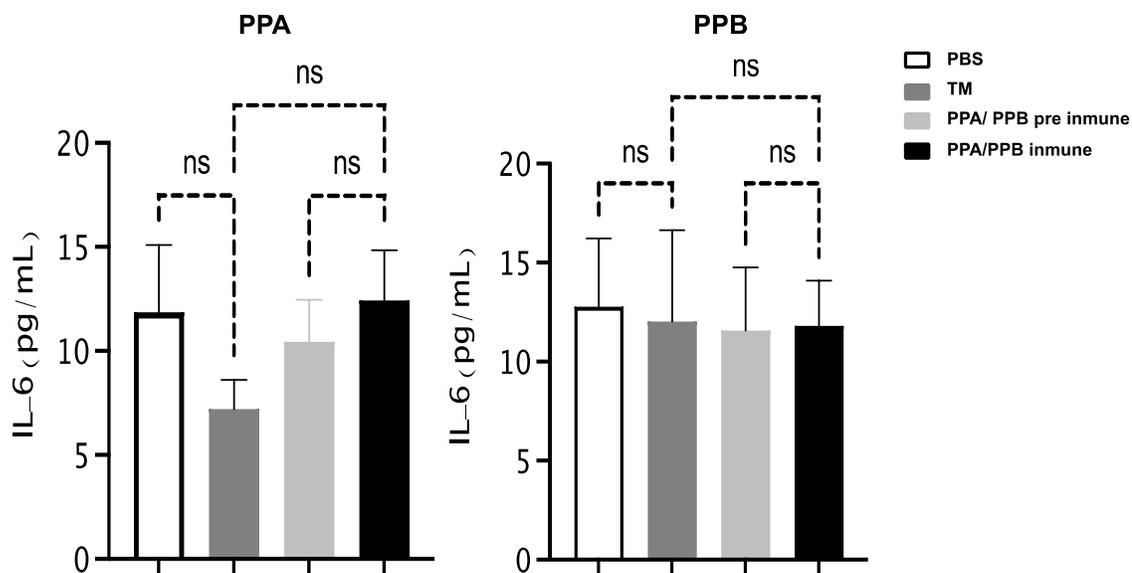


Figura 27. Perfil de IL-6 después de la inmunización de ratones con PPA y PPB. Al día 56 post-inmunización con PPA y PPB, se hizo la determinación sérica de IL-6 en los sueros inmunes y los sueros pre inmunes por medio citometría de flujo. Las barras representan el promedio (n=10) ± error estándar; ns (no significancia) vs control (p<0.05).

Tabla 5. Nivel de IL-6 producida por cada ratón inmunizado con PPA y PPB

Ratón	IL-6 (pg/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	3.73	3.73	19.61	4.81	12.39	3.73	22.38	99.39*	33.14	11.38
TM	3.73	3.73	15.77	10.62	5.55	8.45	3.73	4.24	51.84*	12.6
PPA pre inmune	8.49	17.38	6.22	8.75	3.73	15.89	16.13	20.32	3.73	3.73
PPA inmune	15.89	8.83	5.94	28.3	18.28	8.84	3.73	16.45	4.47	13.58
PPB pre inmune	3.73	13.93	3.73	3.73	28.98	10.36	29.11	3.73	4.58	13.79
PPB inmune	14.64	22.04	3.73	19.16	10.03	6.40	5.61	22.36	4.42	9.67

*Corresponde a valores descartados debido a variaciones severas.

IL-2

Finalmente, se determinaron los niveles de la citocina proinflamatoria IL-2 en los sueros pre inmunes e inmunes de cada grupo experimental. Los resultados indicaron un promedio basal de 24.17 pg/mL en los sueros pre inmunes contra un valor promedio de 21.51 pg/mL en los sueros inmunes a PPA (**Fig. 28A**). No obstante, se muestra una disminución de IL-2 después del protocolo de

inmunización, los datos no fueron relevantes, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas. Similarmente en los ratones inmunizados con PPB, se obtuvo un valor basal promedio de 28.74 pg/mL para los sueros pre inmunes y valores en los sueros inmunes de 18.73 pg/mL no mostrando diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 28B**). De forma individual se muestran los niveles de IL-2 producida por cada ratón inmunizado con los Ags correspondientes y el grupo control (**Tabla 6**).

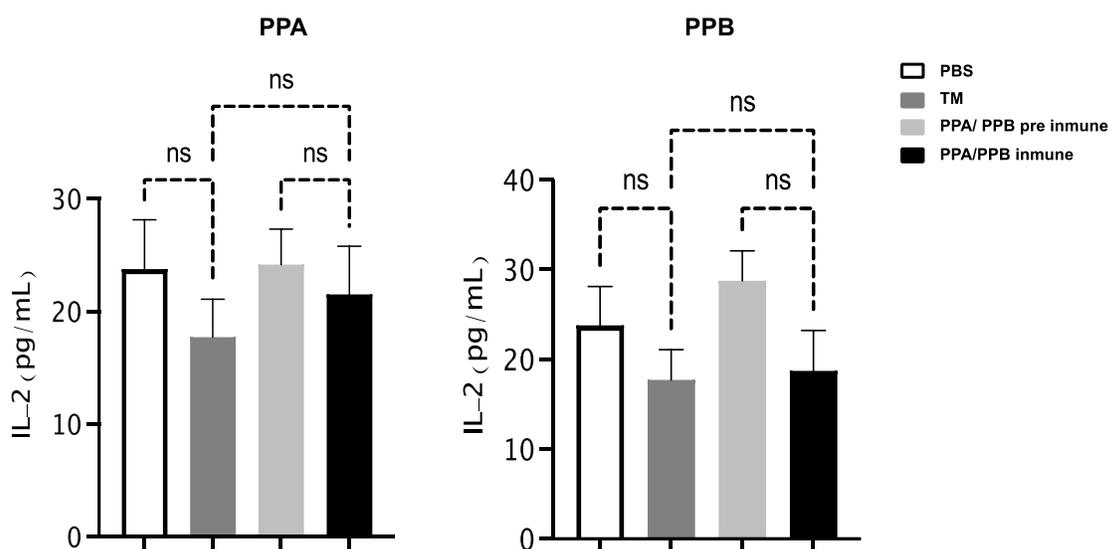


Figura 28. Perfil de IL-2 generado después de la inmunización de ratones con PPA y PPB. Al día 56 post-inmunización con PPA y PPB, se hizo la determinación sérica de IL-2 en los sueros inmunes y los sueros pre inmunes por medio citometría de flujo. Las barras representan el promedio ($n=10$) \pm error estándar ns (no significancia) vs control ($p < 0.05$).

Tabla 6. Nivel de IL-2 producida por cada ratón inmunizado con PPA y PPB

Ratón	IL-2 (pg/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	7.06	48.98	8.11	23.39	23.71	23.53	38.12	7.06	26.38	31.34
TM	15.93	7.06	19.31	13.11	10.41	29.23	8.02	31.42	35.46	7.06
PPA pre inmune	20.37	21.36	33.44	29.84	19.22	7.06	12.28	39.35	27.99	30.83
PPA inmune	49.23	7.06	38.95	23.28	23.62	18.33	7.06	21.1	12.04	14.54
PPB pre inmune	33.79	7.06	15.00	34.05	22.86	37.07	39.09	28.46	35.04	35.04
PPB inmune	11.38	47.71	7.06	35.35	7.06	7.06	11.20	30.42	17.93	12.16

Expresión de citocinas regulatorias inducidas por PPA y PPB

Una vez determinadas las citocinas proinflamatorias, se realizó el análisis de las citocinas regulatorias antiinflamatorias IL-10 y IL-4 a partir de citometría de flujo tras la inmunización de PPA y el PPB.

IL-10

Los valores de IL-10 en el grupo administrado con el PPA fue de 8.13 pg/mL en los sueros pre inmunes mientras que en los sueros inmunes se obtuvo un valor de 9.16 pg/mL, lo que muestra que la inmunización con PPA, no activó los mecanismos involucrados en la expresión de IL-10, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas de los sueros pre inmunes con respecto a los sueros inmunes (**Fig. 29A**). Similarmente, en los sueros de los ratones inmunizados con PPB, presentaron un nivel promedio de 8.13 pg/mL mientras que en los sueros pre inmunes se obtuvo un valor promedio de 8.96 pg/mL, Al no haber diferencias estadísticamente significativas, se evidencia que en general se mantuvieron niveles basales de esta citocina (**Fig. 29B**).

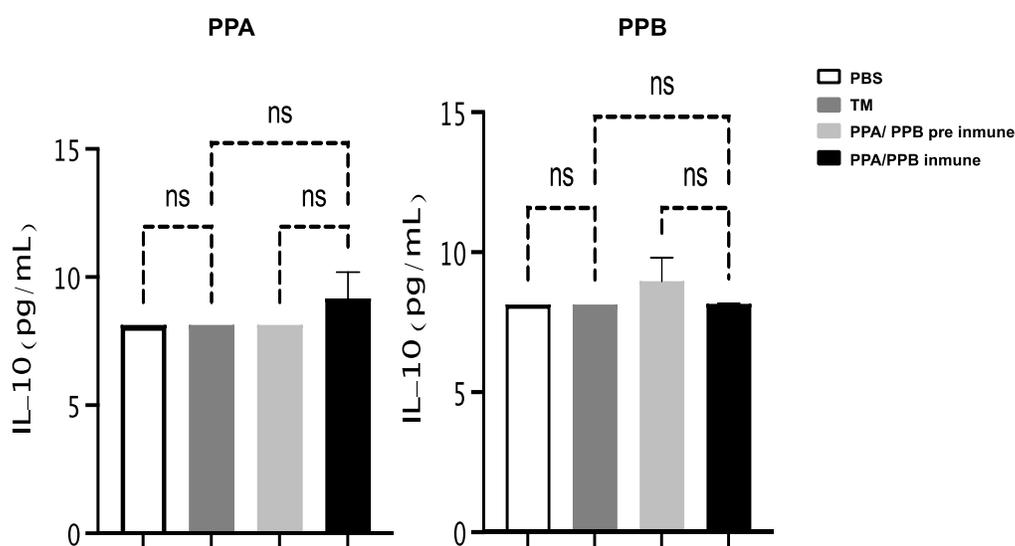


Figura 29. Perfil de IL-10 generado después de la inmunización de ratones con PPA y PPB. Al día 56 post-inmunización con PPA y PPB, se hizo la determinación sérica de IL-10 en los sueros inmunes y los sueros pre inmunes por medio citometría de flujo. Las barras representan el promedio (n=10) ± error estándar ns (no significancia) vs control (p<0.05).

IL-4

Otra citocina de reguladora antiinflamatoria de interés es IL-4. Después de la inmunización con PPA se encontró en los sueros pre inmunes un valor promedio de IL-4 de 9.79 pg/mL mientras que en los sueros inmunes, un valor de 13.13 pg/mL. Interesantemente, se observó un aumento significativo entre el grupo inmunizado con TM y el grupo PPA con un valor de 5.66 pg/mL y 13.13 pg/mL, respectivamente (**Fig.30A**).

Por otro lado, en relación con el grupo de ratones inmunizados con el PPB, se encontró que los sueros pre inmunes dieron un valor promedio de 8.99 pg/mL y en los sueros inmunes de 9.81 pg/mL, los cuales son indicativo de un mantenimiento basal, ya que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ambas muestras (**Fig. 30B**).

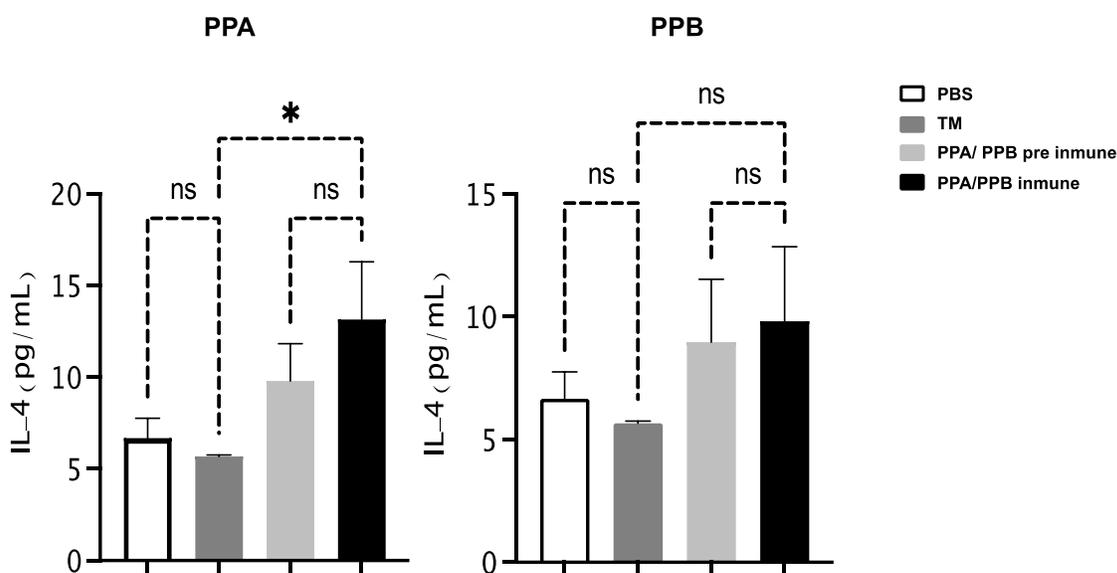


Figura 30. Perfil de IL-4 después de la inmunización con PPA y PPB. La expresión de IL-4 se evaluó en sueros pre inmune e inmune de cada grupo experimental. Las barras representan el promedio (n=10) \pm error estándar * vs control ($p < 0.05$).

Supervivencia ante el reto letal contra Taks.

Una vez finalizada la inmunización con los respectivos Ag (PPA y PPB), se realizó un reto mediante la inoculación de intraperitoneal de 1,000 Taks de la cepa RH, seguido de la evaluación de la supervivencia de los grupos experimentales en los

días siguientes. Los ratones inmunizados con PBS e infectados, murieron al día 8, los inmunizados con TM sobrevivieron un 40 % al día 35 post-infección y los ratones inmunizados con PPA + TM sobrevivieron un 30 % (**Fig. 31A**).

Para el PPB se siguió el mismo protocolo, donde los ratones inmunizados con PBS murieron al día 8 como se esperaba, los ratones inmunizados con TM siguieron sobreviviendo de forma muy similar al ensayo anterior. Sin embargo, los ratones inmunizados con el PPB+TM no sobrevivieron (**Fig. 31B**).

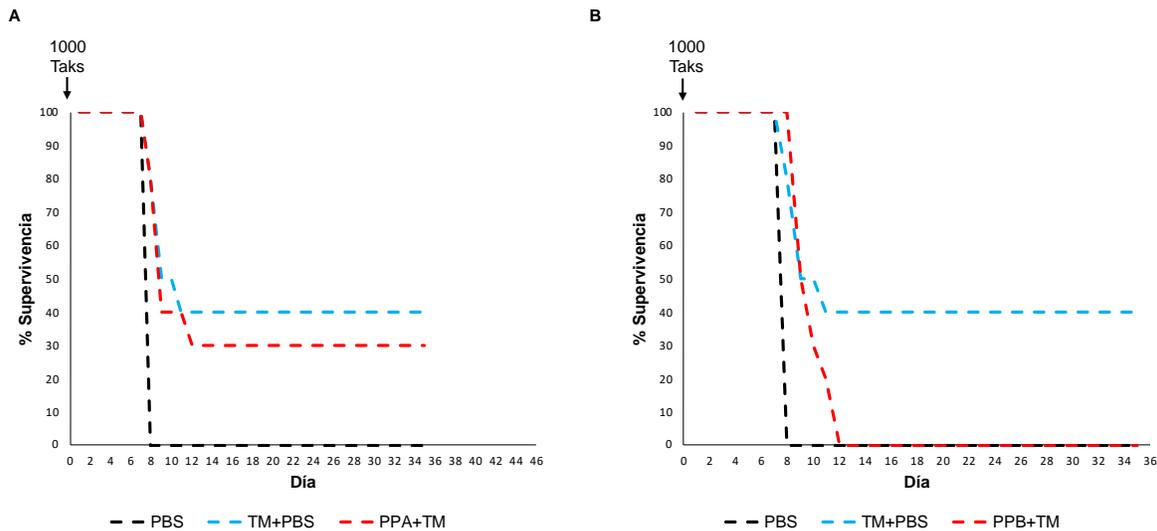


Figura 31. Respuesta de supervivencia de los ratones inmunizados con PPA y PPB ante un reto de infección con dosis letales de Taks. Todos los ratones fueron desafiados con 1,000 Taks de la cepa RH de *T. gondii* RH, una semana después de la última inmunización. Se supervisó la viabilidad de los animales durante todo el día y por los días necesarios hasta su muerte.

Expresión de inmunoglobulinas inducidas por PPA post-infección

Una vez realizado el proceso de inmunización y reto de supervivencia, se realizó la determinación de los isotipos de inmunoglobulinas IgM e IgG de los ratones sobrevivientes, mediante la técnica de ELISA. Los niveles específicos de IgM se incrementaron significativamente al día 15 post-infección generando 161.18 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 32A**) al igual que IgG con un valor de 15.01 $\mu\text{g/mL}$ (**Fig. 32B**). En contraste, en los controles no se detectó la producción de IgM e IgG a los Ag correspondientes.

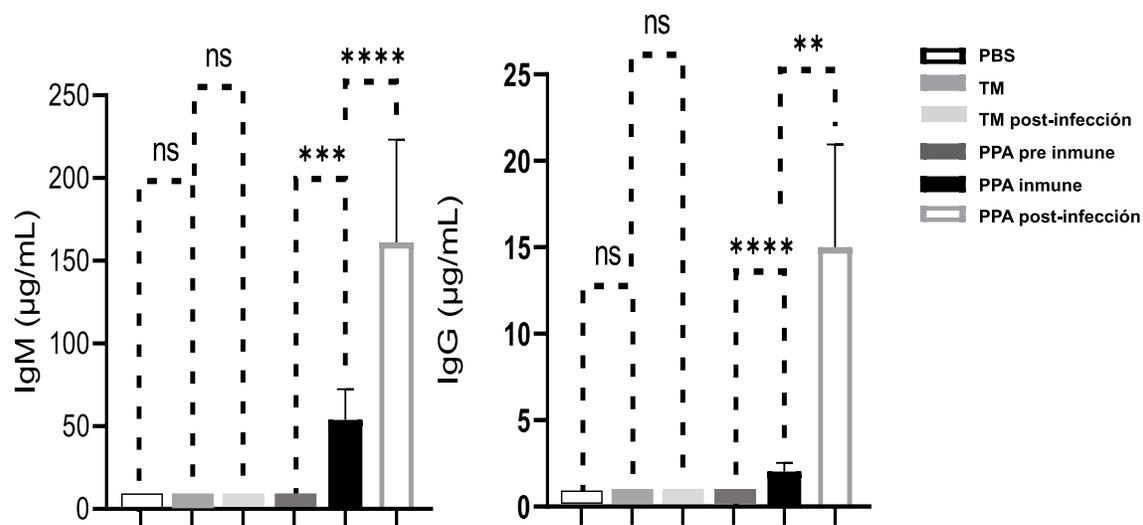


Figura 32. Análisis de los isotipos de IgM e IgG, en el suero pre inmune e inmune de los ratones inmunizados con PPA y PPB y después de la infección por *T. gondii*. Los controles fueron tratados con PBS y TM. Las barras representan el promedio (n=supervivencia) \pm error estándar **, ***, **** vs. control (p<0.01, p<0.001 y p<0.0001, respectivamente).

Expresión de citocinas inflamatorias inducidas por PPA post-infección

Durante la infección toxoplásmica, la inmunidad celular es un componente clave de la respuesta inmune frente a la infección. El patrón de citocinas que se presenta como resultado de la infección por el parásito nos da idea del tipo de respuesta, por esa razón, se decidió determinar los valores de IFN- γ (**Fig. 33A**), TNF- α (**Fig. 33B**), IL-6 (**Fig. 33C**) e IL-2 (**Fig. 33D**) en los sueros de los ratones sobrevivientes inmunizados con el PPA y los niveles de las citocinas, se compararon con los niveles de las mismas citocinas, pero en los sueros pre inmunes e inmunes. Los resultados mostraron en los ratones supervivientes a la primera dosis letal, una producción de IFN- γ significativa en comparación del grupo inmunizado con TM. Respecto a la cuantificación de TNF- α , en el suero de los animales inmunizados e infectados, se detectó un aumento de igual magnitud en los grupos inmunizados con PPA+TM y TM. En relación con IL-6 los valores determinados en los ratones inmunizados con PPA después de la infección, mostraron un aumento significativo respecto al grupo

con TM. Así mismo IL-2 aumento de manera significativa en los ratones que se les administró el PPA en comparación de los ratones del grupo control.

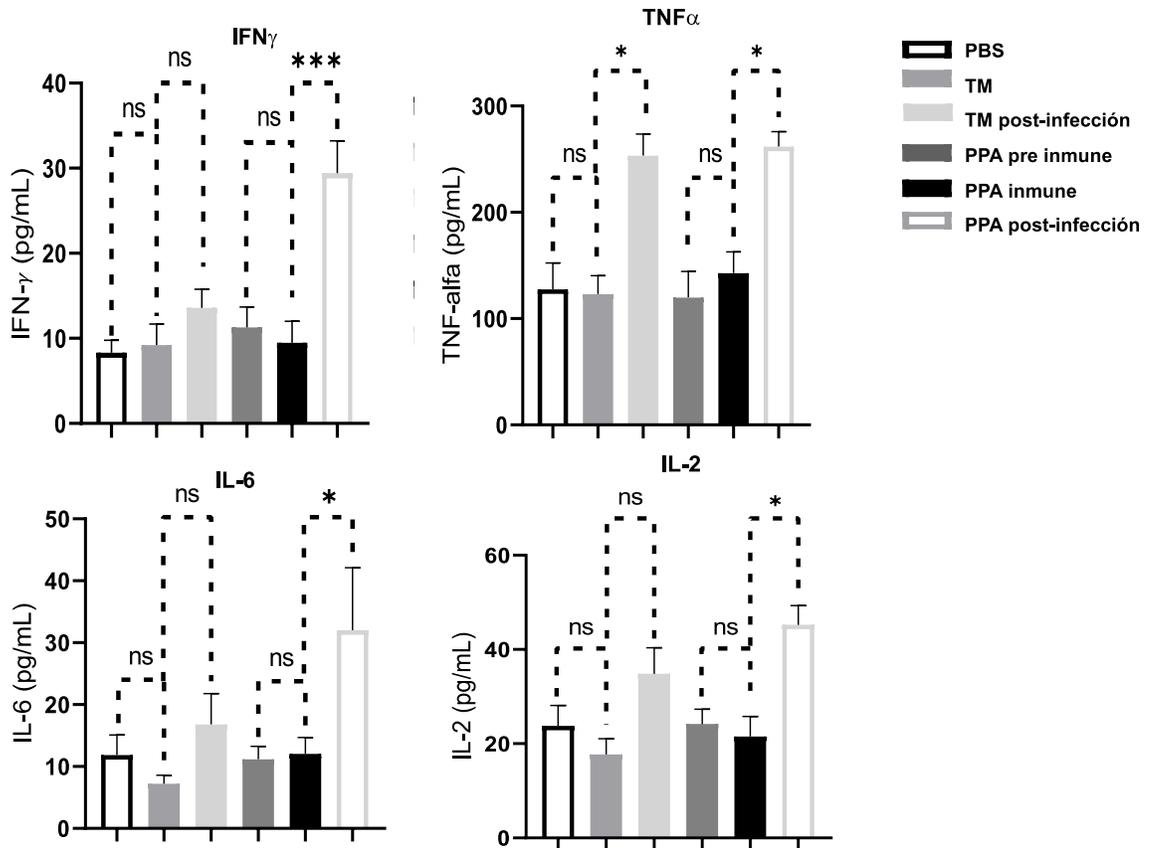


Figura 33. Expresión de citocinas pro-inflamatorias ante la administración del PPA y posterior al Reto de infección por *T. gondii*. Las expresiones de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-12 se evaluaron en sueros pre inmune y post-infección de cada grupo experimental. Las barras representan el promedio (n=10) \pm error estándar. *, ***vs. control (p<0.05 y p< 0.001, respectivamente).

Expresión de citocinas regulatorias inducidas por PPA post Reto de infección.

Finalmente se determinaron las citocinas regulatorias IL-10 (Fig. 34A) e IL-4 (Fig.34B) en los sueros de los ratones después del Reto de infección. Estas citocinas contribuyen a la modulación de la respuesta inmune celular contra la infección por el parásito. Se observó una tendencia de aumento de IL-10 tanto en los ratones inmunizados con el PPA como en los ratones inmunizados con TM; sin

embargo, el aumento de IL-10 fue mayor en los ratones inmunizados con PPA. De forma interesante, los niveles de IL-4 disminuyeron posterior a la infección en los ratones inmunizados con PPA a diferencia de los ratones inmunizados con TM mostrando un aumento significativo de acuerdo con el análisis estadístico.

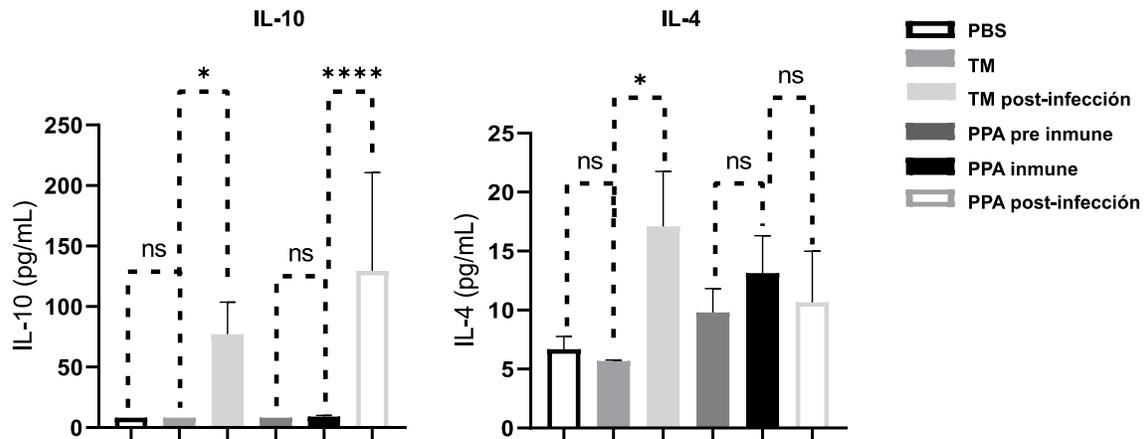


Figura 34. Expresión de citocinas regulatorias ante la inmunización con PPA y posterior a la infección por *T. gondii*. La expresión de IL-10 e IL-4 se evaluaron en sueros pre inmune y post-infección de cada grupo experimental. Las barras representan el promedio (n=10) \pm error estándar. *, ****vs. control ($p < 0.05$ y $p < 0.0001$, respectivamente).

Supervivencia ante un segundo reto letal contra Taks.

Debido a la supervivencia ante la primera infección contra *T. gondii* de los ratones inmunizados con TM + PBS y con PPA+TM, se decidió realizar una segunda infección 35 días después con 1,000 Taks de *T. gondii* a fin de determinar la respuesta de los animales inmunizados. Los ratones inmunizados con TM + PBS murieron al día 40 y los inmunizados con PPA + TM murieron al día 41 (**Fig. 35**)

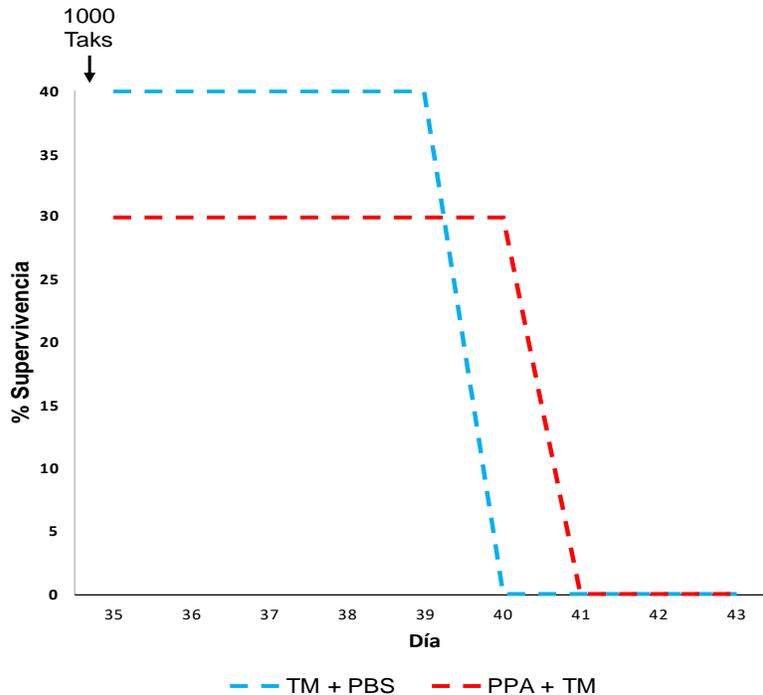


Figura 35. Evaluación de la supervivencia ante la segunda infección con 1,000 Taks. 35 días después de la primera infección con 1,000 Taks de *T. gondii*, se administró un segundo inóculo con el mismo número de Taks a nivel peritoneal, y se evaluó el porcentaje de supervivencia de los ratones. Los ratones del grupo control inmunizados con TM + PBS murieron al día 40 y los inmunizados con PPA + TM murieron al día 41.

Discusión

El desarrollo de vacunas contra la toxoplasmosis para humanos ha sido una meta aún no resuelta pero ampliamente estudiada y abordada por numerosos grupos de investigación desde hace varios años. El éxito de la infección por *T. gondii* en los hospederos está en parte basada en su alta capacidad de diseminación tisular a órganos distantes del sitio primario de infección. Hasta el momento no se ha dilucidado el mecanismo por el cual *T. gondii* logra atravesar las diferentes barreras biológicas, ni tampoco los mecanismos de reconocimiento celular y atracción quimiotáctica que determinan la dirección de su migración y diseminación tisular. En otros parásitos intracelulares se han generado propuestas sobre el papel que juegan las proteasas como posibles moléculas involucradas en la diseminación. En infección con *T. gondii*, se ha demostrado que proteasas detectadas en la fracción

insoluble del citoesqueleto, son un buen candidato para el desarrollo de una estrategia inmunoproláctica efectiva. Trabajando con fracciones de citoesqueleto, Lagunas-Cortés (2020) identificó mediante estrategias de inmuno-proteómica y con sueros de pacientes con toxoplasmosis aguda, diferentes proteínas no solo de citoesqueleto sino también de organelos secretores. Las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas fueron analizadas mediante métodos bioinformáticos, detectando a varias de ellas con un alto potencial inmunogénico. Dentro de las proteínas caracterizadas, se destacó una metaloproteasa con un alto número de epítomos accesibles y antigénicos para linfocitos B denominada TLN1. Con base en lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto de péptidos inmunogénicos de TLN1 en la inducción de la respuesta inmunitaria humoral y celular, así como su efecto inmunoprotector ante retos letales con Taks de *T. gondii* en un modelo murino de toxoplasmosis aguda. En primera instancia se realizó la predicción del epítomo con mayor antigenicidad y accesibilidad para células B por los algoritmos de Koloaskar and Tongoankar (Kolaskar y Tongaonkar *et al.*, 1990) y Emini Surface (Emini *et al.*, 1985), respectivamente. De todos los epítomos analizados mediante bioinformática de la TLN1, se seleccionó la secuencia VLELIMHPH, y con base en los reportes previos, se decidió adicionar al extremo C-terminal del diseño peptídico, cuatro secuencias MAP's a fin de sintetizar el péptido de forma ramificada, ya que se han utilizado ampliamente para estimular el sistema inmunitario, promoviendo una extraordinaria resistencia a la degradación proteolítica (Posnett *et al.*, 1988; Tam, 1988). El péptido inmunogénico (PPA) de la TLN1 está ubicado en la proteína madura entre los aminoácidos 778 al 786. Su caracterización, mostró un score de antigenicidad de 1.11 y de accesibilidad de 0.165 que son parámetros que de acuerdo con los algoritmos de Koloaskar and Tongoankar (Kolaskar y Tongaonkar *et al.*, 1990) y Emini Surface (Emini *et al.*, 1985), corresponden a una molécula que cumplen los parámetros exitosos de antigenicidad. Una vez identificado y diseñado el epítomo inmunogénico, se realizó el modelado 3D a partir de AF2 (Jumper *et al.*, 2021) de la TLN1m con la finalidad de confirmar la accesibilidad de dicha secuencia para los linfocitos B productores de Ac (**Fig.16**). Los Ac actúan cuando *T. gondii*, se exterioriza mediante la lisis de

las células infectadas para diseminarse a los tejidos, específicamente tienen una relevancia como línea de defensa a través de la vía clásica del complemento y de la fagocitosis promoviendo la eliminación de parásito (Suzuki 2002). Por otra parte, en el presente trabajo, también se abordó el diseño de un péptido que pudiera hipotéticamente activar a las células T, debido a que es la respuesta principal inmunoprotectora contra el parásito. La predicción de epítomos para células T, se realizó a partir de dos secuencias con capacidad de unión a moléculas MHC-I y a MHC-II, que pueden ser potencialmente reconocidos por el TCR de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocitos T cooperadores (CD4+), respectivamente. En análisis bioinformático arrojó la secuencia candidata para unión a moléculas MHC-I (VRLLVLRSSIHR), ubicada a partir del aminoácido 1219 al 1232 de la secuencia de la TLN1 y la secuencia para unión a moléculas MHC-II (IPSPMELGVTM), localizada entre el aminoácido 722 y 732. Ambas secuencias se unieron a través de una secuencia espaciadora GGG; adicionalmente, se incluyó en la construcción un dominio RGD en el extremo N-terminal, el cual funciona como una molécula de co-reconocimiento por los receptores tipo integrina en los linfocitos T (Yano et al., 2003, 2005). Una vez construido el constructo que se denominó PPB, se realizó el modelaje 3D a partir de AF2 para descartar plegamientos que interfieran con el proceso de reconocimiento antigénico (**Fig. 17**). Con el fin que la inmunización con PPA solo generara Ac policlonales específicos a TLN1 y no a otras proteínas del mismo parásito o del hospedero, se realizó el alineamiento múltiple del PPA frente a *T. gondii*, ratón y humano. Este análisis demostró que la secuencia de PPA interés, es única y específica de la TLN1 de *T. gondii*. Asimismo, para evitar que la inmunización con el PPA no generara tolerancia inmunológica por tener secuencias compartidas con proteínas del ratón, o reactividad cruzada en los experimentos posteriores, se realizó la comparación de secuencia de TLN1 contra todas las proteínas de ratón e incluso de humano. Los resultados corroboraron que TLN1 es una proteína específica de *T. gondii*, siempre y cuando no se considere el sitio activo como proteasa, ya que para humano y ratón si hay una similitud con los dominios conservados de las proteínas de la familia peptidasa M16 como las enzimas degradativas de insulina. Por esta razón la secuencia de aminoácidos presentes en

el sitio activo de proteasa de la TLN1 fue descartada del diseño de la construcción peptídica. Adicionalmente, tampoco se consideró en el diseño del péptido al extremo C-terminal, debido a que este es procesado proteolíticamente durante el proceso de maduración de TLN1 (**Fig. 18**) (Hajagos *et al.*, 2012). La evaluación de PPA y PPB mediante los métodos bioinformáticos mencionados sugirieron que, en principio, PPA y PPB de TLN1 podría inducir una respuesta inmunitaria inmunoprotectora en el hospedero contra la infección con *T. gondii*. A pesar de que las herramientas bioinformáticas son muy utilizadas en el diseño de moléculas y estas son cada vez más certeras y resolutivas, al final de cuentas no dejan de ser solo predicciones que deberán ser evaluadas y validadas experimentalmente. Por la razón anterior, se solicitó la síntesis del péptido PPA a fin de inducir la activación de linfocitos B con la consecuente producción de anticuerpos específicos y la síntesis del dipéptido B a fin de inducir la activación de linfocitos T citotóxicos y cooperadores a fin de buscar citotoxicidad contra el parásito durante el reto de infectividad. Una vez sintetizados ambos péptidos por la compañía Genscript, se realizó la evaluación de la integridad de cada uno mediante geles de SDS-PAGE al 15 % observándose para ambos péptidos, la presencia de las bandas respectivas en la parte inferior del gel, descartándose así la degradación de cada péptido, y validando el inicio del proceso de inmunización. La elección de la dosis de Ag (50 μ g por dosis de PPA o PPB) y de la estrategia de inmunización que consistió en inmunizar grupos de ratones (n= 10 por grupo) fueron cuatro dosis por vía intraperitoneal y la última dosis por vía intradérmica se basaron en reportes (Leyva *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2022) . Para la primera dosis, los Ag se suspendieron con el adyuvante Titer Max (TM), el cual es copolímero en bloque, CRL-8300, escualeno (un aceite metabolizable) y un mono oleato de sorbitán (Bennett *et al.*, 1992) como control, los ratones se inocularon con 50 μ L PBS y 25 μ L de TM. Para todas las demás inoculaciones, los Ag se resuspendieron solo en PBS. Una semana después del último refuerzo, se realizó el sangrado y se procedió a la separación de los sueros inmunes, los cuales fueron titulados para la presencia de IgG mediante un ELISA indirecto. A cada animal se extrajo una muestra de sangre antes de dar inicio al protocolo de inmunización, con la finalidad de obtener el suero pre inmune que

fue usado como control negativo para todos los ensayos del presente estudio. La evaluación de sueros representativos obtenidos al final del protocolo de inmunización para cada antígeno permitió detectar una banda de 1.08 KDa para PPA y una banda de 3.41 KDa para PPB, demostrando que la producción de anticuerpos contra los Ag inmunizados fue exitosa, incluso contra el péptido que había sido diseñado para activar a los linfocitos T citotóxicos y cooperadores (**Fig. 19**). Cuando se evaluaron las reactividades de los sueros contra PPA y PPB por WB en extractos de Taks, se logró como se esperaba, la detección de TLN1m con un PM de 181 KDa. Previamente, Hajagos *et al.*, 2012 reportó la detección de la TLN1 con un peso molecular previsto de 181kDa, sobre una fracción de membrana, fracción soluble y lisado total de *T. gondii* utilizando un antisuero específico contra los residuos 687-1213 de la proteína. Interesantemente, una exposición más larga de las tiras de quimioluminiscencia muestra una especie adicional menos abundante de 250 kDa que corresponde a la proteína inmadura, previo a su corte proteolítico, a través del cual se elimina el extremo C-terminal antes de llegar a las roptrias. En el diseño de nuestros péptidos, no se consideró incluir secuencias del extremo C terminal por no formar parte de la proteína madura (TLN1m). En el artículo antes mencionado, también se reportó la localización de la TLN1 co-localizada con ROP13 una proteína de las roptrias, indicando que TLN1 es una proteína soluble ubicada en las roptrias. Nuestra detección de la TLN1 en productos de E/S aunque en menor intensidad que en el extracto total, demostró que esta proteasa es liberada al medio extracelular, ya sea a través de un proceso de excreción o por una secreción (**Fig. 20**). Debido a que los parásitos no fueron expuestos a condiciones de activación que indujera la secreción de componentes pues se suspendieron en PBS, es muy probable que la secreción de la TLN1 obedece principalmente a un proceso de secreción constitutiva. Se ha reportado que los componentes alojados al interior de las roptrias obedecen a una secreción inducida y su liberación ocurre principalmente cuando se va a llevar a cabo la invasión celular como ocurre para ROP1 (Bradley & Sibley, 2007; Nichols et al., 1983; Ossono ' et al., 1992). Sin embargo, hay proteínas que se han reportado que son liberadas al interior de la VP obedeciendo aparentemente a una secreción de

tipo constitutiva como ocurriría para ROP-2 (Alexander et al., 2005). La localización subcelular de la marca de TLN1 en la parte apical de parásitos extracelulares, así como en vesículas en la periferia del parásito, corrobora e ilustra la forma como la TLN1 está siendo excretada/secretada por *T. gondii* (**Fig. 21**). En contraste, la detección de TLN1 confinada al extremo apical durante el proceso de proliferación, pero no en el espacio intravacuolar o en el citoplasma de la célula invadida (**Fig. 22**), sugiere que, durante la proliferación, la proteasa no es secretada. Con base en lo anterior, se puede proponer que TLN1, es una proteasa que solo es liberada cuando el parásito está fuera de la célula, aunque su función permanece todavía por determinarse. Una vez validada experimentalmente la inmunogenicidad de los péptidos al obtener anticuerpos que reconocen a la TLN1, la siguiente fase consistió en centrarnos en la evaluación de los péptidos inmunogénicos a fin de explorar sus propiedades de inmunoprotección en un modelo murino de infección aguda ante un reto de supervivencia con una dosis letal de 1000 Taks. Respecto a los niveles de Ac IgM, la inmunización de los ratones con PPA y PPB generaron una producción específica de este isotipo de manera significativa. Sin embargo, cabe mencionar que el PPB lo hizo en menor proporción en comparación de PPA (**Fig. 23**). El isotipo IgM es considerado como el mejor activador del sistema del complemento y posee alto niveles de citotoxicidad (Filisetti y Candolfi, 2004). En relación con la determinación de IgG sérica, la inmunización con PPA indujo la producción de IgG específicas contra TLN1m y en menor proporción lo hizo la PPB (**Fig. 24**), lo cual demuestra que el diseño del PPA enfocado a la activación de linfocitos B, fue exitoso. La presencia de IgG contra una molécula de *T. gondii*, representa una herramienta que cumple un papel relevante en el proceso de eliminación de este parásito especialmente en la fase aguda. Es en esta fase cuando los anticuerpos reconocen y se adhieren a los Taks impidiendo la invasión de las células blanco, y promueven su eliminación ya sea por activación del sistema del complemento o por la opsonización de los parásitos extracelulares y su destrucción por la activación de macrófagos a través de la unión al receptor Fc (Dupont et al., 2012; Pagheh et al., 2021; Wang et al., 2011; Wu et al., 2022). Además de los isotipos de inmunoglobulinas detectados después de la inmunización con PPPA y PPB,

también se determinó el patrón de citocinas séricas. Las citocinas, son moléculas que son secretadas por diferentes células en respuesta a ciertos estímulos y que participan en la regulación de la respuesta inmune durante cualquier infección tal como la toxoplasmosis (Filisetti y Candolfi, 2004). Se analizaron las citocinas más representativas en la determinación de una respuesta inmune tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2) y Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10). IFN- γ , es un factor clave para que se genere una inmunidad protectora durante la toxoplasmosis, y se produce por la activación de macrófagos y células NK durante a infección, así como la inducción de las moléculas del MHC clase II (Wagner et al., 2009). Los niveles de IFN- γ en los sueros de los animales inmunizados con PPA y PPB, no mostraron diferencias significativas con respecto a las determinaciones realizadas en los sueros del grupo control de animales pre inmunes (**Fig.25**). Por otro lado, la TNF- α que es producida por macrófagos, LT y mastocitos/basófilos, actúa como una molécula co-estimuladora de la respuesta inmune promoviendo la producción de IFN- γ y potencializando la acción microbicida de los macrófagos (Langermans et al., 1992b; Portillo et al., 2010). En nuestros ensayos, aunque el perfil de TNF- α mostró una tendencia al aumento en los grupos inmunizados con PPA y PPB, respecto al grupo pre inmune, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas (**Fig. 26**). Durante la infección por el parásito, TNF- α , es responsable de la inducción de proteínas de fase aguda a través de la producción de IL-6 y es esencial para la protección tanto durante la fase aguda como crónica de la enfermedad. En forma similar al TNF- α , se encontró que en los ratones inmunizados con PPA y PPB, los niveles séricos de IL-6, tuvieron una tendencia al aumento respecto al grupo pre inmune, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas (**Fig. 27**). La IL-2 es una citocina muy importante para inducir la proliferación de LT, LB y células NK citotóxicas y es secretada junto con el IFN- γ y TNF- α por los linfocitos Th1, (Filisetti y Candolfi, 2004), lo cual la convierte en buen marcador de este tipo de respuesta. En los sueros de ratones inmunizados con ambos péptidos, se encontró una tendencia a la disminución de las concentraciones séricas de IL-2; sin embargo, no mostró diferencias significativas en comparación del grupo pre inmune (**Fig. 28**). Contrario a lo que se esperaba, los resultados obtenidos muestran una

baja respuesta inmune en términos de las citocinas presentes. No se descarta que esta respuesta se haya debido a la estrategia de inmunización utilizada o al diseño de los péptidos respectivos. En este sentido, se ha reportado que existe una clara relación entre la IL-2 y el IFN- γ . Esta afirmación se ha correlacionado con lo reportado previamente por Villegas et al., 2002 donde los ratones con IL-2 (-/-), presentan niveles muy bajos de IFN- γ .

Por otro lado, la IL-10, es secretada por las células CD4+ tipo 2, macrófagos y células dendríticas, así como por algunas poblaciones de LB, para promover la inhibición y proliferación de los LT CD4+ Th1, así como la producción de NO e intermediarios reactivos de oxígeno (Laidlaw et al., 2016; Villegas et al., 2000). Por el contrario, la citocina IL-4 producida por las células T CD4+ de tipo Th2 es considerada un factor de activación y diferenciación de LT y LB, que ha demostrado tener un papel clave en la resistencia frente a la infección toxoplásmica (Filisetti y Candolfi, 2004). El perfil de IL-10 en los sueros de los ratones inmunizados con ambos Ag, muestran una tendencia de aumento de los niveles séricos; sin embargo, esta tendencia, no fue estadísticamente significativa (**Fig. 29**). Interesantemente, en el grupo inmunizado con el PPA, el perfil de IL-4 (**Fig. 30**) se observó un incremento significativo en comparación del grupo control. Se ha planteado que IL-4 es una citocina que protege a los animales infectados en las primeras fases de la toxoplasmosis, pero en el curso de una infección crónica, niveles elevados de esta citocina favorecen a un incremento en el número de quistes lo cual puede conducir al desarrollo de lesiones necróticas en el cerebro (Ahn et al., 2009). Una de las estrategias para validar una inmunoprotección exitosa, es el enfrentar a los animales inmunizados a retos de infección con dosis letales de *T. gondii*, tal y como ha sido reportado en ratones BALB/c previamente inmunizados con vacunas de nueva generación y posteriormente retados con la cepa RH de *T. gondii* (Hosseini Abdollahi et al., 2013; Leyva et al., 2001; Qu et al., 2011; Wu et al., 2022). En este sentido, con el fin de evaluar el efecto inmunoprotector generado por el PPA y PPB, se inmunizaron los animales con ambos antígenos, y posteriormente fueron retados por vía intraperitoneal con 1000 Taks de la cepa RH para determinar el grado de infección y la supervivencia de los animales con respecto al tiempo. El grupo control

de ratones inmunizados con PBS y posteriormente infectados con la dosis letal de Taks, se utilizó para determinar el tiempo esperado en nuestras condiciones para la muerte de los animales ante esta dosis de infección y que fue de 8 días en el que se obtuvo el 100 % de mortalidad.

En el grupo de ratones inmunizados con PPA, se obtuvo una 30 % de supervivencia, sin embargo, los ratones inmunizados con PPB, no sobrevivieron al reto letal con Taks, no mostrando diferencia con respecto al control. Un resultado que llamó la atención, fue la supervivencia del 40 % en el grupo control de animales inmunizados con TM+PBS (**Fig. 31**). Aunque inesperado, este hallazgo podría explicarse al efecto que pudo haber tenido el adyuvante (Titer Max) al inducir una estimulación inespecífica de la respuesta inmune (Bennett et al., 1992). Los adyuvantes son compuestos que juegan un papel clave en la eficiencia de los protocolos de vacunación, incrementando la fuerza y cinética de la respuesta inmune, además de ser esenciales para determinar tanto el tipo de respuesta generada como su potencial aplicación en animales o humanos (Tan et al., 2011). Con la finalidad de caracterizar desde el punto de vista inmunológico, la respuesta de los ratones supervivientes, se recolectaron los sueros 15 días post-infección y se determinó el perfil de Ac y citocinas.

En relación con las inmunoglobulinas, se observó una producción de 150 $\mu\text{g/mL}$ de IgM. Los altos niveles de este isotipo de inmunoglobulina son indicativos de una respuesta primaria de anticuerpos y por lo tanto del diagnóstico de una toxoplasmosis aguda; Al ser la IgM la principal inmunoglobulina activadora del sistema del complemento es también una de las principales moléculas efectoras en la destrucción de Taks extracelulares mediante el reconocimiento principalmente de las proteínas de superficie del parásito (Filisetti y Candolfi, 2004). Respecto a IgG se produjo 15 $\mu\text{g/mL}$, este isotipo también tiene una actividad citotóxica y ozonizadora, gracias a que tanto los macrófagos como las células polimorfonucleares presentan receptores para la Fc y por lo tanto favorecen la destrucción de los parásitos extracelulares mediante su fagocitosis (Martin et al., 1998). Los altos niveles de IgM y bajos niveles de IgG indican que estos animales

cursaron después del reto letal, con una toxoplasmosis aguda (Joynson, 2001) (**Fig. 32**).

Por otra parte, se determinó en los animales supervivientes, el perfil de las citocinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6). Se obtuvo un aumento significativo en IFN- γ en los ratones inmunizados con el PPA respecto al suero pre inmune e inmune. Este aumento se relaciona con la supervivencia debido a que IFN- γ es esencial para la respuesta inmune Th1 mediada por células que controlan la progresión de la infección por *T. gondii*, además induce la producción de ROS y RNS por los macrófagos activados, que tienen potentes actividades antimicrobianas, las cuales aumentan con la participación TNF- α . Los niveles de TNF- α aumentaron significativamente tanto en el grupo inmunizado con PPA como con TM. Sin embargo, debido a que en el grupo inmunizado con TM no mostraron aumento de IFN- γ , se sugiere que la participación de TLF- α no es representativa debido a que previamente se había demostrado que el tratamiento de macrófagos con TNF- α solo, no tiene efecto inhibitor sobre la proliferación de *T. gondii* (Daubener et al., 1996; Langermans et al., 1992a). No obstante, lo explicado, el TNF- α tiene la capacidad de inducir proteínas de fase aguda a través de la producción de IL-6, otra citocina que participa en la activación de la respuesta inmunitaria protectora contra el parásito estimulando la producción de Ac (Jebbari et al., 1998). En relación con IL-2, la cual es secretada predominantemente por los linfocitos T activados y producen una citotoxicidad directa sobre los Taks o sobre las células infectadas con el parásito (Miller et al., 2009), durante el experimento post infección esta citocina mostró una tendencia de aumento en sus concentraciones séricas lo cual fue estadísticamente significativa de acuerdo con el análisis en los ratones inmunizados con el PPA (**Fig.33**).

Por otra parte, dentro de las citocinas regulatorias, se encuentra la IL-10 y la IL-4. La IL-10 inhibe la proliferación de los LT CD4⁺ Th1, la producción de NO y ROI, así como de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, la IL-6 y el TNF- α (Villegas et al., 2000). En nuestros ensayos post-infección, hubo un aumento de IL-10 tanto en el grupo inmunizado con TM como los inmunizados con PPA; sin embargo, en este último tuvo una mayor significancia estadística. Así mismo, la IL-4 que tiene un papel

importante en la resistencia frente a la infección, en nuestros experimentos, presentó un aumento significativo en los ratones inmunizados con TM. De manera general, el aumento de ambas citocinas (IL-10 y IL-4) muestra un equilibrio de la respuesta inmune frente a la infección por *T. gondii* (**Fig. 34**).

Debido a que el 40 % de los ratones inmunizados con TM y el 30 % en ratones inmunizados con PPA + TM sobrevivieron ante los retos letales con Taks, fue de mucho interés conocer si podían resistir a la infección con una segunda dosis letal de Taks y determinar si estaban inmunoprotegidos. La finalidad del segundo reto letal fue para evaluar si la respuesta inmune inducida en los protocolos de inmunización, eran debidos a la participación del péptido A o del adyuvante TM por su capacidad de activar de la respuesta inmune inespecífica, ya que como se mencionó anteriormente juega un papel clave en la eficiencia de los protocolos de vacunación, incrementando la fuerza y cinética de la respuesta inmune, al tiempo que son esenciales para determinar tanto el tipo de respuesta generada como su potencial aplicación en animales o humanos (Tan et al., 2011). Los datos obtenidos mostraron que los ratones inmunizados con el PPA+ TM sobrevivieron 24 h más que los inmunizados solo con el adyuvante (**Fig.35**). Con base en los anterior, se sugiere que no obstante el diseño cuidadoso y detallado de los péptidos inmunogénicos, estos no tuvieron la capacidad de inmunoproteger a los ratones ante un segundo reto con dosis letales de la cepa RH.

Conclusión

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto, se puede concluir que la administración del PPA (LB) indujo la producción de Ac específicos contra TLN1m y en menor proporción lo hizo PPB. Los Ac producidos permitieron observar la localización subcelular de TLN1m en Taks extracelulares y en proliferación de *T. gondii* por IF, indicando su posible localización en organelos secretores, además de su expresión en ET y E/ES de *T. gondii*. El PPA indujo una respuesta de Ac específica contra *T. gondii*. Sin embargo, aunque existe una tendencia en el aumento de las concentraciones séricas de, IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 en los grupos inmunizados con los péptidos A y B, esta tendencia no es estadísticamente significativa, por lo cual se concluye que estos Ag en conjunto con TM, no fueron capaces de estimular el desarrollo de una respuesta celular. Las elevadas concentraciones séricas de IL-4 en el grupo inmunizado con el PPA más TM, sugieren que los inmunógenos utilizados, en conjunto con el adyuvante, pueden llegar a generar una desregulación de la respuesta inmune, de manera general generando una supervivencia del 30 %, mientras que le PPB fue poco inmunogénico, mostrando una baja producción de Ac específicos, por lo que se obtuvo 0 % de supervivencia. En el caso de la administración con TM mostró una respuesta inmune inespecífica, lo que se logró un 40 % de supervivencia, por lo que se realizó una segunda en los animales sobrevivientes, mostrando que la administración de PPA tuvieron una supervivencia de 24 h mayor que le grupo control.

Es importante recalcar que el patrón de inmunidad que se desencadena luego de un protocolo de inmunización se encuentra estrechamente relacionado con la ruta de inoculación y de reto, el genotipo de las cepas y el haplotipo de los animales utilizados en los experimentos, la preparación antigénica utilizada, así como los adyuvantes que acompañaron a la preparación.

Perspectivas

- Potencializar el efecto inmunoprotector de las secuencias peptídicas de TLN1m, a través de acoplamientos anteriormente reportados.
- Extender el estudio a fin de no solo identificar el efecto inmunoprotector de péptidos inmunogénicos de TLN1 en un modelo de toxoplasmosis aguda, sino diseñar y evaluar la proteína TLN1 recombinante a fin observar el efecto de inmuno protección ante dosis letales en un modelo murino agudo y crónico.
- Ampliar la búsqueda de proteínas con potencial inmunogénico, con la finalidad de su desarrollo vía recombinante, para futuros estudios de inmunodetección diagnóstica e inmunoprotección.

Referencias

- Ahn, H. J., Kim, J. Y., Ryu, K. J., & Nam, H. W. (2009). STAT6 activation by *Toxoplasma gondii* infection induces the expression of Th2 C-C chemokine ligands and B clade serine protease inhibitors in macrophage. *Parasitology Research*, 105(5), 1445–1453. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1577-8>
- Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., & Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: A collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathogens*, 1(2), 0137–0149. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>
- Aliberti, J. (2005). Host persistence: Exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 5, Issue 2, pp. 162–170). <https://doi.org/10.1038/nri1547>
- Aliberti, J., Serhan, C., & Sher, A. (2002). Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 196(9), 1253–1262. <https://doi.org/10.1084/jem.20021183>
- Barragan, A., & David Sibley, L. (2002). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *Journal of Experimental Medicine*, 195(12), 1625–1633. <https://doi.org/10.1084/jem.20020258>
- Bennett, B., Check, I. J., Olsen, M. R., Hunter, R. L., & Bennett, B. (1992). A comparison of commercially available adjuvants for use in research. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 153).
- Besteiro, S., Bertrand-Michel, J., Lebrun, M., Vial, H., & Dubremetz, J. F. (2008). Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites rhoptries: Further insights into the role of cholesterol. *Biochemical Journal*, 415(1), 86–96. <https://doi.org/10.1042/BJ20080795>
- Betancourt, E. D., Hamid, B., Fabian, B. T., Klotz, C., Hartmann, S., & Seeber, F. (2019). From entry to early dissemination-*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter with Its Host. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 9, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00046>
- Black, M. W., Arrizabalaga, G., & Boothroyd, J. C. (2000). *Ionophore-Resistant Mutants of Toxoplasma gondii Reveal Host Cell Permeabilization as an Early Event in Egress* (Vol. 20, Issue 24).
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., & O'Reilly, M. S. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390(6658), 404–407.
- Bracci, L., Falciani, C., Lelli, B., Lozzi, L., Runci, Y., Pini, A., de Montis, M. G., Tagliamonte, A., & Neri, P. (2003). Synthetic Peptides in the Form of Dendrimers Become Resistant to Protease Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46590–46595. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308615200>
- Bradley, P. J., & Sibley, L. D. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 582–587). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.013>
- Brenier-Pinchart, M. P., Pelloux, H., Simon, J., Ricard, J., Bosson, J. L., & Ambroise-Thomas, P. (2000). *Toxoplasma gondii* induces the secretion of monocyte

- chemotactic protein-1 in human fibroblasts, in vitro. *Molecular and cellular biochemistry*, 209(1), 79-87
- Buxton, D. (1993). Toxoplasmosis: the First Commercial Vaccine. In *Parasitology Today* (Vol. 9, Issue 9).
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). *Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii*.
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 73(2), 114-123
- Carruthers, V. B., Håkansson, S., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (2000). *Toxoplasma gondii* Uses Sulfated Proteoglycans for Substrate and Host Cell Attachment. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 68, Issue 7).
- Carruthers, V. B., J Moreno, S. N., & David SIBLEY, L. (1999). Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca²⁺] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. In *Biochem. J* (Vol. 342).
- Céréde, O., Dubremetz, J. F., Soète, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., & Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *Journal of Experimental Medicine*, 201(3), 453–463. <https://doi.org/10.1084/jem.20041672>
- Cesbron-Delauw, M.-F. (1994). Dense-granule Organelles of *Toxoplasma gondii*: Their Role in the Host-Parasite Relationship. In *Parasitology Today: Vol. 10* (Issue 8).
- Coppens, I., Sinai, A. P., & Joiner, K. A. (2000). *Toxoplasma gondii* Exploits Host Low-Density Lipoprotein Receptor-mediated Endocytosis for Cholesterol Acquisition. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 149, Issue 1). <http://www.jcb.org>
- Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gâtel, D., & Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*, 107(1), 309–316. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0666>
- Daubener, W., Remscheid, C., Nockemann, S., Pilz, K., Seghrouchni, S., Mackenzie, C., & Hadding, U. (1996). Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon- γ and tumor necrosis factor- α . In *Eur. J. Immunol* (Vol. 26).
- Dubey, J. P. (1994). *Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii*.
- Dubey, J. P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. In *Journal of Eukaryotic Microbiology* (Vol. 55, Issue 6, pp. 467–475). <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>
- Dubey, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 39, Issue 8, pp. 877–882). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>
- Dubey, J. P., Esch, A., Bush, J., Aho, Chapman, H., & London, U. (1998). Comparative Infectivity of *Toxoplasma gondii* Bradyzoites in Rats and Mice. In *Source: The Journal of Parasitology* (Vol. 84, Issue 6).
- Dubremetz JF, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 28:1007-1013.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 34, Issue 6, pp. 793–813). <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>

- 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. In *JOURNAL OF VIROLOGY*.
- Ferguson, D. J. P., & Hutchison, W. M. (1987). The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. In *Virchows Arch A* (Vol. 411).
- Filisetti, D., & Candolfi, E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*, 40(1), 71-80.
- Foussard, F., Leriche, M. A., & Dubremetz, J. F. (1991). *Characterization of the lipid content of Toxoplasma gondii rhoptries*.
- Galván-Ramírez, M., de La, L., & Mondragón-Flores, R. P. (2017). *ECORFAN ® Toxoplasmosis Humana*. www.ecorfan.org
- GALVÁN-RAMIREZ, M.L., & MONDRAGÓN F. R. (Eds.) 2001. *Toxoplasmosis Humana*, Ediciones Cuellar. 2001, México. No Registro ISBN968-7022-89-2
- García Hernández, M., Guerrero Ramírez, G., Castro Corona, M. D. L. Á., & Medina de la Garza, C. E. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Medicina Universitaria*, 11(45), 247-259.
- Garcia-Re, N., Lebrun, M., Fourmaux, M.-N. É. L., Mercereau-Puijalon, O., Mann, T., Beckers, C. J. M., Samyn, B., van Beeumen, J., Bout, D., & Ois Dubremetz, J.-F. É. (2000). The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. In *Cellular Microbiology* (Vol. 2, Issue 4).
- Gazzinelli, R. T., Hieny, S., Wynn, T. A., Wolf, S., & Sher, A. (1993). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts (*Toxoplasma gondii*/natural killer cells). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 90).
- Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., & Sher, A. (1992). *Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T*. <http://www.jimmunol.org/content/149/1/175>
- 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>
- Green, S. J., Mellouk, S., Hoffman, S. L., Meltzer, M. S., & Nacy, C. A. (1990). Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. In *Immunology Letters* (Vol. 25).
- Hajagos, B. E., Turetzky, J. M., Peng, E. D., Cheng, S. J., Ryan, C. M., Souda, P., Whitelegge, J. P., Lebrun, M., Dubremetz, J. F., & Bradley, P. J. (2012). Molecular Dissection of Novel Trafficking and Processing of the *Toxoplasma gondii* Rhoptry Metalloprotease Toxolysin-1. *Traffic*, 13(2), 292–304. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01308.x>
- Hill, D. E., Chirukandoth, S., & Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, 6(1), 41–61. <https://doi.org/10.1079/ahr2005100>
- Hoffmann, S., Batz, M. B., & Morris, J. G. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the united states due to 14 foodborne pathogens. *Journal*

- of Food Protection*, 75(7), 1292–1302. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-417>
- Hosseini Abdollahi, S., Ayoobi, F., Khorramdelazad, H., Hassanshahi, G., Nasiri Ahmadabadi, B., Rezayati, M., Ravary, A., Shamsizadeh, A., & Kazemi Arababadi, M. (2013). *Oman Medical Specialty Board Interleukin-10 Serum Levels after Vaccination with In Vivo Prepared Toxoplasma gondii Excreted/Secreted Antigens*.
- Hunter, C. A., Subauste, C. S., Van Cleave, V. H., & Remington, J. S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infection and immunity*, 62(7), 2818-2824.
- Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VC (2003) Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2±M2AP adhesive protein complex. *The EMBO Journal* 22(9) 2082-2090.
- Jankovic, D., Kugler, D. G., & Sher, A. (2010). IL-10 production by CD4+ effector T cells: A mechanism for self-regulation. In *Mucosal Immunology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 239–246). <https://doi.org/10.1038/mi.2010.8>
- Jebbari, H., Roberts, C. W., Ferguson, D. J. P., Bluethmann, H., & Alexander, J. (n.d.). *A protective role for IL-6 during early infection with Toxoplasma gondii*.
- Joiner, K. A., & Francois, J. (1993). MINIREVIEW *Toxoplasma gondii*: a Protozoan for the Nineties. In *INFECTIOUS AND IMMUNITY*.
- Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Mietrinen, H. M., Kasper, L. H., & Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii: Fusion Competence of Parasitophorous Vacuoles in Fc Receptor-Transfected Fibroblasts*. www.sciencemag.org
- Jones, T. C., Yeh, S., & Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells: I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *The Journal of experimental medicine*, 136(5), 1157-1172.
- Joinson, D. H. M. (2001). *Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide*. Cambridge Univ Pr.
- 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>
- Kang, H., Remington, J. S., & Suzuki, Y. (2000). Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired Expression of IFN-γ, TNF-α, and Inducible Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Immunology*, 164(5), 2629–2634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2629>
- Kasper, L. H., Currie, K. M. & Bradley, M. S. 1985. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 134, 3426-31.
- Kim, K. (2004). Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Tropica*, 91(1), 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.11.016>
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). *A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens* (Vol. 276, Issue 1).

- Laidlaw, B. J., Craft, J. E., & Kaech, S. M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 102–111). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.10>
- Langermans, J. A. M., van der Hulst, M. E. B., Nibbering, P. H., Hiemstra, P. S., Fransen, L., & van Furth, R. (1992). IFN- γ -INDUCED L-ARGININE-DEPENDENT TOXOPLASMASTATIC ACTIVITY IN MURINE PERITONEAL MACROPHAGES IS MEDIATED BY ENDOGENOUS TUMOR NECROSIS FACTOR- α . In *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY* (Vol. 148, Issue 2). <http://www.jimmunol.org/>
- Lerliche, M. A., & François Dubremetz, J. (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 45).
- Leyva, R., Heâ, P., & Saavedra, R. (2001). *Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of Toxoplasma gondii*.
- Martin, V., Arcavi, M., Santillan, G., Amendoeira, M. R. R., De, E., Neves, S., Griemberg, G., Guarnera, E., Garberi, J. C., Angel, S. O., Cruz-Fundação, O., & Cruz, O. (1998). Detection of Human *Toxoplasma*-Specific Immunoglobulins A, M, and G with a Recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 Protein. In *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY* (Vol. 5, Issue 5). <https://journals.asm.org/journal/cdli>
- Martínez-Gómez, F., García-González, L. F., Mondragón-Flores, R., & Bautista-Garfias, C. R. (2009). Protection against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation in mice immunized with *Toxoplasma gondii* cytoskeleton proteins and *Lactobacillus casei* as adjuvant. *Veterinary Parasitology*, 160(3–4), 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.017>
- Meissner, M., Schlüter, D., & Soldati, D. (2000). *Role of Toxoplasma gondii Myosin A in Powering Parasite Gliding and Host Cell Invasion*. www.sciencemag.org
- Menard, L. C., Minns, L. A., Darce, S., Mielcarz, D. W., Foureau, D. M., Roos, D., Dzierszinski, F., Kasper, L. H., & Buzoni-Gatel, D. (2007). B Cells Amplify IFN- γ Production By T Cells via a TNF- α -Mediated Mechanism. *The Journal of Immunology*, 179(7), 4857–4866. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4857>
- Mercier, C., & Cesbron-Delauw, M. F. (2015). *Toxoplasma* secretory granules: One population or more? In *Trends in Parasitology* (Vol. 31, Issue 2, pp. 60–71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.002>
- Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W., & Delauw, M. F. C. (2005). Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? In *International Journal for Parasitology* (Vol. 35, Issue 8, pp. 829–849). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>
- Miller, C. M., Boulter, N. R., Ikin, R. J., & Smith, N. C. (2009). The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 39, Issue 1, pp. 23–39). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>
- Montoya, J. G., & Remington, J. S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 47, Issue 4, pp. 554–566). <https://doi.org/10.1086/590149>
- Morisaki, J. H., Heuser, J. E., & Sibley, L. D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of cell science*, 108(6), 2457–2464.

- Muñiz, S., & Mondragón, R. . (2009). *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *REB*, 28(2), 52-58.
- Munoz, M., Liesenfeld, O., & Heimesaat, M. M. (2011). Immunology of *Toxoplasma gondii*. In *Immunological Reviews* (Vol. 240).
- Nadipuram, S. M., Kim, E. W., Vashisht, A. A., Lin, A. H., Bell, H. N., Coppens, I., Wohlschlegel, J. A., & Bradley, P. J. (2016). In Vivo biotinylation of the toxoplasma parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins important for parasite growth and pathogenesis. *MBio*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00808-16>
- NCBI. (2022). Taxonomía de *Toxoplasma gondii*. Retrieved Jun, 2022, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0∓id=5811>
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L., & Richard O'connor, G. (1983). Secretion from the Rhoptries of *Toxoplasma gondii* during Host-Cell Invasion. In *JOURNAL OF ULTRASTRUCTURE RESEARCH* (Vol. 83).
- Ortiz-Alegria, L. B., Caballero-Ortega, H., Cãedo-Solares, I., Rico-Torres, C. P., Sahagún-Ruiz, A., Medina-Escutia, M. E., & Correa, D. (2010). Congenital toxoplasmosis: Candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. In *Genes and Immunity* (Vol. 11, Issue 5, pp. 363–373). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.21>
- Ossono ', P. N., Schwartzman, J. D., & Boothroyd, J. C. (1992). A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry • 1 *. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 50).
- Otify, Y. Z. (2012). Movable computer ruler (MCR): A new method for measuring the size of *Toxoplasma gondii* cysts, tachyzoites and other selected parasites. *Experimental Parasitology*, 130(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.10.008>
- Pagheh, A. S., Daryani, A., Alizadeh, P., Hassannia, H., Rodrigues Oliveira, S. M., Kazemi, T., Rezaei, F., Pereira, M. de L., & Ahmadpour, E. (2021). Protective effect of a DNA vaccine cocktail encoding ROP13 and GRA14 with Alum nano-adjuvant against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.105920>
- Parker C W Robfrts, S. J., & Akhxander, J. (1991). *CD8 T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to Toxoplasma gondii in mice* (Vol. 84). <https://academic.oup.com/cei/article/84/2/207/6488444>
- Pfefferkorn, E. R., Eckel, M., & Rebhun, S. (1986). Interferon- γ suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Molecular and biochemical parasitology*, 20(3), 215-224.
- Porchet-Hennere, E., & Nicolas~, G. (1983). Are Rhoptries of *Coccidia* Really Extrusomes? In *JOURNAL OF ULTRASTRUCTURE RESEARCH* (Vol. 84).
- Portillo, J. A. C., Okenka, G., Reed, E., Subauste, A., van Grol, J., Gentil, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Landreth, G., Levine, B., & Subauste, C. S. (2010). The CD40-autophagy pathway is needed for host protection despite IFN- γ -dependent immunity and CD40 induces autophagy via control of P21 levels. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014472>
- Posnett, D. N., McGrath, H., & Tam, J. P. (1988). A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor β -chain. *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)

- Qu, D. F., Yu, H. J., Liu, Z., Zhang, D. F., Zhou, Q. J., Zhang, H. L., & Du, A. F. (2011). Ginsenoside Rg1 enhances immune response induced by recombinant *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen. *Veterinary Parasitology*, 179(1–3), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.008>
- Radke, J. R., & White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 94).
- Ramírez-Flores, C. J., Cruz-Mirón, R., Mondragón-Castelán, M. E., González-Pozos, S., Ríos-Castro, E., & Mondragón-Flores, R. (2019). Proteomic and structural characterization of self-assembled vesicles from excretion/secretion products of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Proteomics*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103490>
- Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J. N., Wynn, T. A., & Murray, P. J. (2001). Cutting Edge: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production. *The Journal of Immunology*, 166(4), 2173–2177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2173>
- Scanga, C. A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E. Y., Medzhitov, R., & Sher, A. (2002). Cutting Edge: MyD88 Is Required for Resistance to *Toxoplasma gondii* Infection and Regulates Parasite-Induced IL-12 Production by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 168(12), 5997–6001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.5997>
- Sher A, Oswald IP, Hieny S, Gazzinelli RT (1993) *T. gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 150(9):3982–3989
- Sher, A., Tosh, K., & Jankovic, D. (2017). Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 36–42). Chinese Soc Immunology. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.12>.
- Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF (1995) Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 108 (Pt 4):1669-1677.
- Sibley, L. D., Weidner, E., & Krahenbuhl, J. L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 315(6018), 416-419.
- Sullivan, W. J., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 36, Issue 3, pp. 717–733). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x>
- Suzuki -Kensuke Joh, Y., Suzuki, Y., & Job, K. (1994). Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon-gamma. In *Parasitol Res* (Vol. 80). Springer-Verlag.
- Suzuki, Y. (2002). *Host Resistance in the Brain against Toxoplasma gondii*. <http://jid.oxfordjournals.org/>
- Suzuki, Y., & Remington, J. S. (1988). *Lyt-1+*, *L3T4+* T cells in mice. *Toxoplasma gondii* infection by *Lyt-2+* and Dual regulation of resistance against. <http://www.jimmunol.org/content/140/11/3943>
- Tam, J. P. (1988). Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system (solid-phase peptide synthesis/peptide antigen/antipeptide antibody). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 85).

- Tan, F., Hu, X., Luo, F. J., Pan, C. W., & Chen, X. G. (2011). Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase-II. *Vaccine*, 29(15), 2742–2748. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.089>
- Tilney, L. G. (1998). *Acidic compartments and rhoptry formation in Toxoplasma gondii*.
- Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER (1993) Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8):3725–3729. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3725>
- Velasco-Castrejón, O., Salvatierra-Izaba, B., Valdespino, J. L., Sedano-Lara, A. M., Galindo-Virgen, S., Magos, C., Llausás, A., Tapia-Conyer, R., Gutiérrez, G., & Sepúlveda, J. (1992). Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México [Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico]. *Salud publica de Mexico*, 34(2), 222–229.
- Villegas, E. N., Lieberman, L. A., Carding, S. R., & Hunter, C. A. (2002). Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to *Toxoplasma gondii* is associated with a defect in the production of gamma interferon. *Infection and Immunity*, 70(9), 4757–4761. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4757-4761.2002>
- Villegas, E. N., Wille, U., Craig, L., Linsley, P. S., Rennick, D. M., Peach, R., & Hunter, C. A. (2000). Blockade of Costimulation Prevents Infection-Induced Immunopathology in Interleukin-10-Deficient Mice Downloaded from. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 68, Issue 5). <http://iai.asm.org/>
- Wagner, A., Förster-Waldl, E., Garner-Spitzer, E., Schabussova, I., Kundi, M., Pollak, A., Scheiner, O., Joachim, A., & Wiedermann, U. (2009). Immunoregulation by *Toxoplasma gondii* infection prevents allergic immune responses in mice. *International Journal for Parasitology*, 39(4), 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.003>
- Wagner, A., Schabussova, I., Ruttkowski, B., Peschke, R., Kur, J., Kundi, M., Joachim, A., & Wiedermann, U. (2015). Prime-boost vaccination with toxoplasma lysate antigen, but not with a mixture of recombinant protein antigens, leads to reduction of brain cyst formation in BALB/c Mice. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126334>
- Wang, Y., Wang, M., Wang, G., Pang, A., Fu, B., Yin, H., & Zhang, D. (2011). Increased survival time in mice vaccinated with a branched lysine multiple antigenic peptide containing B- and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens. *Vaccine*, 29(47), 8619–8623. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.016>
- Weiss, L. M., & Kim, K. (2000). *THE DEVELOPMENT AND BIOLOGY OF BRADYZOITES OF TOXOPLASMA GONDII*.
- Werk R (1985) How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev Infect Dis* 7(4):449-457.
- Wilkins, M. F. (1988). Toxoplasmosis in sheep further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. *New Zealand Veterinary Journal*, 36(2), 86–89. <https://doi.org/10.1080/00480169.1988.35489>

- Wilson, E. H., Wille-Reece, U., Dzierszynski, F., & Hunter, C. A. (2005). A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *Journal of Neuroimmunology*, 165(1–2), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.04.018>
- Wu, Y., Zhou, Z., Ying, Z., Xu, Y., Liu, J., & Liu, Q. (2022a). Deletion of Toxoplasma Rhopty Protein 38 (Pru Δ rop38) as a Vaccine Candidate for Toxoplasmosis in a Murine Model. *Biomedicines*, 10(6), 1336. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061336>
- Wu, Y., Zhou, Z., Ying, Z., Xu, Y., Liu, J., & Liu, Q. (2022b). Deletion of Toxoplasma Rhopty Protein 38 (Pru Δ rop38) as a Vaccine Candidate for Toxoplasmosis in a Murine Model. *Biomedicines*, 10(6), 1336. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061336>
- Yano, A., Onozuka, A., Asahi-Ozaki, Y., Imai, S., Hanada, N., Miwa, Y., & Nisizawa, T. (2005). An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine*, 23(17–18), 2322–2326. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.031>
- Yano, A., Onozuka, A., Matin, K., Imai, S., Hanada, N., & Nisizawa, T. (2003). RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanicity of peptide antigens following intranasal immunization. *Vaccine*, 22(2), 237–243. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00561-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00561-9)
- Yap, G. S., Scharon-Kersten, T., Charest, H., & Sher, A. (1998). Decreased resistance of TNF receptor p55-and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *The Journal of Immunology*, 160(3), 1340-1345.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., & Sher, A. (2005). Immunology: TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308(5728), 1626–1629. <https://doi.org/10.1126/science.1109893>.
- Zhao, G., Zhou, A., Lu, G., Meng, M., Sun, M., Bai, Y., ... & He, S. (2013). Identification and characterization of Toxoplasma gondii aspartic protease 1 as a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Parasites & vectors*, 6(1), 1-13.

Anexos

Anexo I

Especificidad de TLN1, posterior al alineamiento múltiple frente a *Toxoplasma gondii*

Proteína	Toxoplasma gondii	Especificidad
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii	100%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii TgCATBr9	100%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii FOU	100%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii COUG	100%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii VAND	100%
TPA: M16 family peptidase, putative	Toxoplasma gondii VEG	95%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii RUB	100%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii VEG	81%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii GT1	76%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii ARI	73%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii TgCatPRC2	73%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii CAST	73%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii p89	70%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii MAS	62%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii GAB2-2007-GAL-DOM2	55%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii	67%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii CAST	36%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii ARI	39%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii MAS	39%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii p89	39%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii GT1	39%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii TgCatPRC2	38%
rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	Toxoplasma gondii VEG	21%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii VEG	24%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii ME49	24%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii TgCATBr9	24%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii VAND	24%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii COUG	24%
sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii MAS	38%
sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii GT1	38%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii p89	24%
sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii TgCatPRC2	38%
TPA: insulysin, putative	Toxoplasma gondii VEG	38%
sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii ME49	38%

sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii RUB	38%
sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii VAND	33%
sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii p89	38%
sporozoite developmental protein	Toxoplasma gondii GAB2-2007-GAL-DOM2	33%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii	10%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii GT1	20%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii MAS	20%
peptidase M16 inactive domain-containing protein	Toxoplasma gondii GAB2-2007-GAL-DOM2	20%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii ARI	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii COUG	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii VEG	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii GT1	13%
TPA: peptidase M16 domain containing protein	Toxoplasma gondii VEG	13%
putative metalloproteinase TLN4	Toxoplasma gondii	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii GAB2-2007-GAL-DOM2	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii VAND	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii RUB	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii p89	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii CAST	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii TgCatPRC2	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii FOU	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii MAS	13%
toxolysin TLN4	Toxoplasma gondii ME49	13%
putative insulysin	Toxoplasma gondii VAND	11%
putative insulysin	Toxoplasma gondii CAST	10%
putative insulysin	Toxoplasma gondii GT1	11%
insulysin, putative	Toxoplasma gondii ME49	11%
putative insulysin	Toxoplasma gondii VEG	10%
putative insulysin	Toxoplasma gondii TgCatPRC2	11%
putative insulysin	Toxoplasma gondii COUG	11%
putative insulysin	Toxoplasma gondii ARI	11%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii p89	15%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii TgCATBr9	15%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii FOU	15%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii CAST	15%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii TgCatPRC2	15%
hypothetical protein TGME49_314850	Toxoplasma gondii ME49	15%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii COUG	15%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii MAS	15%
hypothetical protein TGGT1_314850	Toxoplasma gondii GT1	15%
hypothetical protein TGVAND_314850B	Toxoplasma gondii VAND	15%
putative insulysin	Toxoplasma gondii TgCATBr9	8%
putative peptidase M16 family poetin	Toxoplasma gondii VEG	12%

mitochondrial processing peptidase	Toxoplasma gondii VAND	12%
peptidase M16 family potein, putative	Toxoplasma gondii ME49	12%
putative transmembrane protein	Toxoplasma gondii RUB	6%
hypothetical protein TGARI_314850B	Toxoplasma gondii ARI	6%

Anexo II

Especificidad de TLN1, posterior al alineamiento multiple frente a *Homo sapiens*

Proteína (<i>Homo sapiens</i>)	Especificidad
insulin-degrading enzyme isoform X7	37%
insulin-degrading enzyme isoform X5	37%
insulin-degrading enzyme isoform X6	35%
insulin-degrading enzyme isoform X8	33%
insulin-degrading enzyme isoform 3	50%
insulin-degrading enzyme isoform X2	50%
Cryo-EM structure of human insulin degrading enzyme in complex with FAB H11-E heavy chain, FAB H11-E light chain and insulin	44%
insulin-degrading enzyme isoform X3	48%
The structure of cysteine-free human insulin degrading enzyme	44%
Chain A, Insulin-degrading enzyme	44%
Crystal structure of human insulin-degrading enzyme in complex with amyloid-beta (1-42)	46%
insulin-degrading enzyme isoform 1	46%
Chain A, Insulin-degrading enzyme	44%
Structure of Cysteine-free Human Insulin Degrading Enzyme in Complex with Macrocyclic Inhibitor	44%
Crystal structure of human insulin-degrading enzyme in complex with insulin	44%
insulin-degrading enzyme isoform 5	44%
insulin-degrading enzyme isoform X1	46%
Crystal structure of insulin degrading enzyme complexed with inhibitor tert-butyl [(2S)-2-(2,5-difluorophenyl)-3-(quinolin-3-yl)propyl]carbamate	44%
Substrate-free IDE structure in its closed conformation	44%
Chain A, Insulin-degrading enzyme	44%
Chain A, Insulin-degrading enzyme	35%
unnamed protein product	44%
insulin-degrading enzyme	42%
insulin-degrading enzyme isoform 4	46%
nardilysin	31%

nardilysin convertase	31%
unnamed protein product	31%
NRD convertase	31%
NRD1 protein	31%
nardilysin isoform b precursor	31%
NRD1 convertase	31%
unnamed protein product	31%
nardilysin convertase	31%
nardilysin isoform a	31%
NRD2 convertase	31%
nardilysin convertase	31%
nardilysin isoform c [31%
nardilysin isoform	31%
nardilysin (N-arginine dibasic convertase), isoform CRA_b	31%
nardilysin (N-arginine dibasic convertase), isoform CRA_a	31%
insulin degrading enzyme	14%
insulysin variant	21%
apolipoprotein A-IV precursor	10%
apolipoprotein A-IV precursor	8%
Dimeric apoA-IV	8%
apolipoprotein A-IV precursor	8%
Apolipoprotein A-IV	8%
insulin-degrading enzyme isoform 2	8%
insulin-degrading enzyme isoform 6	8%
regulator of G-protein signaling 3 isoform 11	8%
regulator of G-protein signaling 3 isoform 8 precursor	8%
RecName: Full=Regulator of G-protein signaling 3; Short=RGP3; Short=RGS3	8%
Regulator of G-protein signaling 3	8%
unnamed protein product	8%
regulator of G-protein signaling 3 isoform 12	8%
PDZ-RGS3	8%
RGS3 isoform PDZ-RGS3	8%

Anexo III

Especificidad de TLN1, posterior al alineamiento multiple frente a *Mus muscus*

Proteína (Mus musculus)	Especificidad
insulin-degrading enzyme isoform X2	48%
RecName: Full=Insulin-degrading enzyme; AltName: Full=Insulin protease; Short=Insulinase; AltName: Full=Insulysin	45%
insulin-degrading enzyme	45%
insulin-degrading enzyme isoform X1	35%
Nardilysin, N-arginine dibasic convertase, NRD convertase 1	31%
nardilysin isoform 2 precursor	31%
nardilysin isoform 1	31%
nardilysin isoform 3	31%
unnamed protein product	23%
unnamed protein product	6%

Anexo IV

Alineamiento múltiple PPA Vs *Toxoplasma gondii*

Proteína	Toxoplasma gondii	Inicio	Final	Longitud	Péptido	Especificidad
TLN1	VAND	862	870	9	VLELIMHPH	9 de 9
	FOU					
	TgCATBr9					
	COUG					
	ME49					
	VEG					
	RUB					
	GT1					
	ARI					
	TgcCatPRC2					
	CAST					
	p89					
	MAS					
	GAS2-2007-GAL-DOM2					
Hypothetical protein 222192	ME49	18	26	9	VLEL**HPH	7 de 9*
	GT1					
	TgcCatPRC2					

	VAND					
	RUB					
	VEG					
TPA: hypothetical protein BN1205_052925	VEG	18	26	9	VLEL**HPH	7 de 9*
Hypothetical protein 222192A	MAS	18	26	9	VLEL**HPH	7 de 9*
	COUG					
	ARI					
DNA polymerase (pol2) superfamily protein	GAB2-2007-GAL-DOM2	1475	1479	5	IMHPH	5 de 9
	TgCATBr9					
	GT1					
	ME49					
	RUB					
	VAND					
	MAS					
	COUG					
	ARI					
	p89					
DNA polymerase alpha catalytic subunit	Toxoplasma gondii	1475	1479	5	IMHPH	5 de 9
DNA-directed RNA polymerase III RPC2	CAST	1141	1147	7	+LIM*PH	5 de 9*
	ME49	1137	1143	7	+LIM*PH	5 de 9*
	GT1	1133	1139	7	+LIM*PH	5 de 9*
	RUB	1133	1139	7	+LIM*PH	5 de 9*
	COUG	1132	1138	7	+LIM*PH	5 de 9*
	VEG	1129	1135	7	+LIM*PH	5 de 9*
TPA: DNA-directed RNA polymerase III subunit, putative	VEG	1119	1125	7	+LIM*PH	5 de 9*
DNA-directed RNA polymerase II RPB2	ME49	1048	1054	7	+LIM*PH	5 de 9*
	COUG	1048	1054	7	+LIM*PH	5 de 9*
	ARI	840	846	7	+LIM*PH	5 de 9*
	FOU	231	237	7	+LIM*PH	5 de 9*
	TgCATBr9	211	217	7	+LIM*PH	5 de 9*
	ARI	211	217	7	+LIM*PH	5 de 9*
Clathrin heavy chain, putative	ME49	1417	1421	5	LIMHP	5 de 9
Chain i, clathrin d6 coat with auxilin j-domain	MAS	1417	1421	5	LIMHP	5 de 9
	GAS2-2007-GAL-DOM2	639	643	5	LIMHP	5 de 9

	p89					
Putative clathrin heavy chain	COUG	627	631	5	LIMHP	5 de 9
Chain i, clathrin d6 coat with auxilin j-domain, partial	RUB	639	643	5	LIMHP	5 de 9
	ARI	627	631	5	LIMHP	5 de 9
4-alpha-glucanotransferase	ME49	13	17	5	LIMHP	5 de 9
	RUB					
	ARI					
	GT1					
Chain i, clathrin d6 coat with auxilin j-domain, partial	FOU	328	332	5	LIMHP	5 de 9
Putative clathrin heavy chain, partial	TgCATBr9	168	172	5	LIMHP	5 de 9
Hypothetical protein 285480	COUG	423	427	5	LELIM	5 de 9
	ARI	413	417	5	LELIM	5 de 9
	GT1					
	ME49					
	MAS					
	VEG	412	416	5	LELIM	5 de 9
	RUB					
	CAST	410	414	5	LELIM	5 de 9
	TgcCatPRC2	427	431	5	LELIM	5 de 9
Serine/threonine protein phosphatase	ME49	243	247	5	LELIM	5 de 9
	TgcCatPRC2					
	GT1					
	FOU					
	COUG					
	p89					
	TgCATBr9					
Putative ATP-binding surface antigen	GAB2-2007-GAL-DOM2	2781	2788	8	VL+LI*MH	6 de 9*
Hypothetical protein 288960	ME49	2661	2668	8	VL+LI*MH	6 de 9*
	GT1					
Putative ATP-binding surface antigen	VAND	2661	2668	8	VL+LI*MH	6 de 9*
	ARI					
	MAS					
	COUG					
	VEG					

	TgcCatPRC2					
	RUB					
RPAP1 family, C-terminal protein	RUB	314	323	10	L+L***MHPH	6 de 9*
	ME49					
	p89					
	VAND					
	ARI					
	MAS					
	FOU					
	TgcCatPRC2					
	COUG					
	CAST					

Alineamiento multiple PPA Vs *Homo sapiens*

Proteína (Homo sapiens)	Inicio	Final	Longitud	Péptido	Especificidad
glutathione S-transferase A4	103	110	8	LEL*IMHP	7 de 9*
glutathione S-transferase A4 isoform X2	66	73	8	LEL*IMHP	7 de 9*
unnamed protein product	47	54	8	LEL*IMHP	7 de 9*
glutathione S-transferase A4, isoform CRA_c, partial	66	73	8	LEL*IMHP	7 de 9*
GSTA4 protein	10	17	8	LEL*IMHP	7 de 9*
WD repeat-containing protein 90 isoform X1	1607	1614	8	EL*MHPH	6 de 9*
WD repeat-containing protein 90	1517	1524	8	EL*MHPH	6 de 9*
WD repeat-containing protein 90 isoform X2	720	727	8	EL*MHPH	6 de 9*
hCG1985539, isoform CRA_e	116	123	8	EL*MHPH	6 de 9*
WDR90 protein	116	123	8	EL*MHPH	6 de 9*
hCG1985539, isoform CRA_a	116	123	8	EL*MHPH	6 de 9*
unnamed protein product	116	123	8	EL*MHPH	6 de 9*
hCG1985539, isoform CRA_h	1	8	8	EL*MHPH	6 de 9*
protein CFAP20DC isoform 7	344	348	5	EL*MHPH	6 de 9*
FLJ42117 protein, isoform CRA_i	344	348	5	EL*MHPH	6 de 9*
protein CFAP20DC isoform 1	289	293	5	IMHPH	5 de 9
FLJ42117 protein, isoform CRA_e	344	348	5	IMHPH	5 de 9
FLJ42117 protein, isoform CRA_g	344	348	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform X3	344	348	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform X4	344	348	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform X5	344	348	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform X6	219	223	5	IMHPH	5 de 9

protein CFAP20DC isoform X7	344	348	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform X8	165	169	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform 2	139	143	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform 3	219	223	5	IMHPH	5 de 9
unnamed protein product	34	38	5	IMHPH	5 de 9
protein CFAP20DC isoform 4	34	38	5	IMHPH	5 de 9
Olfactory receptor, family 2, subfamily Y, member 1	135	139	5	IMHPH	5 de 9
olfactory receptor, partial	68	72	5	IMHPH	5 de 9
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform X1	606	611	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform 1	606	611	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform X2	606	611	6	L+LIMH	5 de 9*
unnamed protein product	516	521	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform X3	444	449	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform 2	444	449	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform X4	606	611	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform X5	306	311	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform 3	306	311	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform 3	138	143	6	L+LIMH	5 de 9*
PAX5/FOXP1 fusion protein	469	474	6	LIM*PH	5 de 9*
myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse), isoform CRA_b	388	392	5	ELIMH	5 de 9
interferon-induced GTP-binding protein Mx2	377	381	5	ELIMH	5 de 9
zinc finger protein 81 (HFZ20), isoform CRA_b, partial	397	401	5	ELIMH	5 de 9
forkhead box P1, isoform CRA_e	298	303	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform d	269	274	6	LIM*PH	5 de 9*
p78-related protein, partial	349	353	5	ELIMH	5 de 9
forkhead box P1, isoform CRA_b	269	274	6	LIM*PH	5 de 9*
unnamed protein product	269	274	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform a	269	274	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform j	268	273	6	LIM*PH	5 de 9*

Alineamiento múltiple PPA Vs *Mus musculus*

Proteína (<i>Mus musculus</i>)	Inicio	Final	Longitud	Péptido	Especificidad
----------------------------------	--------	-------	----------	---------	---------------

probable G-protein coupled receptor 83 isoform X1	227	233	7	LE*IMHP	6 de 9*
glucocorticoid induced receptor, partial	227	233	7	LE*IMHP	6 de 9*
probable G-protein coupled receptor 83 isoform X2	190	196	7	LE*IMHP	6 de 9*
WD repeat-containing protein 90	1661	1668	8	EL*MHPH	6 de 9*
RecName: Full=WD repeat-containing protein 90	1643	1650	8	EL*MHPH	6 de 9*
mKIAA1924 protein, partial	1551	1558	8	EL*MHPH	6 de 9*
mCG17671, isoform CRA_a	1444	1451	8	EL*MHPH	6 de 9*
Wdr90 protein	533	540	8	EL*MHPH	6 de 9*
Wdr90 protein, partial	432	439	8	EL*MHPH	6 de 9*
Wdr90 protein, partial	230	237	8	EL*MHPH	6 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2	621	626	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform X1	306	311	6	L+LIMH	5 de 9*
mCG11938	231	236	6	L+LIMH	5 de 9*
3'-5' RNA helicase YTHDC2 isoform X2	65	70	6	L+LIMH	5 de 9*
mCG21053, isoform CRA_a	615	619	5	LIMHP	5 de 9
Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 3	615	619	5	LIMHP	5 de 9
heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 3	615	619	5	LIMHP	5 de 9
bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 3 isoform 1	615	619	5	LIMHP	5 de 9
forkhead box protein P1 isoform X8	299	304	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform X1	299	304	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform X2	298	303	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform X3	299	304	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform 1	297	302	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform 4	298	303	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform 2	265	270	6	LIM*PH	5 de 9*

forkhead box P1	299	304	6	LIM*PH	5 de 9*
Ndst3 protein	615	619	5	LIM*PH	5 de 9*
forkhead-related transcription factor 1B	297	302	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform X5	169	174	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform 3	168	173	6	LIM*PH	5 de 9*
forkhead box protein P1 isoform X7	169	174	6	LIM*PH	5 de 9*
unnamed protein product, partial	122	127	6	LIM*PH	5 de 9*
unnamed protein product	200	204	5	LIMHP	5 de 9
bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 3 isoform 2	200	204	5	LIMHP	5 de 9
forkhead-related transcription factor 1C	47	52	6	LIM*PH	5 de 9
unnamed protein product	61	66	6	LIM*PH	5 de 9
GC Binding Protein - 23b	17	30	14	LELI*****MH P	7 de 9*
unnamed protein product	215	220	6	EL*MHP	5 de 9*
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	215	220	6	EL*MHP	5 de 9*
unnamed protein product	215	220	6	EL*MHP	5 de 9*
glutathione S-transferase P-like isoform X2	24	29	6	LI+HPH	5 de 9*
DNA segment, Chr 19, Brigham & Women's Genetics 1357 expressed, isoform CRA_a	319	323	5	LELIM	5 de 9
DNA segment, Chr 19, Brigham & Women's Genetics 1357 expressed, isoform CRA_b, partial	315	319	5	LELIM	5 de 9
pumilio homolog 3	302	306	5	LELIM	5 de 9
RecName: Full=Pumilio homolog 3	301	305	5	LELIM	5 de 9
mKIAA0020 protein, partial	150	154	5	LELIM	5 de 9
unnamed protein product	144	148	5	LELIM	5 de 9
DNA damage-binding protein 2 isoform 1	324	331	8	L*LI*HPH	6 de 9*
damage specific DNA binding protein 2, isoform CRA_b, partial	236	243	8	L*LI*HPH	6 de 9*

FGFR1 oncogene partner 2 homolog isoform 1	97	101	5	LELIM	5 de 9
unnamed protein product	97	101	5	LELIM	5 de 9
D19Bwg1357e protein	144	148	5	LELIM	5 de 9
damage specific DNA binding protein 2, isoform CRA_c, partial	138	145	8	L*LI*HPH	6 de 9*
unnamed protein product, partial	80	84	5	LELIM	5 de 9
unnamed protein product	101	105	5	LELIM	5 de 9
FGFR1 oncogene partner 2 homolog isoform 2	97	101	5	LELIM	5 de 9
unnamed protein product	97	101	5	LELIM	5 de 9
suppressor of IKBKE 1	101	105	5	LELIM	5 de 9
unnamed protein product	101	105	5	LELIM	5 de 9
huntingtin-interacting protein K	95	99	5	LELIM	5 de 9
unnamed protein product, partial	90	94	5	LELIM	5 de 9
unnamed protein product, partial	110	117	8	VLE*I*HP	6 de 9*
proliferation marker protein Ki-67	2453	2462	10	EL***IMHP+	6 de 9*
proliferation marker protein Ki-67 isoform X1	2309	2318	10	EL***IMHP+	6 de 9*
Ki-67	2213	2222	10	EL***IMHP+	6 de 9*
proliferation marker protein Ki-67 isoform X2	2133	2142	10	EL***IMHP+	6 de 9*
phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4 isoform X1	399	404	6	LELI+H	5 de 9*
phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	399	404	6	LELI+H	5 de 9*
Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 4, p150	399	404	6	LELI+H	5 de 9*
mCG4618	399	404	6	LELI+H	5 de 9*
Pik3r4 protein	399	404	6	LELI+H	5 de 9*
Pik3r4 protein	399	404	6	LELI+H	5 de 9*
unnamed protein product	399	404	6	LELI+H	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform X1	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*

sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform 1	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform X3	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform X4	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform X5	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform 2	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2, isoform CRA_d, partial	78	83	6	L*LIMH	5 de 9*
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2, isoform CRA_b	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2, isoform CRA_c, partial	78	83	6	L*LIMH	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform X7	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform X8	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
sodium-dependent phosphate transport protein 3 isoform X9	20	25	6	L*LIMH	5 de 9*
unnamed protein product	128	138	11	VLELI****HP	7 de 9*
2,4-dienoyl-CoA reductase [(3E)-enoyl-CoA-producing], mitochondrial precursor	128	138	11	VLELI****HP	7 de 9*
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	128	138	11	VLELI****HP	7 de 9*
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial isoform X1	78	88	11	VLELI****HP	7 de 9*
fertilization antigen-1	63	69	7	LE*I+HP	5 de 9*
mCG1041360	31	36	6	LELI+H	5 de 9*
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein isoform X1	614	619	6	VL*LIMH	6 de 9*

lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein isoform X2	1852	1857	6	V*EL+M	5 de 9*
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein isoform X3	614	619	6	VL*LIMH	6 de 9*
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein isoform X4	614	619	6	VL*LIMH	6 de 9*
RecName: Full=Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein; AltName: Full=Beige-like protein	614	619	6	VL*LIMH	6 de 9*
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein isoform alpha	614	619	6	VL*LIMH	6 de 9*
nipped-B-like protein isoform a	2167	2172	6	VLEL*M	5 de 9*
LBA isoform beta	614	619	6	VL*LIMH	6 de 9*
lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein isoform beta	614	619	6	VL*LIMH	6 de 9*