



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Evaluación del efecto inmunoprotector de un dipéptido
inmunogénico derivado de toxolisina 4 (TLN4) en un modelo murino
de toxoplasmosis aguda”**

T E S I S

Que presenta

MVZ. ITZEL GUADALUPE AGUILAR LÓPEZ

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA
Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directores de la Tesis:

Dr. Marco Antonio Vega López

Dr. Ricardo Mondragón Flores

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 5, Inmunobiología de las Mucosas, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular y en el laboratorio 16, Patógenos Intracelulares, del Departamento de Bioquímica, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al **Dr. Marco Antonio Vega López** por sus excelentes clases de maestría y por instruirme en el camino de la inmunobiología al aceptarme como parte de su laboratorio. Además, le agradezco por su paciencia, apoyo y consejos para la mejora de mi formación como maestra en ciencias.
- Agradezco al **Dr. Ricardo Mondragón Flores** por sus excelentes clases que potenciaron mi curiosidad en el estudio de *Toxoplasma gondii* y me animaron a solicitar la colaboración entre los departamentos de Infectómica y Patogénesis Molecular y el Departamento de Bioquímica. Por toda su asesoría en el ámbito y también por aceptarme como parte del equipo de trabajo de su laboratorio para mi formación como maestra en ciencias.
- Agradezco al **Dr. José Luis Rosales Encina** por su asesoría y disposición para con el trabajo, por sus aportaciones y sugerencias. Le agradezco además por sus clases sobre análisis de proteínas en la maestría, las cuales me fueron de infinita ayuda para el desarrollo del proyecto.
- Agradezco al **Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández**, por su asesoría y disposición para con el proyecto. Le agradezco infinitamente por sus clases en la maestría sobre organismos Apicomplexa y bioinformática, lo cual ayudó de manera considerable al enriquecimiento del trabajo.

- Agradezco infinitamente el apoyo de la **biól. María del Carmen Ramírez Estudillo**, por toda la asistencia técnica brindada durante mi estancia en el laboratorio 5. Le agradezco también por todos sus consejos tanto del laboratorio, como de la vida diaria, por brindarme su conocimiento y experiencia, por todas sus correcciones, y sobretodo, por su amistad. Agradezco también infinitamente al técnico de laboratorio, **Luis Alberto Hernández González**, por todo su apoyo y asistencia técnica brindada durante mi estancia en el laboratorio 5; por sus consejos, por compartirme su conocimiento del laboratorio y sobretodo, por su amistad.
- Agradezco a los médicos veterinarios zootecnistas encargados del bioterio, el **MVZ. Jorge Octavio Ramos Flores**, el **MVZ. Gustavo Adolfo Torres Franco** y la **MVZ. Diana Laura Peláez González**, por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio 5, por compartirme su experiencia y sus conocimientos del modelo experimental y sobretodo, por su amistad.
- Agradezco a la auxiliar del laboratorio 16 del departamento de Bioquímica: Patógenos intracelulares, la **Q.F.B. Mónica Edith Mondragón Castelán**, por todo su apoyo técnico brindado para la realización de este proyecto, por sus consejos, y por compartirme su conocimiento con respecto al estudio y manejo del parásito *Toxoplasma gondii*. Agradezco también al **Ing. José Claudio Jiménez Vargas** por toda su disposición y apoyo brindado en el laboratorio de patógenos intracelulares.
- Agradezco a la **I.B. Brenda Yomara García Sánchez**, a la **Ing. Karina Araujo Ruiz** y al **Dr. Noé Lagunas Cortés** por su apoyo y sus consejos durante mi estancia en el laboratorio de patógenos intracelulares. Les agradezco su enseñanza y su disposición; pero sobretodo, les agradezco su amistad y su escucha.
- Agradezco infinitamente al **Dr. Mario Frago Saavedra** por todo el apoyo brindado desde mi primer momento en el laboratorio de inmunobiología de las

mucosas; le agradezco su asesoría y su disposición para ayudarme. También le agradezco sus sabios consejos y su amistad.

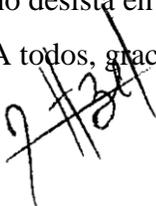
- Agradezco al **QFB. Victor Hugo Rosales García** y al **QBP. Wilfrido David Tapia Sánchez** por permitirme realizar los análisis pertinentes a la citometría de flujo, lo cuál es una parte crucial en este trabajo.
- Agradezco al **MVZ Jorge Fernández Hernández y la MVZ Antonieta López López**, de la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN, por el apoyo brindado con respecto al modelo experimental.
- Agradezco al **Consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada durante el periodo 2020 – 2022 y al proyecto #51486 FORDECyT-PRONACES "CIENCIAS DE FRONTERAS 2019", a cargo del **Dr. Ricardo Mondragón Flores** del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV.
- Agradezco al **Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular** por aceptarme en su programa de posgrado para realizar mis estudios de maestría y por absolutamente todo el conocimiento brindado. Agradezco también al **Departamento de Bioquímica** por aceptar la colaboración de trabajo entre departamentos y por absolutamente todo el conocimiento y apoyo brindado durante mis estudios de maestría.
- Agradezco infinitamente a la **Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano**, por su cálida bienvenida, por sus excelentes clases de biología molecular, por su disposición para con los estudiantes, por sus asesorías y consejos, y, sobretodo, por su apoyo incondicional en toda mi estancia en el CINVESTAV. Agradezco también a la jefa del Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular, la **Dra. Rosa Ma. del Angel Núñez de Cáceres**, por aceptarme en su programa de posgrado, por todo su apoyo, asesorías y consejos durante mi estancia en el CINVESTAV.

- Agradezco infinitamente al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)**, Unidad Zacatenco, por permitirme realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones, por el financiamiento otorgado para poder avanzar un peldaño en mi formación profesional y sobretodo por el conocimiento, experiencias e increíbles amistades adquiridas durante mi estancia en la institución.

Dedicatorias especiales

- Agradezco a mi madre, **América Nayeli López Sánchez**, por sus consejos, su amistad, por su apoyo moral e incondicional, por no dejarme desistir en alcanzar mis sueños y por siempre confiar en mí. Agradezco a mi hermano, **Luis Fernando Aguilar López** por ser mi mayor fuente de inspiración para siempre mejorar todo lo que realizo en esta vida.
- Agradezco a mi novio, **Rafael Gallardo Mézquita**, por estar en mi vida en estos momentos y hacerme ver todo de una manera tan diferente, por siempre apoyarme e impulsarme a perseguir mis sueños, y por no dejarme desistir bajo ninguna circunstancia.
- Finalmente, agradezco a las amistades que obtuve durante mi estancia en el CINVESTAV; a **Rodolfo Martínez Carranza** por ser uno de los pilares que me mantuvieron motivada durante mi estancia en la maestría, por todos sus consejos, por su escucha y por su amistad incondicional; a **Fernando Rodríguez León**, por todo su apoyo brindado, por su escucha, y por brindarme su amistad incondicional durante mi estancia en el CINVESTAV; a la **Dra. Karla Berenice Acosta Virgen** por todo su apoyo incondicional, por escucharme, por aconsejarme y por hacer que no desista en mis estudios, en mi formación o en mis sueños.

A todos, gracias.



Abreviaturas

- ADSL.** Adenilosuccinatoliasa
- AGC.** Cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos
- APC.** Célula presentadora de antígeno.
- APR.** Anillo polar apical
- BAG.** Antígeno de superficie del bradizoíto
- BCA.** Ácido bicinconínico
- BCR.** Receptor de linfocitos B
- BFD1.** Factor de formación deficiente del bradizoíto 1
- BLAST.** *Basic local alignment search tool*
- BSA.** Albúmina bovina sérica
- CBA.** *Cytometric bead array*
- COX.** Ciclooxygenasa
- DAPI.** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DC.** Célula dendrítica
- DNA.** Ácido desoxirribonucleico
- ET.** Extracto total
- FITC.** Fluoresceína-5-isotiocianato
- GLA-SE.** *Glucopyranosyl lipid adjuvant stable emulsion*
- GRA.** Proteína de los gránulos densos
- HD.** Hospedador definitivo
- HI.** Hospedador intermediario
- HRP.** Peroxidasa de rábano
- IDE.** Insulina proteasa/insulinasa
- IEDB.** *Immune epitope database and analysis resource*
- IET.** Inmunoelectrotransferencia
- IFA.** Adyuvante incompleto de Freund

IFN- γ . Interferón gamma

IL. Interleucina

IMC. Complejo de membrana interna

KO. *Knockout*

LB. Linfocito B

LT. Linfocito T

LPS. Lipopolisacárido

MAPK. Proteína cinasa activada por mitógenos

MIC. Proteína de los micronemas

MHC-I. Complejo principal de histocompatibilidad de clase I

MHC-II. Complejo principal de histocompatibilidad de clase II

MJ. Unión móvil

MPLA. Monofosforil lípido A

NCBI. *The national center for biotechnology information*

NF κ B. Factor nuclear κ B

NK. *Natural killer*

ON. Óxido nítrico

PBS. Solución salina amortiguada por fosfatos

PE. Ficoeritrina

PL. Fosfolipasa tipo II

PLP1. Proteína tipo perforina 1

PES. Productos de excreción secreción

PM. Peso molecular

PRR. Receptor de respuesta innata

PVM. Membrana de la vacuola parasitófora

PV. Vacuola parasitófora

RD. Dominio repetido

RE. Retículo endoplásmico

RON. Proteína del cuello de las roptrias

ROP. Proteína del bulbo de las roptrias

ROS. Especies reactivas de oxígeno

SAG. Antígeno de superficie del taquizoíto

SFB. Suero fetal bovino

SP. Péptido señal

TA. Temperatura ambiente

TAP. Transportador asociado al procesamiento de antígeno

TgPLP1. Proteína tipo perforina de *T. gondii*

TMB. Tetrametilbencidina

TLN4. Toxolisina 4

TCR. Receptor de linfocitos T

TLR. Receptor tipo Toll

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa

ÍNDICE

RESUMEN	14
ABSTRACT.....	15
1. Introducción	16
1.1 Morfología y estructura de <i>Toxoplasma gondii</i>	17
1.2 Epidemiología de la toxoplasmosis	20
1.3 Ciclo de vida	21
1.4 Toxoplasmosis en humanos	24
1.5 Toxoplasmosis en animales domésticos	24
1.6 Respuesta inmune ante <i>Toxoplasma gondii</i>	25
1.7 Evasión de la respuesta inmune por <i>Toxoplasma gondii</i>	26
1.8 Invasión celular y diseminación tisular de <i>Toxoplasma gondii</i>	27
1.9 Toxolisina 4 de <i>Toxoplasma gondii</i> (TgTLN4)	30
1.1.1 Tratamientos y vacunas contra <i>Toxoplasma gondii</i>	31
2. Justificación	35
3. Hipótesis	35
4. Objetivos	36
4.1 Objetivo general	36
4.2 Objetivos particulares <i>in silico</i>	36
4.2.1 Objetivos particulares <i>in vivo</i>	36
5. Diseño experimental	37
6. Metodología	38
6.1 <i>In silico</i>	38
6.2 <i>In vivo</i>	40
6.2.1 Animales	40
6.2.2 Protocolo de inmunización y sangrado de los ratones	40
6.2.3 Obtención de parásitos	41
6.2.4 Obtención de extracto total (ET) de <i>T. gondii</i>	42
6.2.5 Citometría de flujo	42
6.2.6 Determinación de IgG1/IgG2a totales en suero por ELISA cuantitativo	43
6.2.7 Determinación de IgM e IgG séricas Ag específicas por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) cuantitativo	44
6.2.8 Inmunodetección de TLN4 en parásitos extracelulares	45
6.2.9 Inmunoelectrotransferencia (IET)	46
7. Resultados	47

7.1 Resultados <i>in silico</i>	47
7.1.1 Modelado de la estructura tridimensional de TLN4	47
7.1.2 Epítomos de TLN4 para su reconocimiento por linfocitos B y linfocitos TCD4+	52
7.1.3 Estructura final del dipéptido derivado de TLN4	55
7. 2 Resultados <i>In vivo</i>	58
7.2.1 Determinación del patrón de citocinas séricas en sueros de ratones inmunizados	58
7.2.2 Relación IgG1/IgG2a en sueros de ratones inmunizados	64
7.2.3 Evaluación de los isotipos IgM e IgG contra el dipéptido derivado de TLN4 65	
7.2.4 Localización de TLN4 en taquizoítos extracelulares	67
7.2.5 Reconocimiento del dipéptido en TLN4 nativa de ET de <i>T. gondii</i>	69
7.2.6 Evaluación de la sobrevida de los ratones	71
8. Discusión.....	71
<i>In silico</i>	72
<i>In vivo</i>	76
9. Conclusiones y perspectivas	81
10. Referencias.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica del taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	18
Figura 2. Organización del citoesqueleto de <i>T. gondii</i>	19
Figura 3. Esporulación del ooquiste de <i>T. gondii</i>	22
Figura 4. Establecimiento de una infección crónica por <i>T. gondii</i>	23
Figura 5. Producción de IFN- γ ante una infección por <i>T. gondii</i>	27
Figura 6. Invasión celular por <i>T. gondii</i>	29
Figura 7. Posibles funciones de la toxolisina 4 de <i>T. gondii</i>	31
Figura 8. Diseño experimental.	37
Figura 9. Metodología <i>in silico</i>	39
Figura 10. Calendario de inmunización y obtención de suero para su análisis	41
Figura 11. Determinación de citocinas mediante citometría de flujo.	43
Figura 12. Dominios de la metaloproteasa toxolisina 4.	49
Figura 13. Gráfico de Ramachandran de TLN4.	50
Figura 14. Modelo de la estructura tridimensional de TLN4 de <i>T. gondii</i>	51
Figura 15. Gráfica del puntaje de antigenicidad por el método de Kolaskar & Tongaonkar.	53
Figura 16. Localización superficial de la secuencia de reconocimiento por los linfocitos B en TLN4.	54
Figura 17. Estructura del dipéptido derivado de la TLN4	56
Figura 18. Gráfico de Ramachandran del dipéptido derivado de TLN4 refinado.	57
Figura 19. Concentración de citocinas del perfil Th1 en suero de ratones inmunizados con el dipéptido derivado de TLN4.	61
Figura 20. Concentración de citocinas del perfil Th2 en suero de ratones inmunizados con el péptido derivado de TLN4.	63
Figura 21. Cociente de la relación IgG1/IgG2a en el grupo inmunizado con el dipéptido derivado de TLN4.	64
Figura 22. Concentración de IgM e IgG en sueros de ratones inmunizados con el dipéptido derivado de TLN4.	66
Figura 23. Localización intracelular de TLN4 en taquizoítos extracelulares.	68
Figura 24. Reconocimiento de TLN4 en ET de <i>T. gondii</i>	70
Figura 25. Sobrevida de los ratones inmunizados con el dipéptido derivado de TLN4 e infectados con taquizoítos de <i>T. gondii</i>	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antígenos y plataformas utilizados para inmunizar contra <i>Toxoplasma gondii</i>	34
Tabla 2. Epítipo de reconocimiento por LB	52
Tabla 3. Epítipo de reconocimiento por LTCD4+	53
Tabla 4. Características fisicoquímicas del dipéptido sintético	57

RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica producida por el protozooario *Toxoplasma gondii*, perteneciente al *phylum* Apicomplexa. Los hospederos definitivos (HD) del parásito son los felinos, como el gato doméstico, mientras que los hospedadores intermediarios (HI) son todos los animales de sangre caliente, incluido el ser humano. Actualmente, el tratamiento contra la toxoplasmosis es poco eficaz, costoso y posee importantes efectos adversos, por lo tanto, se deben dirigir los esfuerzos al desarrollo de vacunas para su control. El éxito de *T. gondii* radica en su capacidad de invadir cualquier célula nucleada del organismo, por un proceso en el que interviene su motilidad y la liberación de sus productos de excreción/secreción (PES). A través de los PES, *T. gondii* evade la respuesta inmune del hospedero y persiste de manera indefinida en el mismo, estableciendo así una infección crónica. La presencia de la metaloproteasa toxolisina 4 (TLN4) en los PES, podría sugerir que posee una función importante en la invasión y migración tisular del parásito. La TLN4 posee 53 epítopos accesibles para células B (LB) y un total de 20 péptidos con capacidad de unión al complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), lo que la podría hacer candidata para estudios de inmunoprotección contra la toxoplasmosis humana en el modelo murino. En el presente trabajo, se evaluó la utilización de dos epítopos de la proteína TLN4 con capacidad de unión al MHC-II y al receptor de linfocitos B (BCR), en un modelo murino de toxoplasmosis aguda, con la finalidad de caracterizar la respuesta productora de anticuerpos contra esta proteína y su potencial inmunoprotector.

Palabras clave: *Toxoplasma*, toxolisina, Apicomplexa, inmunógeno, insulinas, adyuvante, transmigración paracelular.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, belonging to the *phylum* Apicomplexa. The definitive hosts (HD) of the parasite are felines, such as the domestic cat, while the intermediate hosts (HI) are all warm-blooded animals, including humans. Currently, the treatment against toxoplasmosis is ineffective, expensive and has important adverse effects, therefore, efforts should be directed to the development of vaccines for its control. The success of *T. gondii* lies in its ability to invade any nucleated cell in the organism, through a process that involves its motility and the release of its excretion/secretion products (PES). Through PES, *T. gondii* evades the host's immune response and persists indefinitely in the host, thus establishing a chronic infection. The presence of the metalloprotease toxolysin 4 (TLN4) in PES could suggest that it has an important role in the invasion and tissue migration of the parasite. TLN4 has 53 accessible epitopes to B cells (LB) and a total of 20 peptides capable of binding to the major histocompatibility complex class II (MHC-II), which could make it a candidate for immunoprotection studies against human toxoplasmosis in the murine model. In the present study, we evaluated the usage of two epitopes of the TLN4 protein with binding capacity to MHC-II and to the B lymphocyte receptor (BCR) in a murine model of acute toxoplasmosis, in order to characterize the productive response of antibodies against this protein and its immunoprotective potential.

Keywords: Toxoplasma, toxolysin, Apicomplexa, immunogen, insulinase, adjuvant, paracellular transmigration.

1. Introducción

En 1908, Nicolle y Manceaux identificaron al protozooario parásito *Toxoplasma gondii*, en un roedor perteneciente a la especie *Ctenodactylus gundi* para el estudio de *Leishmania sp.* Su nombre deriva de su morfología (del griego antiguo, *toxon* = arco y *plasma* = vida) y del roedor en donde fue encontrado (Nicolle, 1908). El género *Toxoplasma* posee una sola especie y pertenece a la familia *Sarcocystidae* del *phylum* Apicomplexa, el cual comprende más de 5,000 protozoarios patógenos tanto de animales vertebrados como de invertebrados (revisado por Blader *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2015). Los organismos Apicomplexa, junto con los ciliados y dinoflagelados, forman el *superphylum* alveolata. Todos los alveolados comparten un sistema periférico de membrana, el cual es conocido en los Apicomplexa como “complejo de membrana interna” (IMC, por sus siglas en inglés) (revisado por Blader *et al.*, 2015). Los organismos de este *phylum* poseen un complejo apical, el cual es una estructura ubicada en la parte anterior del parásito, compuesta por organelos de secreción (micronemas, roptrias y gránulos densos), y por un organelo contráctil (conoide) (Rashid *et al.*, 2011). Los Apicomplexa son parásitos intracelulares obligados que invaden células de manera activa. Este proceso involucra la asociación de proteínas mediante exocitosis controlada a partir de organelos de secreción únicos, los micronemas y las roptrias (revisado por Cova *et al.*, 2022). Sin embargo, la característica más importante de los Apicomplexa es la formación de la “unión móvil” o *moving junction* -MJ-, en inglés, la cual es una invaginación de la membrana de la célula hospedera que se genera a partir del contacto con el parásito, para su internalización en una estructura denominada “vacuola parasitófora” (PV) (Alexander, 2005).

1.1 Morfología y estructura de *Toxoplasma gondii*

Existen tres formas invasivas de *T. gondii*: el taquizoíto, el bradizoíto, y el esporozoíto (revisado por Kim & Weiss, 2004; Najm, *et al.*, 2023). Los taquizoítos y bradizoítos están asociados con el hospedador intermediario y los esporozoítos con el hospedador definitivo. Los taquizoítos son responsables de la expansión de la progenie dentro del hospedador, mientras que, los bradizoítos y esporozoítos son capaces de la transmisión ambiental hacia nuevos hospedadores (revisado por Kim & Weiss, 2004). Todos los estadios infecciosos tienen la misma morfología básica, con variaciones menores. Los taquizoítos, con forma de media luna, comprenden un citoesqueleto, organelos secretorios (roptrias, micronemas y gránulos densos), organelos eucarióticos universales (mitocondria, núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas), y organelos derivados de dos endosimbiosis secundarias que involucraron el engullimiento de un alga con capacidad fotosintética previamente originada por la adquisición de una cianobacteria, (apicoplasto, acidocalcisomas y vacuolas) (revisado por Renaud *et al.*, 2022) todos delimitados por un complejo membranoso llamado “película” que rodea a todo el parásito y consiste en la membrana plasmática externa ubicada por encima de dos membranas internas fusionadas entre sí y separadas por un espacio de aproximadamente 15 nm (**Fig. 1**) (modificado de Blader *et al.*, 2015).

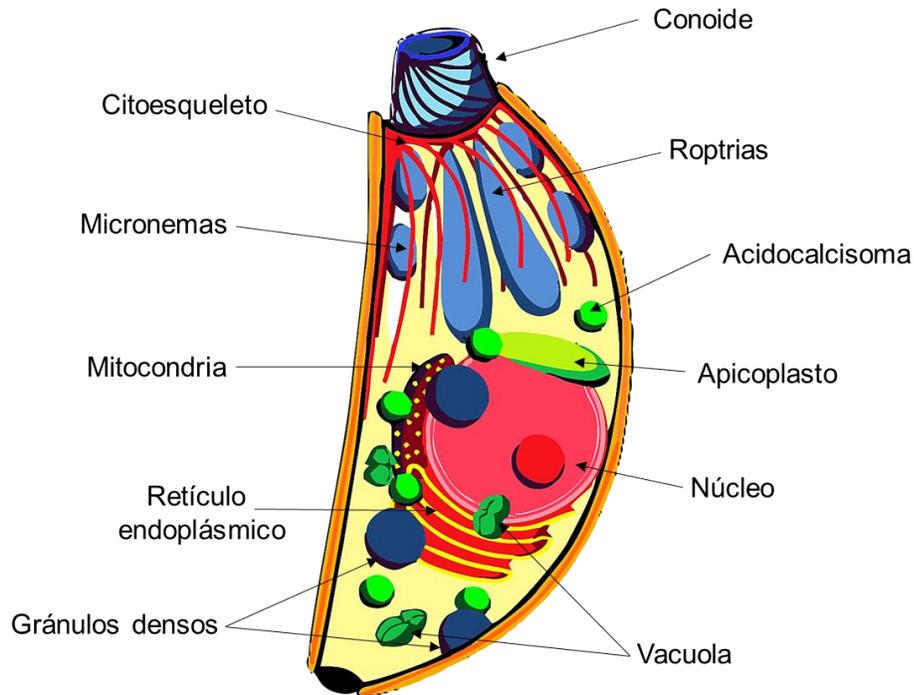


Figura 1. Estructura básica del taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. Organelos importantes para la invasión celular: micronemas, roptrias y gránulos densos (azul); organelos eucarióticos universales: núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria, citoesqueleto (rojo); organelos originados a partir de endosimbiosis secundarias: apicoplasto, acidocalcisosmas y vacuolas (verde) (Modificado de Blader *et al.*, 2015; Renaud *et al.*, 2022)

La organización del citoesqueleto de *T. gondii* involucra componentes como el conoide, el complejo apical, los microtúbulos subpeliculares, el IMC, la red subpelicular y el complejo basal (revisado por Díaz *et al.*, 2022). El conoide es un organelo ubicado en el extremo apical del parásito que puede retraerse o extenderse durante la motilidad e invasión en un mecanismo dependiente de calcio (Mondragón & Frixione, 1996), consiste en fibras de α -tubulina dispuestas en espiral, y asociado a este se encuentran dos anillos apicales localizados debajo de la membrana plasmática (**Fig. 2**) (Hu *et al.*, 2002). Por debajo del conoide se encuentra el anillo polar apical (APR por sus siglas en inglés) el cual marca el sitio desde el cual se organiza el IMC (revisado por Kim & Weiss, 2004; Díaz *et al.*, 2022). El APR funciona como un centro organizador (MTOC) para 22 microtúbulos subpeliculares que se extienden anclados a la cara citosólica del IMC por aproximadamente dos tercios del largo del cuerpo del

parásito (Nichols & Chiappino, 1987). El IMC consiste en placas fusionadas que se extienden a todo lo largo del cuerpo del parásito, formadas a partir de vesículas derivadas del aparato de Golgi. La caracterización de la ultraestructura completa del citoesqueleto de *T. gondii*, contribuye a la búsqueda de estrategias terapéuticas que involucran los componentes importantes para la invasión y motilidad de este microorganismo (Vivier & Petitprez, 1969; Díaz *et al.*, 2022).

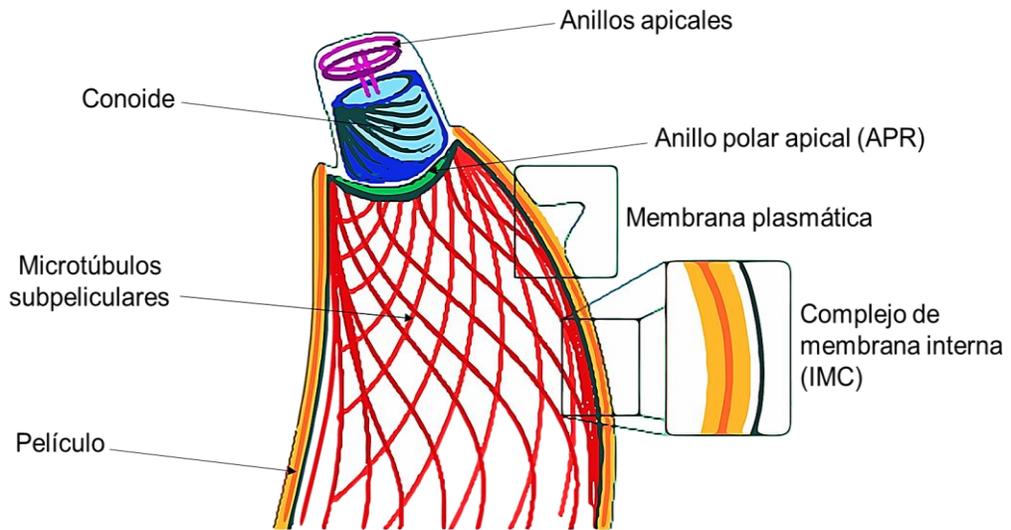


Figura 2. Organización del citoesqueleto de *Toxoplasma gondii*. El citoesqueleto involucra estructuras complejas como el conoide, el complejo apical, los microtúbulos subpeliculares, la red subpelicular y el complejo de membrana interna (IMC), el cual es común a todos los organismos apicomplexa (Modificado de Kim & Weiss, 2004; revisado por Díaz *et al.*, 2022).

1.2 Epidemiología de la toxoplasmosis

Existen factores cruciales en el desarrollo de la toxoplasmosis, tales como: **a) Clima**, ya que permite que, a temperaturas de 20 a 25°C y una humedad adecuada ocurra la maduración de los ooquistes excretados en las heces de los felinos infectados, con la formación de 8 esporozoitos infectivos en su interior (Dubey *et al.*, 1970); **b) Ingesta de quistes tisulares**, ya que representa una de las principales rutas de infección, particularmente por el consumo de carne cruda o pobremente cocida (Dubey *et al.*, 1990). Estos quistes tisulares contienen a los bradizoítos que permanecen en un estado de latencia; cuando son ingeridos, se activa el BFD1 en el sistema digestivo del HI, lo que propicia la interconversión de bradizoíto a taquizoíto, este último responsable de la infección activa (York, 2020); **c) Higiene de los alimentos**, ya que los ooquistes esporulados pueden fungir como contaminantes de hortalizas o fuentes de agua, ocasionando la infección del HI. Una vez ingeridos los ooquistes, los bradizoítos son liberados en el intestino delgado, iniciando la invasión del epitelio intestinal, su diferenciación a taquizoítos y la subsecuente diseminación hacia todos los tejidos (Shapiro *et al.*, 2019). Debido a la alta transmisibilidad de la toxoplasmosis, se ha reportado una seroprevalencia mundial del 30 al 60% (Hill *et al.*, 2005). En México, se considera una seroprevalencia de más del 60% en zonas costeras, debido a la alta temperatura y humedad de esas regiones, lo cual está asociado con la rápida maduración del ooquiste (Hernández *et al.*, 2015).

Se ha reportado la existencia de variantes genotípicas de *T. gondii* con diferentes características de virulencia, dependiendo del hospedero infectado a partir del cual fueron aislados y de las regiones geográficas en las que se encontraron. La distribución de las principales poblaciones genotípicas de *T. gondii* se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa detectando polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de algunos marcadores genéticos (Sibley & Boothroyd, 1992; Mondragón *et al.*, 1998). Se considera que las cepas principales de *T. gondii* encontradas en Norte América y Europa difieren genéticamente < 1% entre sí y pueden ser agrupadas en tres linajes clonales principales: I, II y III; en donde las poblaciones clonotípicas más virulentas se encuentran en el linaje I (Ajzenberg *et al.*, 2004).

1.3 Ciclo de vida

Los hospedadores definitivos (HD) del parásito son los gatos domésticos (*Felis catus*), y otros felinos silvestres en cuyo intestino delgado ocurre la fase sexual del ciclo de vida, denominada *gametogonia*. El ciclo sexual del parásito incluye gametogénesis, formación del cigoto y desarrollo del cigoto para la subsecuente eliminación de un ooquiste inmaduro (no infectivo) en las heces del gato. Ya en el medio ambiente, y en condiciones adecuadas de humedad y temperatura, los ooquistes esporulan, formando en su interior dos esporoquistes elipsoidales con cuatro esporozoítos cada uno (**Fig. 3**) (Dubey *et al.*, 1970; Kim & Weiss, 2004; Taylor *et al.*, 2015). Los ooquistes esporulados o infectivos son estructuras esféricas o ligeramente ovaladas que miden en promedio 13 μm de largo por 11 μm de ancho (Dubey *et al.*, 1970). Cuando un ooquiste esporulado es ingerido por un hospedador, llega al intestino delgado en donde se liberan los esporozoítos, que se diferencian en la forma conocida como “taquizoíto” (del griego *taqui* = rápido y *zōon* = animal) e invaden rápidamente los enterocitos intestinales. Estas formas miden alrededor de 8 μm y representan la forma altamente invasiva y proliferativa del parásito debido a que son capaces de atravesar la mucosa intestinal y llegar a diversos tejidos por vía linfohematógena. Los taquizoítos pueden invadir cualquier célula nucleada; sin embargo, se ha observado preferencia por células de tejido cerebral, placentario, fetal, y muscular, así como del ojo (Kimball *et al.*, 1971; Waldman *et al.*, 2020).

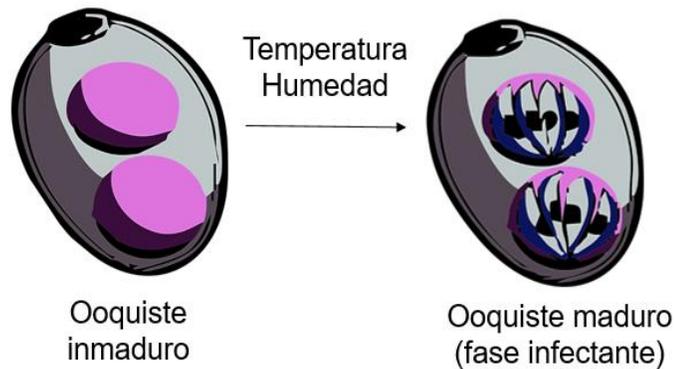


Figura 3. Esporulaci3n del ooquiste de *Toxoplasma gondii*. Los ooquistes de *T. gondii* son estructuras esferoidales que necesitan ciertas condiciones de temperatura y humedad para esporular y volverse infectivos. Dicho proceso involucra la presencia de 2 esporoquistes, cada uno con 4 esporozo3itos listos para invadir el epitelio intestinal (Modificado de Dubey *et al.*, 1970).

Los par3sitos invaden diversas c3lulas por una v3a activa y en c3lulas fagoc3ticas, por la fagocitosis del mismo par3sito. En el interior de la c3lula, los taquizo3itos se alojan en una vacuola parasit3fora (PV, por sus siglas en ingl3s), la cual es una estructura en donde se multiplican de manera asexual por un proceso llamado “endodiogenia”, formando dos individuos a partir de una c3lula madre. Cuando se acumulan de 64 a 128 taquizo3itos por PV, los taquizo3itos salen activamente rompiendo a la c3lula hospedera e iniciando la invasi3n de nuevas c3lulas vecinas (Taylor *et al.*, 2015). A los 7-10 d3as de la infecci3n, se producen anticuerpos espec3ficos y se expresan citocinas principalmente del perfil Th2, como IL4 e IL-10; en respuesta, el par3sito activa genes que involucran factores de transcripci3n de la familia AP2, lo que permite la diferenciaci3n de taquizo3ito a bradizo3ito, el cual se enquista en los tejidos del hospedero, estableciendo as3 una infecci3n cr3nica (Zhang *et al.*, 2022). Los bradizo3itos se multiplican m3s lentamente, y secretan ant3genos que transforman la PV en un quiste tisular que puede contener desde 500 hasta 15,000 bradizo3itos, dependiendo del animal infectado. Los bradizo3itos (del griego *brady* = lento y *z3on* = animal) descritos por primera vez por Frenkel en 1956, representan a la forma latente

y crónica de la enfermedad debido a que son de reproducción y crecimiento lentos. En el organismo, los quistes tisulares se localizan principalmente en zonas de acceso limitado para las células y moléculas de la respuesta inmunitaria, como cerebro y ojo, aunque también se han detectado en corazón, diafragma y músculo esquelético, permaneciendo viables durante años o inclusive toda la vida del hospedero (Revisado por Kim & Weiss, 2004). Ambas formas del parásito (taquizoítos y bradizoítos) expresan antígenos de superficie estrechamente relacionados, pero molecularmente distintos, como las proteínas de superficie SAG y BAG, respectivamente (Weiss *et al.*, 1995). El proceso de interconversión de taquizoíto a bradizoíto (y viceversa) es un evento complejo que depende principalmente de la producción de interferón- γ (IFN- γ) por parte de los macrófagos, del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por parte de las células T (LT), y de la activación de un factor de transcripción único del parásito, denominado Factor de formación deficiente de bradizoíto 1 (BFD1, por sus siglas en inglés) (Fig. 4) (Dubey & Frenkel, 1976; Gazzinelli *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 2015; Murphy & Weaver, 2016; Waldman *et al.*, 2020; York, 2020).

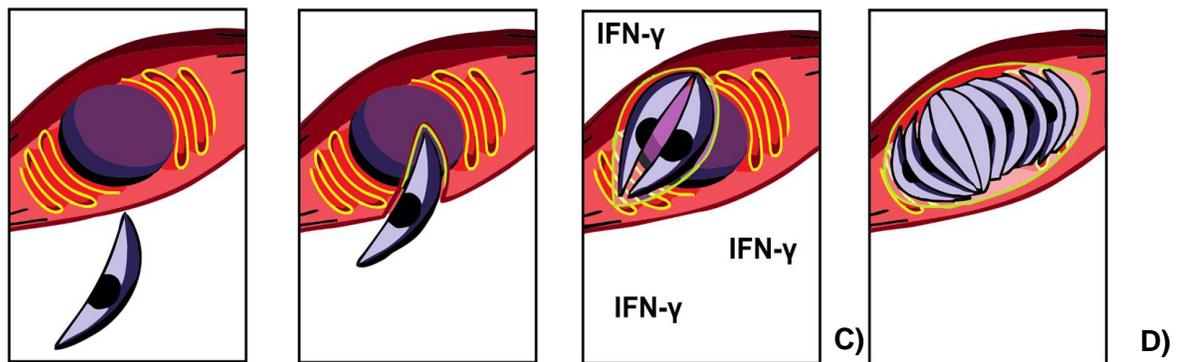


Figura 4. Establecimiento de una infección crónica por *Toxoplasma gondii*. **A)** Reconocimiento de una célula muscular por parte del parásito; **B)** Internalización del parásito a partir de la unión móvil; **C)** Formación de la vacuola parasitófora; **D)** Enquistamiento del parásito ante la presencia de IFN- γ .

1.4 Toxoplasmosis en humanos

El ser humano puede infectarse a través de la ingesta de agua o alimento (hortalizas) contaminados con ooquistes esporulados expulsados a partir de las heces del gato doméstico, o bien, por la ingesta de quistes tisulares encontrados en carne mal cocida (Elmore *et al.*, 2010). El periodo de incubación de la toxoplasmosis va de los 7 a los 30 días, y una vez completado este periodo, pueden presentarse signos clínicos inespecíficos como fiebre, linfadenopatía cervical bilateral, mialgia y fatiga, entre otros (Revisado por Weiss *et al.*, 2009). Debido a la inespecificidad de los signos clínicos, debe realizarse un diagnóstico diferencial contra enfermedades como gripe común, enfermedad de Lyme, fiebre Q, alteraciones hematológicas, etc (revisado por Kim & Weiss, 2004). Sin embargo, el curso de la enfermedad puede ir de moderado a severo, dependiendo del estado inmunológico del paciente y de la cepa de *T. gondii* de la que se trate (Dupont, 2012). La toxoplasmosis es de suma importancia en pacientes inmunocomprometidos, debido a que la reactivación constante del parásito y su subsecuente replicación dentro del tejido nervioso y tejido retinal puede ocasionar pérdida gradual de la visión, encefalitis y muerte (Machala *et al.*, 2015). No obstante, lo más característico de la toxoplasmosis en humanos es la toxoplasmosis congénita con presentación de abortos espontáneos o problemas al nacimiento, relacionados con la capacidad del parásito de atravesar la placenta (Kimball *et al.*, 1971).

1.5 Toxoplasmosis en animales domésticos

Las manifestaciones clínicas relacionadas a la infección por *T. gondii* varían entre especies, por ejemplo, en el felino doméstico la toxoplasmosis suele ser subclínica en animales adultos, aunque en algunos gatos puede manifestarse fiebre, letargia, pérdida de peso y/o afectaciones oftálmicas, así como aborto. La enfermedad suele ser más severa en esta especie cuando se adquiere de manera congénita ya que puede estar asociada a una infección sistémica, que se manifiesta principalmente con hepatitis, neumonía y/o muerte (Lappin *et al.*, 1989; Dubey & Carpenter, 1993). En el caso del cerdo (*Sus scrofa*) y el ovino (*Ovis aries*), la toxoplasmosis es de alto impacto económico debido a que la manifestación clínica más importante en estas especies es el aborto (Hartley & Marshall, 1957; revisado por Lindsay & Dubey, 2020).

1.6 Respuesta inmune ante *Toxoplasma gondii*

La activación de la respuesta inmune ante *T. gondii* comienza con el reconocimiento de la profilina (molécula secretada por el parásito) a partir de los receptores tipo toll, (TLR, por sus siglas en inglés) TLR11 y TLR12 presentes en el modelo murino (Abbas *et al.*, 2021). Este reconocimiento, induce la expresión y liberación de IL-12 a partir de la activación del adaptador molecular Myd88, un importante elemento utilizado por miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR) (Scanga *et al.*, 2002). De manera subsecuente, esta interleucina es reconocida por los receptores de las células T y las células NK, promoviendo la producción de IFN- γ , citocina encargada de la activación de los macrófagos para producir sustancias antimicrobianas como especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON) (Mordue & Sibley, 2003). Debido a que los humanos no poseen un TLR11 funcional y no existe el TLR12 en su genoma, la vía alterna de activación de la respuesta inmune y la subsecuente producción de IL-12 se lleva a cabo mediante la fagocitosis del parásito completo por parte de los macrófagos. Sin embargo, la liberación de IFN- γ , ante la producción de la IL-12 converge en ambas especies (Bliss *et al.*, 1999; Aldebert *et al.*, 2007). Particularmente, la presencia de IFN- γ en el espacio extracelular, así como la producción de anticuerpos específicos contra *T. gondii* a los 7 a 10 días de infección, propiciarán la interconversión de los taquizoítos en bradizoítos, estableciendo una infección crónica en el HI, caracterizada por la presencia de quistes tisulares conteniendo miles de bradizoítos en estado de latencia (York, 2020). Por tratarse de una infección intracelular, el sistema inmunológico debe ahora encargarse de eliminar al parásito mediante una respuesta principalmente del perfil tipo Th1, en donde la función de las células Th1 es promover la capacidad citotóxica de las células NK (Yarovinsky *et al.*, 2005; Koblansky *et al.*, 2013; Owen *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 2021).

1.7 Evasión de la respuesta inmune por *Toxoplasma gondii*

El éxito de *T. gondii* se debe principalmente a sus mecanismos de evasión del sistema inmune mediante la alteración de vías de señalización de la célula hospedera así como su persistencia en el interior de los quistes tisulares que son resistentes a cualquier embate de la respuesta inmunitaria. En uno de los mecanismos de alteración de respuesta inmune, el parásito modifica la producción de TNF- α e IL-12 en el macrófago a través de un cambio en la vía de señalización del factor nuclear NF κ B y de las cinasas MAP (MAPK) (Caamano *et al.*, 2000; Scanga *et al.*, 2002) (**Fig. 5**). Como ya se mencionó anteriormente, la producción de IFN- γ está relacionada al establecimiento de la cronicidad de la enfermedad; si el parásito modifica la vía de señalización de la IL-12, no habrá producción de IFN- γ y, por lo tanto, la infección permanecerá activa. Por otro lado, se ha observado que algunos antígenos de secreción, como las proteínas MIC de *T. gondii* pueden modificar vías apoptóticas de la célula hospedera para evitar el reclutamiento de células inmunes ante una respuesta inflamatoria, lo que podría ser considerado como un mecanismo adicional de evasión de la respuesta inmune (Caamano *et al.*, 2000; Revisado por Lüder & Gross, 2005; Mammari *et al.*, 2019).

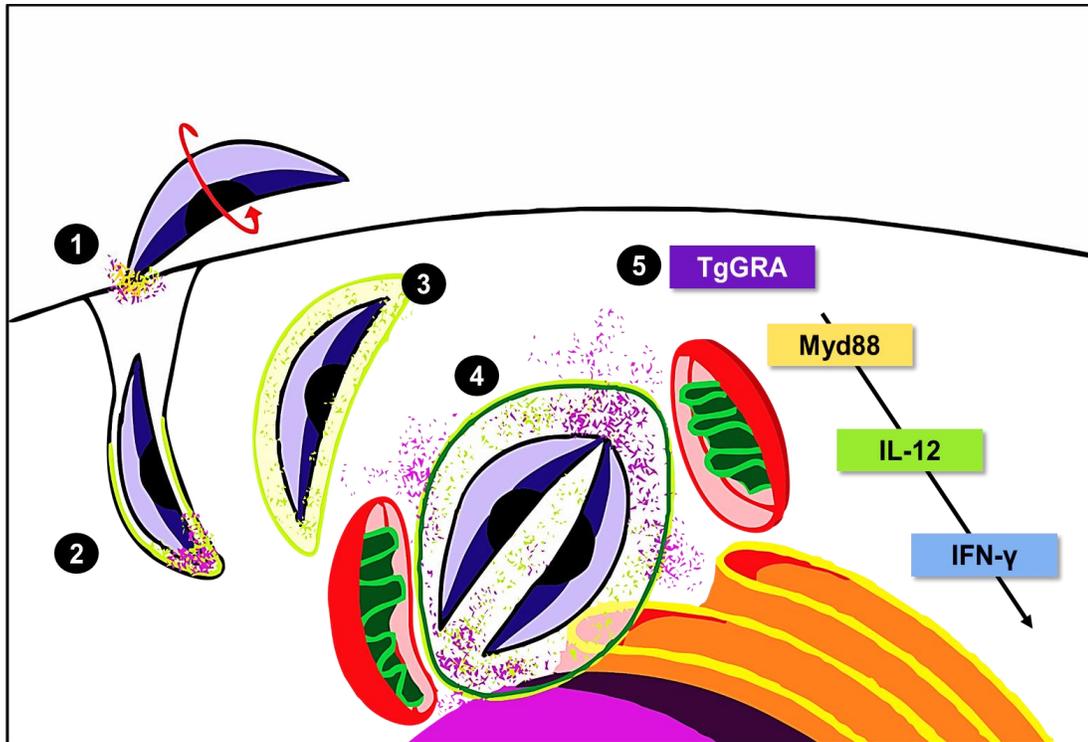


Figura 5. Producción de IFN- γ ante una infección por *Toxoplasma gondii*. 1) Reconocimiento de la membrana celular por parte del parásito; 2) Internalización del parásito a partir de la formación de la MJ; 3) Formación de la PV; 4) Reclutamiento de organelos y replicación del parásito dentro de la vacuola parasitófora; 5) Alteración de las vías de señalización de producción de IFN- γ . **MJ.** *Moving junction*; **PV.** Vacuola parasitófora; **IFN- γ .** Interferón gamma; **IL-12.** Interleucina 12. **TgGRA.** Proteínas GRA de *T. gondii*.

1.8 Invasión celular y diseminación tisular de *Toxoplasma gondii*

La capacidad de *T. gondii* de invadir cualquier célula nucleada, está relacionada con su capacidad de secreción de antígenos a partir del complejo apical. Al conjunto de estos antígenos se les denomina “productos de excreción/secreción” (PES) (Ramírez *et al*, 2019). Una vez adherido el parásito a la membrana celular, ocurre un proceso de motilidad durante el cual el conoide (organelo retráctil apical) es proyectado sobre la membrana celular ocurriendo en forma simultánea la liberación de las proteínas MIC a partir de los micronemas. Estas proteínas poseen dominios con propiedades adhesivas que permiten el anclaje firme del parásito a la superficie de la célula (**Fig. 6**). *T. gondii* utiliza un mecanismo de movimiento de tipo “deslizamiento” o *gliding*, en inglés, el

cual está estrechamente relacionado con el películo y el citoesqueleto del parásito, además de un complejo proteico llamado *glideosoma*, el cual incluye miosinas de clase XIV hacia el exterior del IMC (Furtado *et al.*, 1992; Morrissette & Sibley, 2002; Opitz & Soldati, 2002; Kim & Weiss, 2004; Jones *et al.*, 2017). Posterior al anclaje del parásito en la membrana de la célula, se secretan las proteínas RON (provenientes del cuello de las roptrias) y ROP (provenientes del cuerpo de las roptrias) las cuales se asocian con la proteína MIC, TgAMA1, para iniciar la formación de la MJ (Aikawa *et al.*, 1981; Carruthers & Sibley, 1999; Keely *et al.*, 2004; Lebrun *et al.*, 2005; Lourido & Moreno, 2015). La MJ es una estructura formada a partir de la fusión de la membrana del parásito y la membrana del hospedador, que permite la apertura de una horadación membranal en la célula blanco y el ingreso del parásito en una vacuola endocítica que se transformará en la PV. Una vez dentro de esta vacuola endocítica, el parásito secreta las proteínas GRA, a partir de los gránulos densos, y las proteínas ROP, a partir de las roptrias, que se encargarán de transformar la vesícula endocítica en una PV madura en la cual el parásito persistirá y proliferará. Diversos organelos celulares como el retículo endoplásmico, las mitocondrias, el aparato de Golgi, y componentes del citoesqueleto como microtúbulos y filamentos intermedios, son reclutados alrededor de la PV aparentemente con el fin de regular y modificar diversas vías de señalización en la célula hospedera (Carruthers *et al.*, 2002; Elmore *et al.*, 2010). Una vez culminada la replicación, *T. gondii* sale de la célula infectada por un mecanismo denominado “egreso”, evento en donde se secreta la proteína tipo perforina TgPLP1 a partir de los micronemas, con la finalidad de romper la membrana de la vacuola parasitófora (PVM, por sus siglas en inglés) liberando así al parásito en el citoplasma de la célula (Kafsack *et al.*, 2009). Simultáneamente se secretan proteínas MIC y la **metaloproteasa toxolisina 4 (TLN4)**, permitiendo el egreso exitoso del parásito (Revisado por Fréchal *et al.*, 2017; Huynh *et al.*, 2021). Para alcanzar todos los tejidos, *T. gondii* puede ser transportado por la sangre dentro de monocitos infectados, mecanismo denominado de tipo “Caballo de Troya” (Dunay & Sibley, 2016). Sin embargo, *T. gondii* podría estar utilizando los PES para facilitar su diseminación por todo el organismo (**Fig. 7**) (Jones *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2019 y 2021).

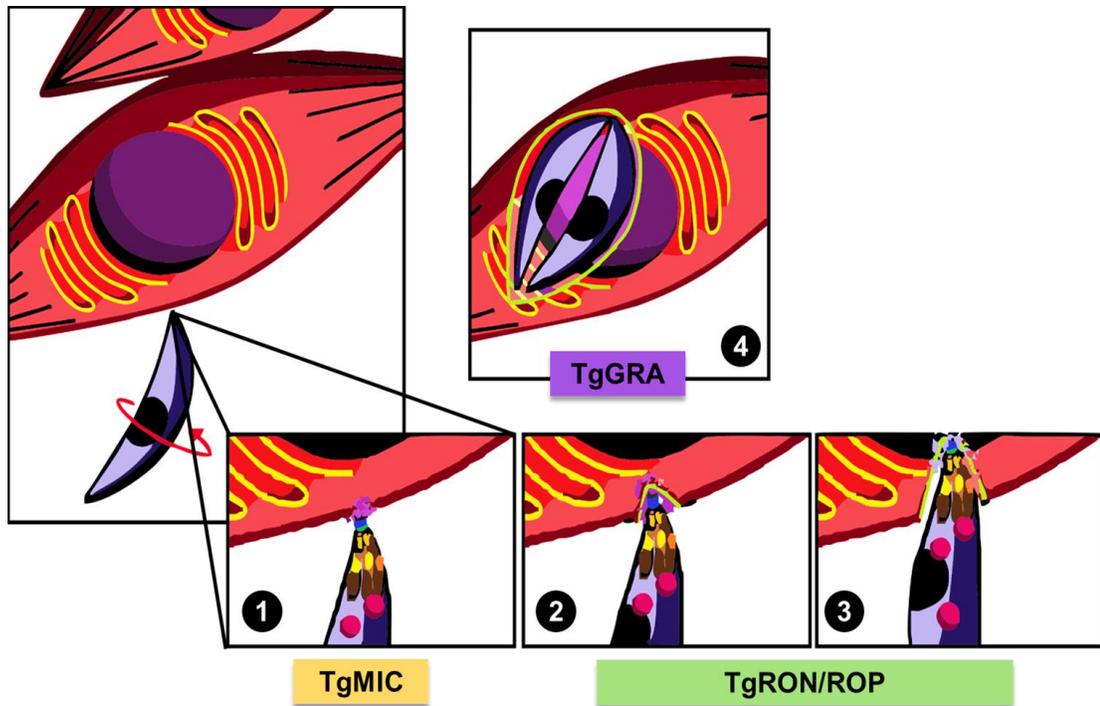


Figura 6. Invasión celular por *Toxoplasma gondii*. 1) Secreción de proteínas MIC para el anclaje a la membrana de una célula muscular; 2) Secreción de proteínas RON para la formación de la MJ; 3 y 4) Secreción de las proteínas ROP y GRA para la formación y maduración de la vacuola parasitófora (Carruthers & Sibley, 1999; Keely *et al.*, 2004). **MJ.** Moving junction; **TgGRA.** Proteínas GRA de *T. gondii*; **TgMIC.** Proteínas MIC de *T. gondii*; **TgRON/ROP.** Proteínas RON/ROP de *T. gondii*.

1.9 Toxolisina 4 de *Toxoplasma gondii* (TgTLN4)

En 2018, se describió una metaloproteasa (TgTwinScan_4000) perteneciente a la familia de las insulinasas, denominada toxolisina 4 (TgTLN4) (Escotte-Binet *et al.*, 2018). La secuencia codificante de esta proteína consiste en trece exones ubicados en el cromosoma VIIa. El producto de esa secuencia posee 2435 aminoácidos con un peso molecular (PM) aproximado de 256 KDa, y un péptido señal en su extremo N-terminal. El primer dominio de la TLN4 exhibe las características de un *core* activo de la subfamilia de metaloproteasas M16A, caracterizado por un motivo invertido de unión al Zinc, HXXEH (Gough *et al.*, 2011). Posee además tres dominios inactivos relacionados estructuralmente con el dominio activo, los cuales contribuyen al evento proteolítico formando un *clamp* que acomoda al sustrato. Esta proteína es particularmente grande debido a que su extremo C-terminal posee un dominio repetido (RD) que consiste en 8 repetidos casi perfectos de 28 aminoácidos. Este repetido posee una alta densidad de polimorfismos de un solo nucleótido entre las cepas de *T.gondii*, sugiriendo que esta región se encuentra en presión selectiva o bien, puede ser susceptible de acumular mutaciones (Laliberté & Carruthers, 2011). Esta proteína es necesaria para el egreso efectivo del parásito a partir de una célula, además de estar posiblemente involucrada en el proceso de biogénesis de los micronemas durante la fase de reproducción asexual del parásito (Huynh *et al.*, 2021). No obstante, esta metaloproteasa podría tener funciones adicionales (**Fig. 7**), por ejemplo, en el proceso de invasión y diseminación celular a partir de la modificación de las uniones intercelulares debido a que su secreción es consistente con la descarga de los micronemas y fue caracterizada en los PES de *T.gondii* (Laliberté & Carruthers, 2011; Ramírez *et al.*, 2019).

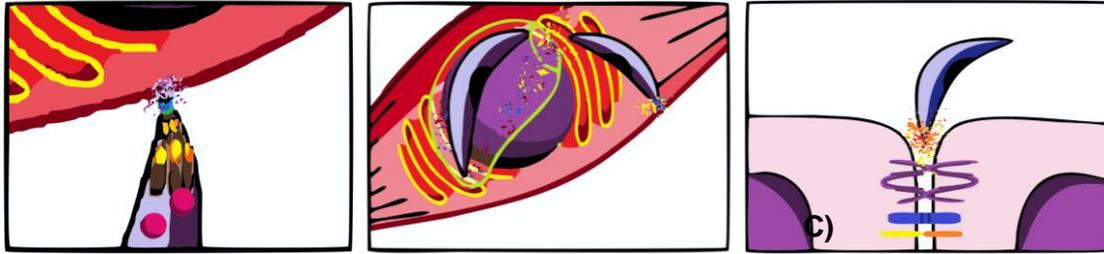


Figura 7. Posibles funciones de la toxolisina 4 de *Toxoplasma gondii*. A) **Invasión celular.** Taquizoíto anclándose a la membrana de una célula muscular mediante la secreción de proteínas MIC, la TLN4 podría participar en la maduración de estas proteínas. B) **Egreso.** La TLN4 participa en la degradación de componentes intracelulares para favorecer el egreso del parásito. C) **Alteración de uniones intercelulares.** La TLN4 podría participar en la degradación de las proteínas de unión intercelular para favorecer la diseminación del parásito a todo el organismo (Laliberté & Carruthers, 2011; Ramírez *et al.*, 2019; Huynh *et al.*, 2021). **TLN4.** Toxolisina 4; **PES.** Productos de excreción secreción.

1.1.1 Tratamientos y vacunas contra *Toxoplasma gondii*

Actualmente, no existe un tratamiento eficaz contra la toxoplasmosis. El único tratamiento, considerado como el estándar de oro, es una mezcla de antibióticos que incluye sulfadiazina con pirimetamina. Este tratamiento se utiliza en la etapa aguda de la infección, puesto que el taquizoíto es la única fase susceptible a esos fármacos; sin embargo, debido a que produce importantes efectos adversos de tipo hematológico, requiere de la utilización de leucovorina en el tratamiento (Revisado por Alday & Doggett, 2017). Por lo anterior, el desarrollo de vacunas contra *T. gondii* se vuelve indispensable para el control de la enfermedad. Por otra parte, la única vacuna aceptada en el mundo contra la toxoplasmosis es de uso veterinario y se utiliza específicamente para la prevención de aborto en el ganado ovino y caprino. La vacuna Ovilis1 Toxovax®, comercializada por primera vez en Nueva Zelanda en 1988, es una vacuna viva atenuada de la cepa S48 de *T. gondii*, obtenida mediante pases semanales en ratones durante treinta años (revisado por Innes & Vermeulen, 2006). A pesar de ser la única vacuna contra la toxoplasmosis aprobada para su uso comercial, tiene limitaciones entre las que se encuentran que, al ser una vacuna viva atenuada tiene una vida media más corta que las vacunas sintéticas (revisado por Innes & Vermeulen,

2006); previene el aborto en únicamente el 75% de los ovinos, y no existen estudios que sustenten la posibilidad de que pueda ser utilizada sin riesgo en el ser humano (revisado por Buxton & Innes, 1995). Una vacuna exitosa contra la toxoplasmosis debe abarcar las diferencias en la respuesta inmunológica de las especies domésticas involucradas en la infección del ser humano. Por ejemplo, en el caso del porcino, se ha evaluado el desarrollo de inmunógenos que eviten la formación de quistes tisulares mediante la utilización de la cepa viva atenuada S48 de *T. gondii* (Burrells *et al.*, 2015), lo que reduciría el riesgo de infección asociado al consumo de carne cruda.

Además de las cepas vivas atenuadas para la generación de vacunas contra *T. gondii*, se han generado parásitos *knockout* (KO) de algún gen de importancia para la invasión o persistencia del parásito, por ejemplo, parásitos KO de proteínas MIC (Ismael *et al.*, 2006), o de enzimas de metabolismo, como la adenilosuccinatoliasa (ADSL) (Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, los antígenos de superficie (SAG1) y de secreción (MIC, ROP, GRA) parecen ser los elementos proteicos de selección para la elaboración de inmunógenos contra *T. gondii*. Las principales plataformas y antígenos utilizados para la generación de vacunas contra *T. gondii* están resumidos en la **tabla 1**. No obstante, el reciente auge del diseño *in silico* de vacunas ha permitido el desarrollo de inmunógenos basados en secuencias proteicas más pequeñas denominadas “epítomos” (o determinantes antigénicos), que corresponden a secuencias específicas de los antígenos de los patógenos que son reconocidas por los anticuerpos (Wang *et al.*, 2011; Murphy & Weaver 2016; Khodadadi *et al.*, 2021).

Las vacunas basadas en epítomos muestran varias ventajas por encima de las vacunas clásicas, entre las que se enlistan:

1. No existe el riesgo asociado al manejo del patógeno completo.
2. No existe el riesgo asociado a la reversión de la virulencia.
3. Se pueden eliminar antígenos inmunodominantes que no sean relevantes.
4. Se puede obtener un diseño relativamente rápido a partir de plataformas bioinformáticas.
5. Las secuencias de aminoácidos de los epítomos pueden compartirse entre diferentes cepas del mismo patógeno.

6. Se puede optimizar la estructura del epítipo para mejorar su inmunogenicidad.
7. Se pueden generar vacunas utilizando antígenos de varias fases del ciclo de vida patógeno.

Para el caso de *T. gondii*, se han diseñado y utilizado diferentes epítipos sintéticos provenientes principalmente de antígenos de secreción (**Tabla 1**) con resultados muy parecidos a aquellos obtenidos a partir de la utilización de proteínas completas o de secuencias de DNA codificantes, lo cual podría indicar que el diseño de determinantes antigénicos específicos a partir de herramientas *in silico* puede ser la clave para el desarrollo de una vacuna exitosa contra la toxoplasmosis.

Tabla 1. Antígenos y plataformas utilizados para inmunizar contra *Toxoplasma gondii*

Plataforma	Antígeno	Cepa de <i>T. gondii</i>	Resultados generales	Referencia
DNA	ROP5 GRA15	RH (tipo I)	Elevada respuesta humoral y celular (Th1)	Chen <i>et al.</i> , 2015
	MIC5 MIC16	PRU (tipo II)	Reducción de quistes en cerebro (48%) Incremento en la supervivencia de los animales (6 días vs 26 días)	Zhu <i>et al.</i> , 2021
Proteína	ROP2 ROP4	DX (tipo II)	Elevada respuesta humoral y celular (Th1)	Dziadek <i>et al.</i> , 2012
	GRA4 SAG1	BK (tipo I)	Reducción de quistes en cerebro (>60%)	
Epítomos	SAG1 SAG3 SAG5	RH (Tipo I)	Elevada respuesta humoral y celular (Th1) Incremento en la supervivencia de los animales (4 días vs 10 días)	Khodadadi <i>et al.</i> , 2021
	GRA1 GRA4 SAG1	GJS (Tipo I)	Incremento en la supervivencia de los animales (14 días vs 19 días)	Wang <i>et al.</i> , 2011

Modificado de Hajissa *et al.*, 2019

2. Justificación

La toxoplasmosis es una zoonosis con seroprevalencia mundial del 30 al 60%. El ser humano puede infectarse a través de la ingesta de quistes tisulares u ooquistes esporulados; la enfermedad suele ser subclínica y, una vez adquirida, se considera de por vida. Existen pocos tratamientos contra la toxoplasmosis, los cuales son costosos y con importantes efectos adversos. Por esta razón, el diseño de vacunas contra *T. gondii* es indispensable para su control. La metaloproteasa TLN4, es un antígeno de secreción de *T. gondii* que participa en el egreso del parásito a partir de una célula infectada, y posee epítomos para receptores de LB además de péptidos con capacidad de unión al MHC-II. Es de importancia comprobar la posibilidad de identificar *in silico* dominios antigénicos en las moléculas de un parásito para el diseño racional y directo de vacunas efectivas, por lo que, en este trabajo, se utilizaron dos epítomos provenientes de esta metaloproteasa que podrían ser una opción para el desarrollo de un inmunógeno contra *T. gondii*.

3. Hipótesis

Los ratones inmunizados con un dipéptido conteniendo dos epítomos antigénicos derivados de toxolisina 4 reconocidos por linfocitos B y por linfocitos TCD4⁺ respectivamente, montarán una respuesta inmunológica que les permitirá tener una sobrevida más larga comparada con el grupo control ante la infección con taquizoítos de *T. gondii*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar epítomos inmunogénicos de la proteína toxolisina 4 (TLN4) para el diseño de un dipéptido antigénico y evaluar la respuesta inmunitaria y el efecto inmunoprotector del dipéptido en un modelo murino de toxoplasmosis aguda.

4.2 Objetivos particulares *in silico*

- Realizar el modelado de la estructura tridimensional de TLN4 a partir de su secuencia de aminoácidos.
- Identificar y seleccionar epítomos de la proteína TLN4 para su reconocimiento por linfocitos B y linfocitos TCD4+.
- Diseñar y modelar un dipéptido con dos secuencias antigénicas para linfocitos B y linfocitos TCD4+ a partir de la TLN4.
- Biosíntesis y caracterización bioquímica del dipéptido inmunogénico por la compañía GenScript Biotech Corporation (MAS, USA).
- Evaluar la integridad y peso molecular del dipéptido previo a su utilización.

4.2.1 Objetivos particulares *in vivo*

- Determinar el patrón de citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , y TNF- α en sueros de ratones inmunizados con el dipéptido antigénico.
- Analizar el perfil de respuesta inmunitaria generado evaluando la relación IgG1/IgG2a en sueros de ratones inmunizados.
- Evaluar la producción de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra el dipéptido derivado de TLN4.
- Localizar de manera subcelular a la proteína TLN4 en taquizoítos extracelulares.
- Identificar por inmunoelectrotransferencia a la proteína nativa en extracto total (ET) de taquizoítos de *T. gondii* empleando sueros de ratones inmunizados.
- Evaluar la supervivencia de los ratones inmunizados ante un inóculo letal de 1000 taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*.

5. Diseño experimental

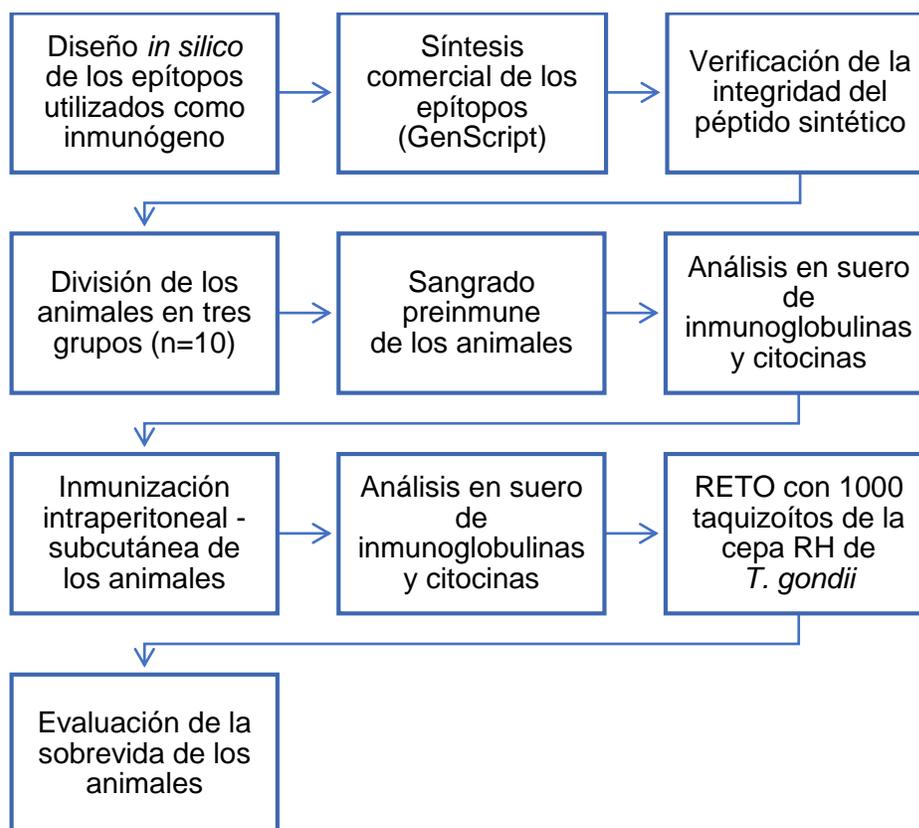


Figura 8. Diseño experimental. Una vez realizado el diseño *in silico* del péptido dirigido para la caracterización de una respuesta humoral (LB/LTCD4+) contra *T. gondii*, se obtuvo el suero preinmune e inmune para el análisis de inmunoglobulinas y citocinas mediante las técnicas de ELISA y citometría de flujo, respectivamente. Además, se realizaron un total de cuatro inmunizaciones y, finalmente, se realizó el reto con 1000 taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* para evaluar el porcentaje de sobrevida de los animales. Los resultados fueron analizados comparando los grupos control y experimental mediante la prueba de *t* de Student.

6. Metodología

6.1 *In silico*

La secuencia de la toxolisina 4 se obtuvo a partir de la base de datos de *T. gondii*, ToxoDB (<https://toxodb.org/toxo/app>). El modelado tridimensional de la proteína se realizó a partir de su secuencia en el servidor web SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>), validando la estructura obtenida mediante el servidor web MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Posteriormente, se refinó la estructura en formato PDB obtenido de SwissModel, en el servidor disponible en la red, GalaxyWeb (<https://galaxy.seoklab.org/>). A partir de la secuencia, se determinaron los epítomos inmunogénicos y superficiales para su reconocimiento por los LB y los LTCD4+ mediante el servidor web *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) (<https://www.iedb.org/>). Una vez obtenidas las secuencias de los epítomos, se realizó el análisis de la secuencia mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) a partir del servidor del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para descartar la existencia de homólogos en el proteoma del humano y/o del ratón, así como para comparar la secuencia en diferentes cepas de *T. gondii*. Nuevamente, se utilizó el servidor GalaxyWEB (<https://galaxy.seoklab.org/>) para el refinamiento de las estructuras y el servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) para su validación. La estructura final de la proteína, así como los epítomos seleccionados, fueron visualizados en formato PDB con el software Chimera UCSF (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) y PyMol (<https://pymol.org/2/>). Para corroborar que el epítomo presentado a los LB se localizaba en una zona favorecida para su reconocimiento, se ubicó dicha secuencia en la superficie de la proteína. Finalmente, se obtuvieron las características fisicoquímicas del péptido diseñado a partir del servidor de la compañía GenScript (<https://www.genscript.com/>).

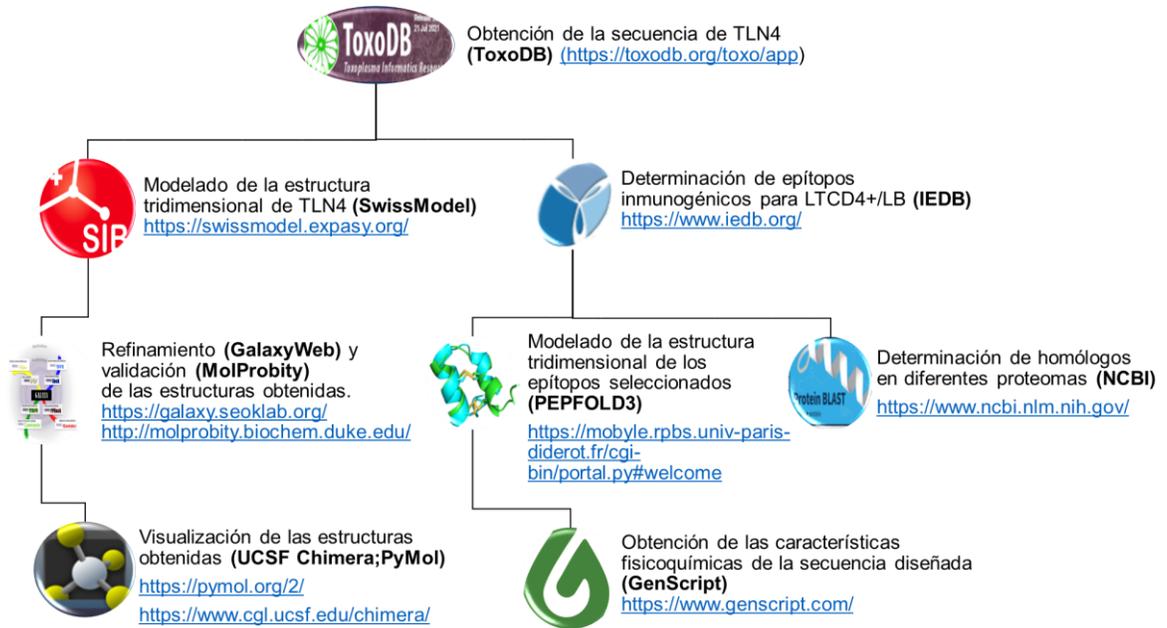


Figura 9. Metodología *in silico*. La secuencia de la metaloproteasa TLN4 fue obtenida a partir de la base de datos ToxoDB. Una vez con la secuencia, se realizó el modelado tridimensional de la estructura de TLN4, la cual se refinó y validó mediante el gráfico de Ramachandran para finalmente, visualizarla. En la secuencia de TLN4 se predijeron los epítomos inmunogénicos específicos para la producción de anticuerpos, se realizó su modelado tridimensional, se refinaron y validaron las estructuras. Además, se buscaron epítomos homólogos en los proteomas de *T. gondii*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*, para descartar la presencia de epítomos comunes.

6.2 *In vivo*

6.2.1 Animales

Se utilizaron tres grupos de ratones BALB/c hembra, de 6 semanas de edad, con una $n=10$ en cada grupo, los cuales fueron proporcionados por la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN, Unidad Zacatenco. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones reguladas de temperatura y humedad de acuerdo con lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Protocolo vigente aprobado por el comité de ética del CINVESTAV: 0003-02; Número del Protocolo del Bioterio: 0190-16.

6.2.2 Protocolo de inmunización y sangrado de los ratones

En este trabajo se usó el protocolo de inmunización de Martínez *et al.*, (2009) modificado. Brevemente, se formaron tres grupos de 10 ratones. Se realizaron un total de cuatro inmunizaciones por animal; las primeras tres inmunizaciones fueron por vía intraperitoneal, y la última inmunización fue por vía subcutánea (**Fig. 10**). En el primer grupo se inocularon 100 μL de PBS por dosis por animal; en el segundo grupo se inocularon 50 μL de TiterMax + 50 μL de PBS; y en el tercer grupo se inocularon 50 μL de TiterMax + 50 μL de dipéptido derivado de TLN4 (que corresponden a 50 μg por dosis por animal). La emulsión del adyuvante TiterMax se realizó acorde a la hoja técnica del reactivo (Sigma-Aldrich®, Cat. T2684). El sangrado de los animales se realizó mediante punción en el plexo retroorbital con pipetas Pasteur; la sangre obtenida se dejó reposar por 30 minutos y fue centrifugada a $176 \times g$ durante 10 minutos para obtener el suero, el cual fue mantenido a -20°C hasta su uso.

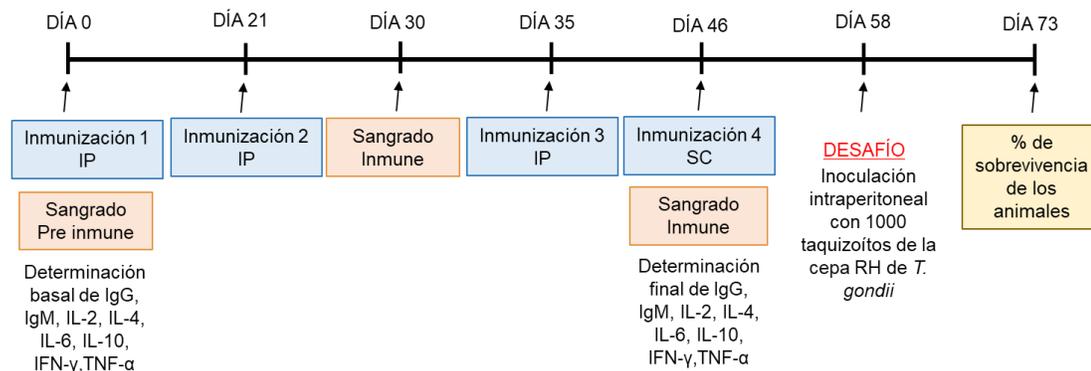


Figura 10. Calendario de inmunización y obtención de suero para su análisis. Antes de las inmunizaciones, se tomó una muestra de sangre de los animales para la determinación basal de inmunoglobulinas y citocinas. Se efectuaron un total de cuatro inmunizaciones (día 0, 21, 35 y 46), tres intraperitoneales y una subcutánea. Primer grupo: 100 μ L de PBS dosis/animal; segundo grupo: 50 μ L de TiterMax + 50 μ L de PBS dosis/animal; tercer grupo: 50 μ L de TiterMax + 50 μ L de dipéptido derivado de TLN4 dosis/animal (50 μ g por dosis).

6.2.3 Obtención de parásitos

Taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* (Ajzenberg *et al.*, 2004) altamente virulenta se mantuvieron mediante pases intraperitoneales en ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de edad. A los cinco días post infección, se sacrificaron los ratones por medio de dislocación cervical, los taquizoítos fueron cosechados mediante la inoculación intraperitoneal de 5 mL de PBS estéril (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.1 mM, pH 7.4). Se recuperó el líquido peritoneal enriquecido en taquizoítos que se purificaron mediante varios ciclos de centrifugación a 450 \times g durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Una vez terminada la centrifugación, se resuspendió la pastilla de parásitos en PBS a dilución 1/10; se tomaron 10 μ l de esa suspensión para su visualización al microscopio de contraste de fases. Posteriormente, la suspensión se pasó a través de filtros de policarbonato de 5 μ m de diámetro para retirar macrófagos y detritus celulares de la muestra; finalmente, los taquizoítos purificados fueron contados en cámara de Neubauer. Durante la manipulación de los

taquizoítos se siguieron las medidas de bioseguridad para el manejo de patógenos del tipo II (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 2009).

6.2.4 Obtención de extracto total (ET) de *Toxoplasma gondii*

Para la obtención de antígenos de extracto total del parásito (ET), se cosecharon 1×10^7 taquizoítos de *T. gondii*, los cuales fueron suspendidos en amortiguador Laemmli (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, SDS al 4%, glicerol al 20% y 0.002% de azul de bromofenol). Posteriormente, la muestra fue sonicada a 40 Hz 2 veces durante 15 seg (procesador ultrasónico GE 130PB Cole-Parmer, Vernon Hills, USA). Finalmente, se agregaron inhibidores de proteasas y la proteína obtenida fue cuantificada mediante el kit de ácido bicinonínico (BCA) (Thermofischer).

6.2.5 Citometría de flujo

Para la determinación de la concentración de citocinas en el suero de los ratones, se utilizó el kit comercial para citocinas *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17*® (Becton Dickinson, Catálogo No. 560485), el cual se basa en la detección de citocinas mediante perlas de diferentes tamaños acopladas a un anticuerpo distinto. El agente de detección es una mezcla de anticuerpos acoplados a ficoeritrina (PE), que provee una señal fluorescente en proporción al analito acoplado. Cuando las perlas de captura y el agente de detección son incubados con una muestra, se forman complejos en sándwich (perla de captura + analito + agente de detección). Estos complejos son analizados en el citómetro de flujo para identificar partículas con características fluorescentes tanto de la perla, como del agente de detección. Brevemente, la técnica se realizó en tubos Eppendorf individuales, en donde se colocaron 6.25 μ L de amortiguador de ensayo, 3.1 μ L de amortiguador de perlas acopladas con anticuerpos para cada citocina y 6.25 μ L de cada muestra. Posteriormente, los tubos fueron incubados durante hora y media en agitación a TA. Se realizaron lavados con 150 μ L de PBS y se centrifugaron a $2,150 \times g$ durante 5 minutos. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante por aspiración, dejando una pastilla pequeña en el fondo del tubo, a la cual se le agregaron 3.1 μ L del anticuerpo secundario. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora en agitación a TA. Nuevamente, se realizó un lavado con 150 μ L de PBS y se eliminó el sobrenadante por

aspiración. Se agregaron 3.1 μL del agente de detección (PE), y se incubó durante 30 minutos en agitación (**Fig. 11**). Finalmente, se realizó un último lavado y centrifugación, se eliminó el sobrenadante por aspiración y se resuspendió en 150 μL de PBS para su posterior lectura en el citómetro de flujo. Todos los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism, versión 8.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

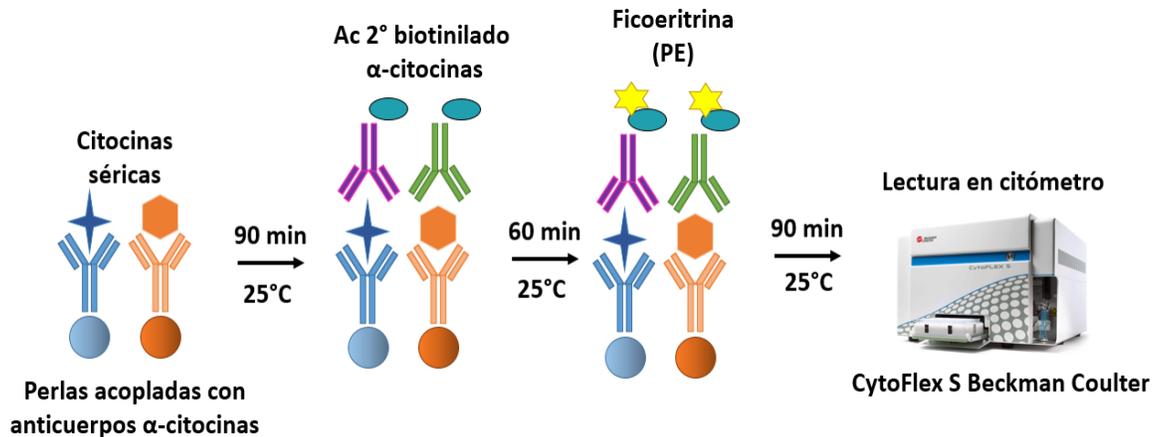


Figura 11. Determinación de citocinas mediante citometría de flujo. El kit de detección posee perlas acopladas con anticuerpos contra las citocinas de perfil Th1, Th2 y Th17, las cuales reconocen a las citocinas presentes en el suero y cuyo principio es la formación de complejos en sándwich (perla de captura + analito + agente de detección). El agente de detección es una mezcla de anticuerpos acoplados a ficoeritrina (PE), el cual provee una señal fluorescente en proporción al analito acoplado, la intensidad de fluorescencia, así como las características de la perla, proporcionarán información para su lectura en el citómetro de flujo.

6.2.6 Determinación de IgG1/IgG2a totales en suero por ELISA cuantitativo

Para la detección en el suero de IgG1 e IgG2a totales de los ratones inmunizados, se realizaron ensayos de ELISA de tipo cuantitativo a partir de modificaciones del protocolo de la patente de Vega y Ramírez, 2012 desarrollada en el laboratorio 5, Inmunobiología de las mucosas, DIPM (Guzmán *et al.*, 2014). Brevemente, se sensibilizaron las placas toda la noche con 100 μL de anticuerpo de captura cabra anti-ratón IgG1 (Bethyl. No. Cat. A90-105A) y cabra anti-ratón IgG2a (Bethyl. No. Cat. A90-107A) a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al siguiente día, las placas fueron lavadas

y posteriormente bloqueadas con BSA al 3% disuelta en Tris-base 50 mM, NaCl 140 mM pH 8.0, durante 2 h. Se preparó la curva estándar utilizando un suero de referencia de ratón (Bethyl. No. Cat. RS10-101, lote 6) con una concentración de IgG1 de 3 mg/mL y de IgG2a de 2.5 mg/mL; el punto más alto de la curva tuvo una concentración de 0.5 µg/mL para cada anticuerpo. Las muestras se colocaron a una dilución inicial 1/40 y de igual manera, se realizaron diluciones doble seriadas. Tanto las muestras como la curva se dejaron toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se lavaron las placas y se agregó el anticuerpo secundario cabra anti-IgG1 de ratón-HRP (Bethyl. No. Cat. A90-105P) y cabra anti-IgG2a de ratón-HRP (Bethyl. No. Cat. A90-107P), durante 1 h a TA a una dilución de 1/100,000. Se lavaron las placas y la reacción se visualizó con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Sigma-Aldrich) en amortiguador de citratos y peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con 100 µL de H₂SO₄ 2 N (Sigma-Aldrich) y se realizó la lectura en un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Scientific) a una densidad óptica de 450 nm. Todos los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism, versión 8.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

6.2.7 Determinación de IgM e IgG séricas Ag específicas por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) cuantitativo

Para la detección en el suero de IgG e IgM específicas contra el péptido derivado de TLN4, se realizaron ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) de tipo cuantitativo a partir de modificaciones del protocolo de la patente de Vega y Ramírez, 2012 desarrollada en el laboratorio 5, Inmunobiología de las mucosas, DIPM (Guzmán *et al.*, 2014). Brevemente, se sensibilizaron las placas toda la noche a 4°C con 100 µL del dipéptido derivado de TLN4 a una concentración de 2 µg/mL. Posteriormente, se realizó la sensibilización de 8 pozos con anticuerpo de captura conejo anti-ratón IgG+A+M (*Invitrogen Antibodies Thermo Fisher Scientific*), a dilución de 1/8,000 durante 1 hora a TA. Las placas fueron lavadas y posteriormente, bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% disuelta en Tris-base 50 mM, NaCl 140 mM pH 8.0, durante 2 h a TA. Se lavaron las placas y se preparó la curva estándar utilizando un suero de referencia de ratón (Bethyl. No. Cat. RS10-101, lote 6) con una concentración de IgG de 9.5 mg/mL y de IgM de 0.5 mg/mL; el punto más alto de la

curva tuvo una concentración de 40 ng/mL para cada anticuerpo, con diluciones doble seriadas subsecuentes hasta llegar a la concentración de 0.3 ng/mL. Las muestras se colocaron a una dilución inicial 1/10 y de igual manera, se realizaron diluciones dobles seriadas. Tanto las muestras como la curva se dejaron toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se lavaron las placas y se agregó el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón biotinilado (Thermo Fisher Scientific), a dilución 1/400,000 durante 1h a TA; finalmente, se agregó estreptavidina acoplada a HRP (Jackson laboratories) a dilución 1/30,000, durante 1h a TA. Se lavaron las placas y se visualizó la reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Sigma-Aldrich) más amortiguador de citratos y peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con 100 µL de H₂SO₄ 2 N (Sigma-Aldrich) y se realizó la lectura en un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Scientific) a una longitud de 450 nm. Todos los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism, versión 8.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

6.2.8 Inmunodetección de TLN4 en parásitos extracelulares

Para la inmunodetección de la proteína TLN4 directamente en taquizoítos extracelulares de *T. gondii*, se prepararon cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina a 2 µg/mL durante 30 minutos a TA. Se utilizó una concentración final de 1×10^3 taquizoítos y se tomó una gota de esta concentración para ser distribuída por toda el área del cubreobjetos. Los parásitos fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS por 30 minutos y se lavaron 5 veces con PBS en agitación. Una vez fijados, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS por 5 minutos. Posteriormente, se realizó el bloqueo con SFB al 1% en PBS por 30 minutos y se incubó con un suero de ratón obtenido a partir de las inmunizaciones con el dipéptido derivado de TLN4, a una dilución de 1/100, toda la noche a 4°C. Se lavaron los cubreobjetos con PBS y se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FITC (dilución 1/100) (Jackson Immuno Research, USA) por 1 h. Posteriormente, se lavaron los cubreobjetos y los núcleos fueron teñidos con DAPI (Jackson Immuno Research, USA) a una concentración de 1/1,000 durante 20 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con agua destilada, se secaron cada uno en papel absorbente y se montaron en

portaobjetos con 5 μ l de *Vectashield* (Vector Laboratories, UK). Las laminillas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia ZEISS AxioScope 2 Mot Plus.

6.2.9 Inmunoelectrotransferencia (IET)

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET) se realizó como lo reportó Gómez de León *et al.*, 2014. Brevemente, 200 μ g de ET se hirvieron por 5 min, el volumen de ET se colocó en un gel de poliacrilamida al 10 % y se corrió a 80 V por 20 min y 100 V por 40 min en una cámara Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). El marcador de peso molecular empleado fue Blue Prestained Protein Standard, Broad Range (11-190 KDa) P7718 NEB®. Posteriormente, el gel se colocó en buffer de transferencia por 5 min y se transfirió en cámara semi húmeda a una membrana de nitrocelulosa durante 60 min a 200 mA. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 6 % en TBST durante 2 h, posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios preinmunes e inmunes de cada PPasa (dilución 1/150) por 2 h a TA y a 4 °C toda la noche. Se hicieron lavados exhaustivos con TBST en agitación constante. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a HRP (dilución 1/7 000) por 2 h a TA y finalmente se realizaron lavados con TBST. La membrana se reveló utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL-Plus (GE Healthcare, UK).

7. Resultados

7.1 Resultados *in silico*

7.1.1 Modelado de la estructura tridimensional de la TLN4

Debido a que la TLN4 no se encuentra cristalizada y por lo tanto no se tiene reportada su estructura en 3D, se utilizó el servidor web SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>) para la generación de un modelo tridimensional aproximado de esta enzima. Se trabajó con el modelo arrojado por el servidor que cubría el mayor porcentaje de identidad de la secuencia; posteriormente, se obtuvo el archivo PDB de dicho modelo y se refinó la estructura mediante el servidor GalaxyWeb (<https://galaxy.seoklab.org/>) para poder evaluar que los residuos de la secuencia cayeran en zonas favorecidas mediante el gráfico de Ramachandran (**Fig. 13**) con el servidor web MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Además, se delimitaron las secuencias de cada dominio de la metaloproteasa (**Fig. 12**) para su visualización con el software UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (**Fig. 14**). Al ser una metaloproteasa de la familia M16A, la TLN4 posee un péptido señal (SP) que abarca los residuos 1 – 27, y cuatro dominios importantes (**Fig. 14C**): un dominio activo con los residuos 212 – 447, cuyo sitio catalítico posee tres ligandos: **HxxEH** (sitio activo E262), que interactúan con un átomo de zinc como cofactor (**Fig. 14B**), necesario para la degradación del sustrato; además de tres dominios inactivos que forman un *clamp* entre sí para “acomodar” al sustrato en el sitio catalítico y realizar la degradación. Finalmente, la TLN4 posee un dominio de repetidos (RD) que se extiende desde el residuo 2081 hasta el residuo 2367, el cual hace que esta enzima sea particularmente grande (**Fig. 14C**). El modelado tridimensional aproximado de la proteína permite la visualización de su conformación estructural, la separación de sus dominios, el establecimiento de su interacción con otras proteínas mediante *docking* molecular y la ubicación espacial de los epítomos a elegir, sobre todo aquellos que serán reconocidos por el BCR.

Dominios de toxolisina 4

1 ISPSSRSLPSHQTRALHADLDAARKPA **27**

212 SAYSVFSVPALKLEGVAIADQEEAVGSFAVSVGCGFFHDPPA
 IPGVAHQLEHLIFLGAEGEEAATSWDEFVSQRGGTHNAHTTAELETT
 FFVAAPTDTLPELLDRFLHLFHPLLAAEQFASEVMAVQFEHEKNQ
 PDVARVLELAMA VTPSLASPASSATQDEVPTSFYRPEVARKFGTG
 DFDTLCKTPLEQGLDVLKALREFHKGKCYKPENMTIAVRMGRRSVPI
 IVEGAVDASG **447**

466 KRSVYTPKEIGEMVVRILSKYVQANSPETEAHADKTKTPHNK
 GNSFSASSSSDLTPQRTPSDASSASPSVSSAPASSQAKRRNEVLK
 TVRLHAGERQKEESQVASFLEAAVGEDAYRSRPNATAEDSSPTDGE
 SDASGKLYRVFRQHGWGKRLLVVWERRTNWTVRGYDEIFQPTALLE
 YLLEYPGEAALLNRLKAQGLIADA EYVDYTTTSQKAFVGLLFELTDE
 GEEKFEDVVSATLAYAEQLRTSVTETYILDFDFEFARVSNRSWTYK
 DPEDAVSAVIAAAEKLA VLPQRPD MVIAGGEFVSLPGDRTLLVDVL
 KEELESFGRARASAFVVLPEDAARGSAEVVHAFRPYGVQFSVSALP
 SLAQAE **835**

945 EASGPPCVLVTEESFSVFWKNAEPFNKPIVRGYFKLRVSAED
 ATAQNTLYGKIFATLAGERARTALASFQCGVDLLMSFTNGALVLE
 IQAFSELFAPVLARLIEVLKESQDNVKQSDFNKIFNTLVQLSDFS
 TVTPFELALDVALSVVRRNRFSQLDLRSVAVTDASSQFEDFKAFLEK
 VLTKNALDVFIMGDIDYEEARKLAEDFR **1152**

1177 IEIRFSNPIPEDATNAYVSLYVTHPPDMMEMVVYSLIGEV
 ISSPFFDTIRTHWMDGYVAAA VREVPPAMTLATIVQGSQRKPDEL
 ERHVCAFLAEMEENIGSSMTTEAFLERLRWLSSSKFHRSATSFSYD
 FGEVTSQIASRNFCFIREQLARLATEKFLSCPAILKSYMNSLVDRA
 NRKRITVKIEGN **1367**

Péptido señal

(SP)

Dominio activo

(A);

Motivo de

metaloproteasa

MA16: HXXEH

Dominio inactivo

1 (IA1)

Dominio inactivo

2 (IA2)

Dominio inactivo

3 (IA3)

2081 GAGAPPLPLAHQPFASLPPAPQLPQEPRVQEANVGSPSPPT
 VVPGTPTVGATAPTVGEGATTLGAGAPAVASPAPTVGAAPQAVTYT
 APTIGAGAPAVASPAPTVGAAPQAVTYTAPTTGAGAPAVASLAPTV
 GAAPQAVTYTAPTIGAGAPAVVSPAPTVGAAPQAETYTAPTTGAGA
 PAVASPAPTVGAAPQAVTYTAPTIGAGAPAVASPAPTVGAAPPAVT
 YTAPTMGAGAPAVASLAPTVGAAPPAVTYTAPTIGAGAPAVASLAP
 TVGAAPQAVTYTAPTMGAGAPAAVASLARGPSFDYQAGVVSRAVGG
 ASQPQAEQAASYVSDPASVARVSSASILPRAAVPVVHA **2367**

Dominio de
 repetidos (RD)

Figura 12. Dominios de la metaloproteasa toxolisina 4. Delimitación de la secuencia de aminoácidos que corresponde a cada dominio de la metaloproteasa TLN4. La secuencia de la proteína posee un péptido señal (SP), un primer dominio activo que exhibe un motivo invertido de unión al Zinc: HXXEH, característico de la subfamilia de metaloproteasas M16A; además de tres dominios inactivos relacionados estructuralmente con el dominio activo, y el extremo C-terminal que se extiende en un dominio repetido (RD) que consiste en 8 repetidos casi perfectos de 28 aminoácidos.

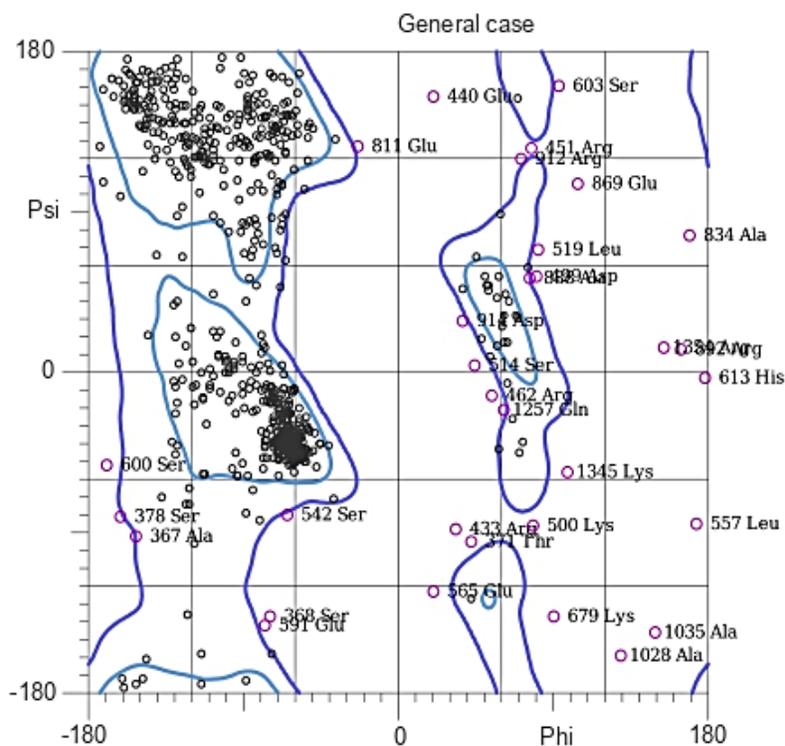


Figura 13. Gráfico de Ramachandran de toxolisina 4. Después de modelar y refinar la estructura de la toxolisina 4 a partir de su secuencia, se utilizó el archivo PDB para obtener el gráfico de Ramachandran mediante el servidor web MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) y verificar que los aminoácidos se encuentren en zonas permitidas con respecto a sus ángulos (ϕ y ψ). Como puede observarse, 90.2% de los residuos recaen en regiones favorecidas del gráfico, permitiendo la utilización posterior de la estructura obtenida.

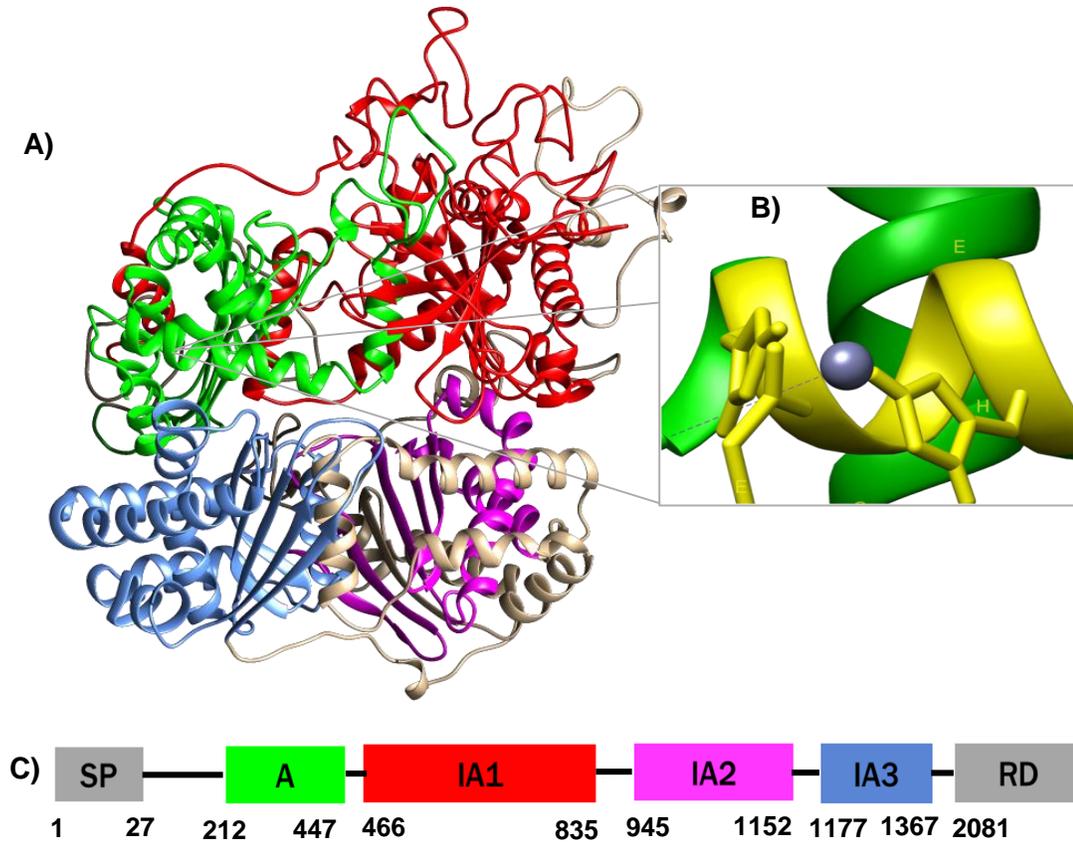


Figura 14. Modelo de la estructura tridimensional de la toxolisina 4 de *Toxoplasma gondii*. A) Dominios principales (verde, rojo, azul, morado) del modelo tridimensional de la estructura de la toxolisina 4 de *Toxoplasma gondii*; B) Ligandos (amarillo) del sitio activo interactuando con el átomo de zinc en el dominio activo (verde); C) Estructura de los dominios de TLN4: SP, péptido señal; A, dominio activo; IA1-3, dominios inactivos; RD, dominios repetidos. Los números corresponden a los residuos de inicio y término de cada dominio.

7.1.2 Epítomos de TLN4 para su reconocimiento por linfocitos B y linfocitos TCD4+

La localización de los dos epítomos que fueron seleccionados en la proteína TLN4 para la caracterización de una respuesta humoral, se predijo por comparación con las secuencias encontradas en la base de datos IEDB (<https://www.iedb.org/>) mediante el método de antigenicidad *Kolaskar & Tongaonkar* (1990). Las características de los epítomos se encuentran resumidas en las **tablas 2 y 3**. Particularmente, un péptido potencialmente reconocible por los linfocitos B (GPPCVLVTE) se localizó en superficie de la molécula mediante el software USCF Chimera (**Fig. 16**) en la proteína modelada con la herramienta del servidor web SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>). La secuencia elegida se encuentra expuesta en la superficie de la proteína, ilustrado **en la figura 16**, y pertenece al dominio inactivo 2 (IA2) de la metaloproteasa, como lo marca la **figura 14A**.

Tabla 2. Epítomo de reconocimiento por LB

Inicio	Final	Secuencia	Longitud	Puntaje	Dominio de TLN4
948	956	GPPCVLVTE	9	1.204	IA2

Nota: El valor del puntaje representa la intensidad de respuesta inmunogénica promedio de las secuencias de las proteínas probadas *in vivo*, por lo tanto, se buscan valores superiores a 1 en los epítomos elegidos (Sumadi *et al.*, 2022).

Tabla 3. Epítipo de reconocimiento por LTCD4+

Alelo	Inicio	Final	Longitud	Péptido	Rango ajustado
H2-IEd	195	209	15	DEELAERKRVRKPPR	0.29

Nota: Se eligió la secuencia arrojada por la base de datos: DEELAERKRVRKPPR, debido a que su rango ajustado (*adjusted rank*) fue el de menor valor, lo cual indica una mejor unión de los epítipos al MHC (Fathollahi *et al.*, 2021).

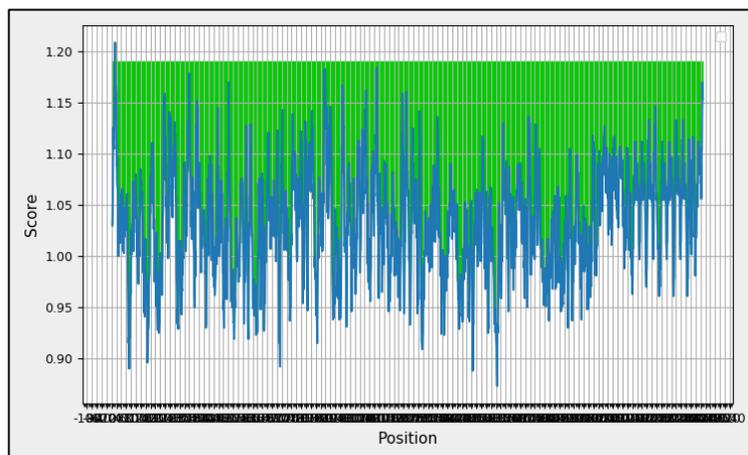


Figura 15. Gráfica del puntaje de antigenicidad por el método de Kolaskar & Tongaonkar. El epítipo de reconocimiento por los LB fue elegido a partir del puntaje de antigenicidad de su secuencia (1.204), obtenido por el servidor mediante el método de *Kolaskar & Tongaonkar* (1990); y su disponibilidad en la superficie de la proteína (**Fig. 16**).

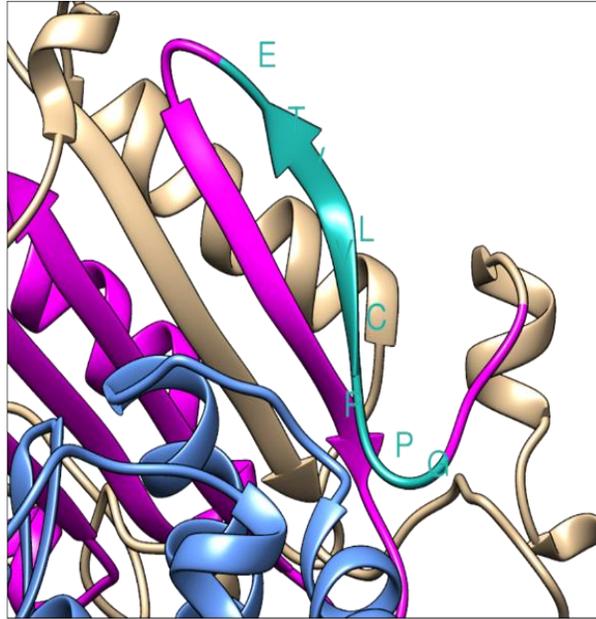


Figura 16. Localización superficial de la secuencia de reconocimiento por los linfocitos B en la TLN4. El epítipo elegido para su reconocimiento por los LB fue localizado superficialmente en la TLN4 mediante el software UCSF Chimera. El epítipo seleccionado se encuentra disponible en la superficie (azul turquesa), la secuencia pertenece a un dominio inactivo IA2 (morado) (**Fig. 14**). Las letras indican los residuos de la secuencia elegida (GPPCVLVTE) en código de una sola letra.

Es importante considerar la localización superficial de la secuencia del epítipo que será presentada a los LB, debido a que, esta secuencia deberá ser reconocida por su BCR para procesarse dentro del linfocito como un antígeno exógeno; mientras que la secuencia diseñada para su reconocimiento por el TCR de los LTCD4+ se llevará a cabo mediante la presentación de antígenos endógenos (o presentación cruzada), por lo tanto, la localización superficial de este epítipo no es necesaria. Una vez utilizadas las herramientas bioinformáticas pertinentes para efectuar el análisis de las secuencias, se realizó el modelado tridimensional de ambos péptidos unidos entre sí mediante la secuencia de unión (*linker*), GSST, utilizada anteriormente para el procesamiento de péptidos *in vivo* (Chen *et al.*, 2010; revisado por Chen *et al.*, 2013).

7.1.3 Estructura final del dipéptido derivado de TLN4

El acomodo de los residuos pertenecientes al dipéptido por sintetizar contempló el reconocimiento por los LTCD4+ hacia el lado N-terminal, y la localización de la secuencia de reconocimiento por los LB hacia el extremo C- terminal (Yano *et al.*, 2005), obteniendo finalmente la secuencia: DEELAERKRVRKPPRGSS^TGPPCVLVTE. La estructura tridimensional de esta secuencia fue modelada a partir del servidor PEPFOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) (**Fig. 17A**) con la finalidad de visualizar la disposición espacial de los aminoácidos. El péptido sintético, se analizó por PAGE-SDS al 15% para corroborar que la integridad y el peso molecular correspondieran a la hoja técnica proporcionada por el fabricante y se observó una banda con el peso molecular esperado del péptido (3.1 KDa) (**Fig. 17B**).

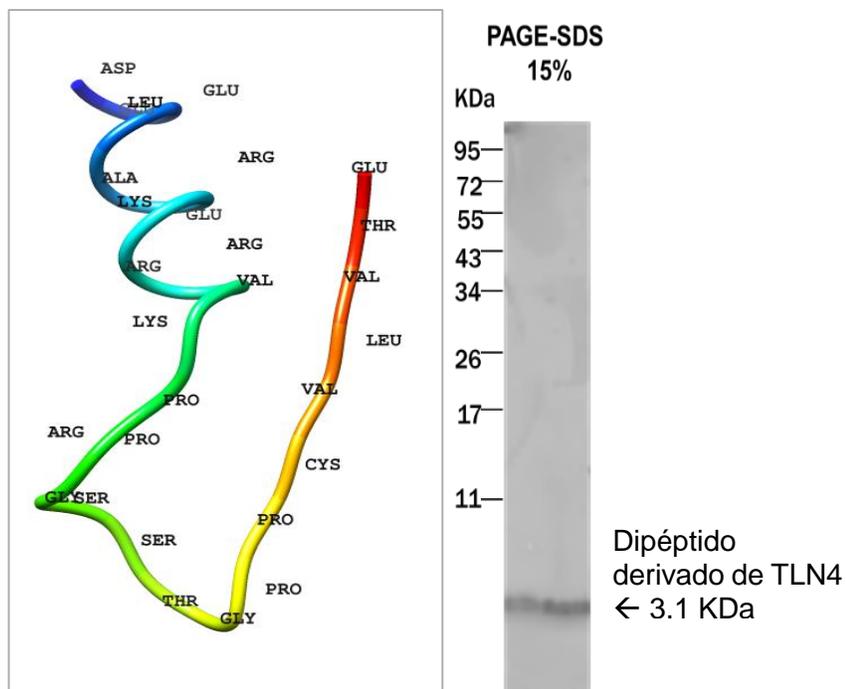


Figura 17. Estructura del dipéptido derivado de la toxolisina 4. A) Se realizó el modelado de la posible estructura tridimensional del dipéptido derivado de la TLN4 con el servidor web PEPFOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>). B) Con la finalidad de verificar el peso molecular (PM) del dipéptido previo a las inmunizaciones, se realizó una electroforesis en gel, obteniendo el PM esperado según el fabricante, correspondiente a 3.1 KDa; además, no se muestran productos de degradación, lo que indica que el péptido se encuentra íntegro para su utilización *in vivo*.

Tabla 4. Características fisicoquímicas del dipéptido sintético (GenScript®)

Secuencia	Dificultad de síntesis	Hidrofilicidad	PM	Carga neta (pH de 7)	Punto isoeléctrico	Fórmula química
DEELAE RKRVRK PPRGSS TGPPCV LVTE	Fácil	Buena	3.1 KDa	1, Básico	10.74	$C_{79}H_{139}N_{29}O_{24}$

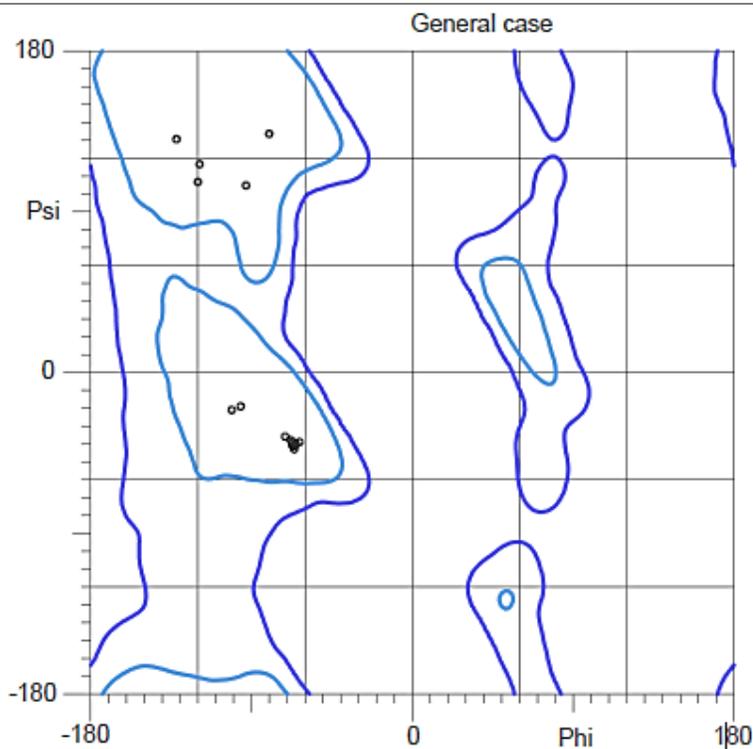


Figura 18. Gráfico de Ramachandran del dipéptido derivado de toxolisina 4 refinado. Después de modelar y refinar la estructura del dipéptido derivado de TLN4 a partir de su secuencia, se utilizó el archivo PDB para obtener el gráfico de Ramachandran mediante el servidor web MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) y verificar que los aminoácidos recaigan en zonas permitidas con respecto a sus ángulos (ϕ y ψ). El 100% de los residuos recayeron en regiones favorecidas del gráfico.

7. 2 Resultados *In vivo*

7.2.1 Determinación del patrón de citocinas séricas en sueros de ratones inmunizados

Las citocinas son proteínas no estructurales pequeñas (8 a 40 KDa) que regulan la intensidad y duración de la respuesta inmunitaria al estimular o inhibir la activación, proliferación, y diferenciación de células T (revisado por Dinarello *et al.*, 2000; Kindt *et al.*, 2007; revisado por Kany *et al.*, 2019). Las citocinas que promueven la inflamación son llamadas citocinas “proinflamatorias”, entre las que se encuentran IL-2, IL-6, IFN- γ , y TNF- α , mientras que, a las citocinas que suprimen la actividad proinflamatoria, se les denomina citocinas “supresoras” o “reguladoras”, como la IL-4 o la IL-10 (Dinarello *et al.*, 2000). El concepto de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias se basa en la activación o inhibición de la expresión de genes que codifican para mediadores de la cascada de la inflamación; como fosfolipasa tipo II (PL), ciclooxigenasa (COX)-2 y sintetasa de óxido nítrico (NO) no inducible (revisado por Dinarello *et al.*, 2000). Cuando la activación de las células T ocurre en presencia de IL-4, la tendencia de su diferenciación será hacia un perfil de tipo Th2, en donde se propiciará la proliferación de células productoras de anticuerpos especialmente contra patógenos de tipo extracelular (Owen *et al.*, 2013) mientras que, las células T que son activadas en presencia de IFN- γ tienden a diferenciarse o polarizarse hacia un perfil Th1, citotóxico (Owen *et al.*, 2013).

Para la determinación indirecta del perfil de activación de linfocitos T (Th1 o Th2) en los ratones inmunizados, en el presente trabajo, se evaluó el patrón de citocinas séricas dividido en citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , IL-6, y TNF- α) y Th2 (IL-4 y IL-10) (revisado por Dinarello *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2021), mediante citometría de flujo al día 0 y al día 58 (12 días después de la última inmunización).

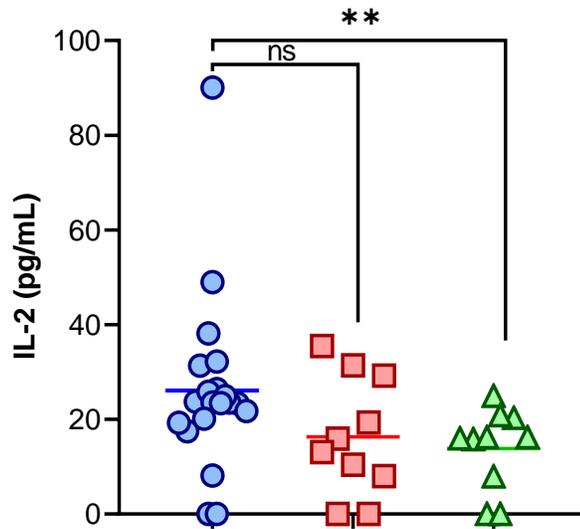


Figura 19. Concentración de citocinas del perfil Th1 en suero de ratones inmunizados con el dipéptido derivado de toxolisina 4. Se determinó la concentración de citocinas del perfil Th1 a partir del suero de ratones al día 0 (preimmune) y al día 58 post inoculación con TiterMax (adyuvante) o con el dipéptido derivado de TLN4 (TLN4 immune). No se observaron cambios en la concentración sérica de IL-6 o IFN- γ ; sin embargo, se observaron reducciones estadísticamente significativas mediante la prueba de *t* de Student en la concentración de TNF- α e IL-2 en el grupo de TLN4 immune con respecto al grupo preimmune ($P < 0.05$). Las escalas de los gráficos son distintas.

7.2.2 Relación IgG1/IgG2a en sueros de ratones inmunizados

Debido a que el cociente de IgG1 sobre IgG2a establece la tendencia hacia una respuesta Th2 o Th1 respectivamente, se realizó un ELISA cuantitativo de estas inmunoglobulinas para determinar el tipo de respuesta inducida a partir de las inmunizaciones con el dipéptido derivado de TLN4. En la **figura 21** se observa que el grupo de PBS (azul) posee un cociente > 1 , lo que indica una tendencia hacia el perfil Th2; caracterizada por una respuesta humoral, mientras que, para el caso del adyuvante TiterMax (verde), el resultado < 1 , indica que la respuesta se dirigió hacia una tendencia de tipo Th1, caracterizada por una respuesta celular; por último la respuesta del dipéptido + TiterMax (rojo) mantuvo el cociente de relación IgG1 / IgG2a > 1 , indicando que la respuesta obtenida en el grupo experimental fue de tipo Th2.

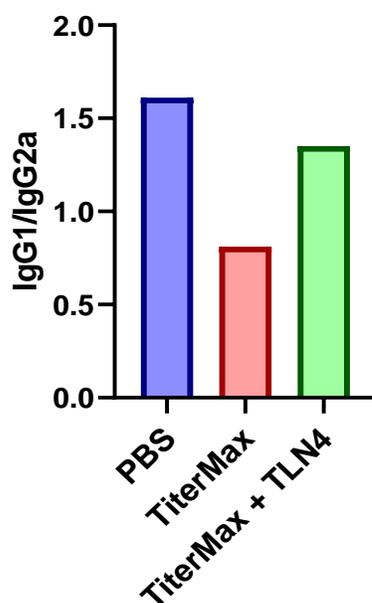


Figura 21. Cociente de la relación IgG1/IgG2a en el grupo inmunizado con el dipéptido derivado de TLN4. El grupo inoculado con TiterMax (verde) obtuvo una respuesta aparente de tipo Th1, citotóxica, mientras que, para el grupo de TLN4 + TiterMax, el cociente de IgG1/IgG2a > 1 fue de perfil de tipo Th2, caracterizada por la producción de anticuerpos.

7.2.3 Evaluación de los isotipos IgM e IgG contra el dipéptido derivado de TLN4

Con el fin de determinar la presencia y cantidad de anticuerpos IgM e IgG específicos contra la secuencia peptídica sintética, se realizó un ELISA cuantitativo a partir del suero de los ratones inmunizados con el dipéptido derivado de TLN4 a los 12 días posteriores a la última inmunización. Como puede observarse en la **figura 22**, el péptido fue capaz de inducir una respuesta de anticuerpos IgM e IgG específicos contra la secuencia; sin embargo, el adyuvante TiterMax también fue capaz de inducir una respuesta, no muy relevante, pero significativa de IgM ($P \leq 0.001$). En contraste, la producción de IgG específica solo ocurrió en el grupo inmunizado con el dipéptido ($P \leq 0.001$).

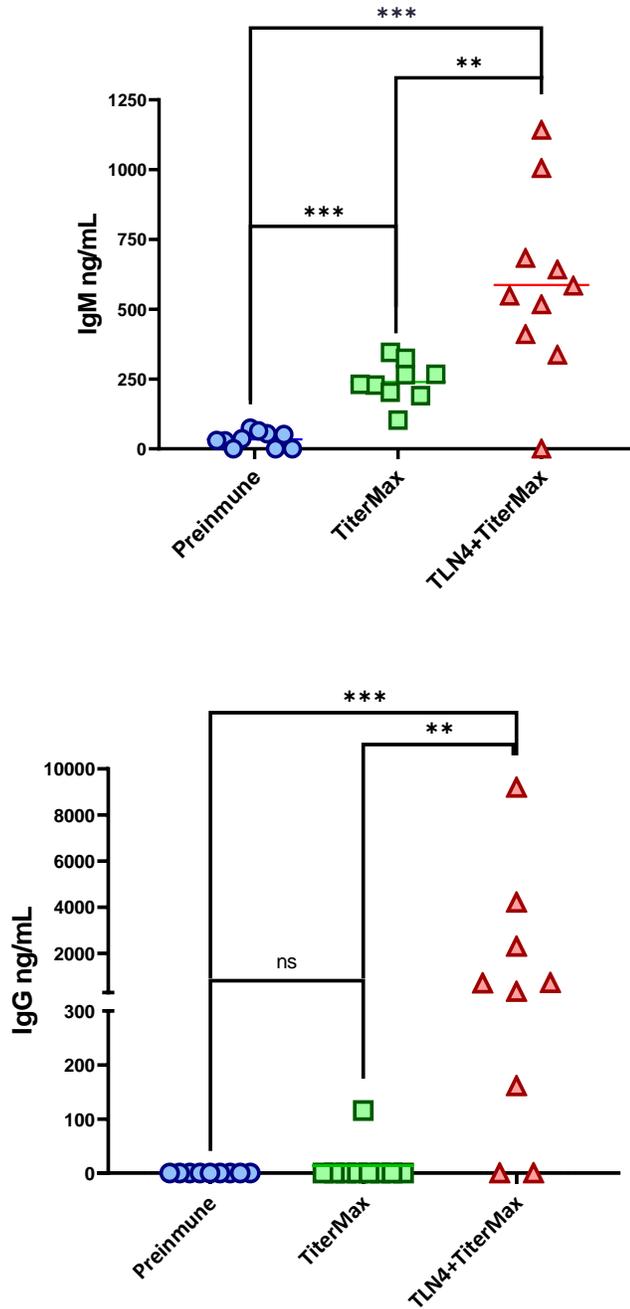


Figura 22. Concentración de IgM e IgG en sueros de ratones inmunizados con el dipéptido derivado de TLN4. Se realizó un ELISA cuantitativo en suero de ratones al día 0 (preimmune) y al día 58 postinmunización con el dipéptido sintético. La secuencia diseñada indujo una respuesta específica significativa de anticuerpos IgM e IgG. El grupo control con adyuvante también produjo una respuesta significativa contra el antígeno ** $P \leq 0.01$, *** $mP \leq 0.001$ (*t* de Student). Las escalas de los gráficos son distintas.

7.2.4 Localización de TLN4 en taquizoítos extracelulares

Para determinar la localización de la proteína TLN4 en taquizoítos extracelulares se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En los taquizoítos incubados con los sueros de ratones inmunizados con el péptido derivado de TLN4 (**Fig. 23B**), se detectó una señal fluorescente del fluorocromo FITC hacia la parte anterior del parásito en donde se localizan organelos secretores como las roptrias y micronemas, mientras que, los taquizoítos incubados con el suero preinmune (**Fig. 23A**) no emitieron ninguna señal. Los núcleos de los taquizoítos que fueron teñidos con DAPI, se ubicaron en el extremo posterior de los parásitos. Como control positivo del experimento, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-*Toxoplasma*, producido en el laboratorio 16 de Patógenos Intracelulares del Depto. de Bioquímica del CINVESTAV-IPN, el cual marcó la superficie del parásito, visualizado en rojo asociado al fluorocromo TRITC (**Fig. 23C**).

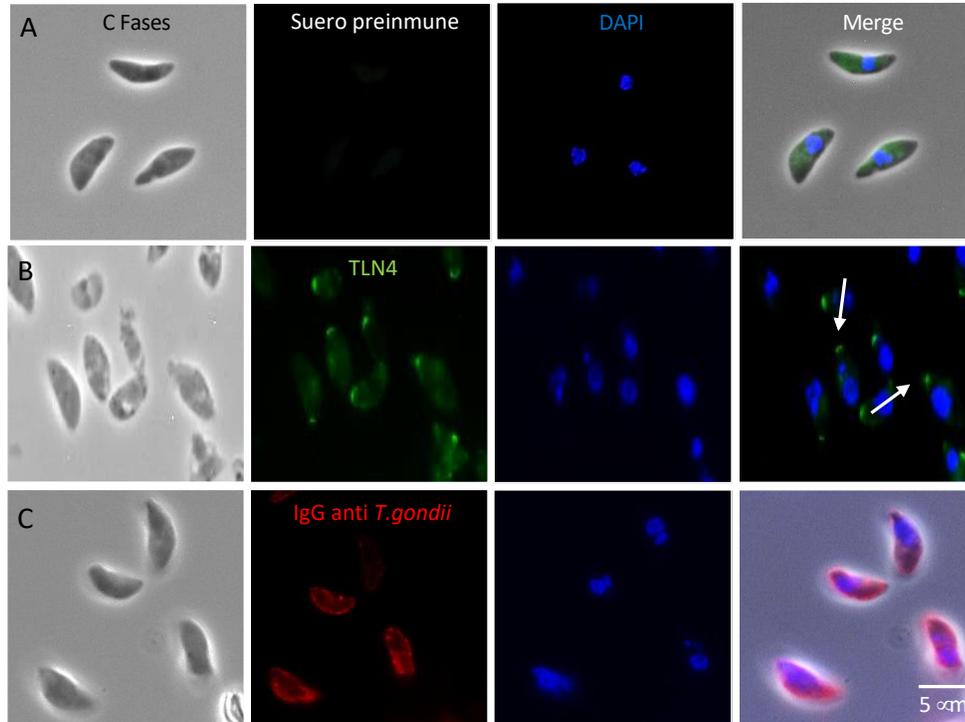


Figura 23. Localización intracelular de la proteína toxolisina 4 en taquizoítos extracelulares. Los taquizoítos purificados se fijaron a cubreobjetos para su análisis por inmunofluorescencia indirecta: **Panel A.** Taquizoítos incubados con el suero preinmune; **Panel B.** Taquizoítos incubados con el suero anti-TLN4; **Panel C.** Taquizoítos incubados con un suero policlonal anti-*T. gondii*. Los núcleos de los taquizoítos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia ZEISS Axioscope 2 Mot Plus del Departamento de Bioquímica, del laboratorio 16, Parásitos intracelulares. Escala = 5 micras.

7.2.5 Reconocimiento del dipéptido en toxolisina 4 nativa de extracto total de *T. gondii*

Para determinar si la señal fluorescente emitida en la IF pertenecía específicamente a la secuencia de los epítomos directamente en la proteína TLN4, se realizó un ensayo de inmunoelectrotransferencia (IET) en ET de *T. gondii* (**Fig. 24**). Previo al experimento, se verificó integridad y peso molecular de la secuencia del péptido derivado de TLN4 mediante un PAGE-SDS al 15%, posteriormente, se reconoció la secuencia del dipéptido mediante un ensayo de IET (**Fig. 24A**). Una vez identificada la secuencia sintética por los anticuerpos, se realizó el mismo ensayo para su localización en proteínas de extractos totales de *T. gondii*. Como se observa en la **figura 24B**, el suero preinmune de los ratones no fue capaz de reconocer secuencia alguna en proteínas de ET del parásito; no obstante, el suero obtenido a partir de las inmunizaciones con el dipéptido sintético reconoció tres bandas de aproximadamente 75, 60 y 40 KDa, lo que podría indicar que las secuencias de los epítomos pertenecen a la TLN4 nativa encontrada en ET. No obstante, no pudo observarse una banda > 200 KDa lo cual correspondería al PM de la enzima. Como control positivo del experimento, se utilizaron epítomos de una AGC cinasa de *T. gondii*, con un PM correspondiente a 70 KDa (**Figura 24B**).

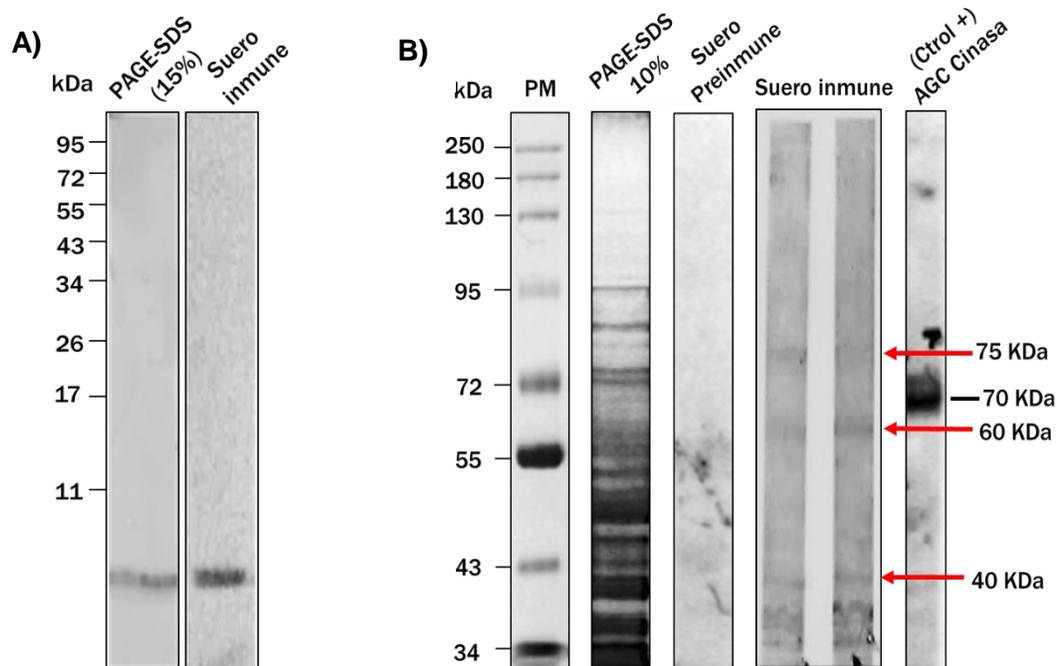


Figura 24. Reconocimiento de toxolisina 4 en ET de *Toxoplasma gondii*. A) PAGE-SDS al 15 % para la detección del dipéptido derivado de TLN4 y reconocimiento de este mediante IET a partir de sueros de ratones inmunizados al día 58 elegidos al azar; B) PAGE-SDS e IET en ET de taquizoítos; PAGE-SDS al 10% en ET de *T. gondii*; IET revelado con, suero preinmune, suero anti-TLN4 y como control positivo del experimento, suero inmune de un péptido de una AGC cinasa de *T. gondii* (70 KDa). **PM:** Peso molecular. **AGC:** Cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos.

7.2.6 Evaluación de la sobrevida de los ratones

Para evaluar la función inmunoprotectora de la secuencia derivada de la enzima TLN4, los ratones inmunizados con el dipéptido inmunogénico fueron infectados al día 58 del experimento por vía intraperitoneal con 1,000 taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*, evaluando diariamente la sobrevida de los animales hasta un periodo de 15 días posteriores a esta inoculación. Todos los ratones pertenecientes al grupo de PBS (azul) murieron al día 8 post desafío. Con respecto al grupo de ratones inoculados con el adyuvante TiterMax (verde) únicamente 4 ratones sobrevivieron hasta el día 15 post desafío. Finalmente, en el grupo de ratones inoculados con el dipéptido derivado de TLN4 (TLN4 + TiterMax) un solo animal logró sobrevivir > 15 días post desafío.

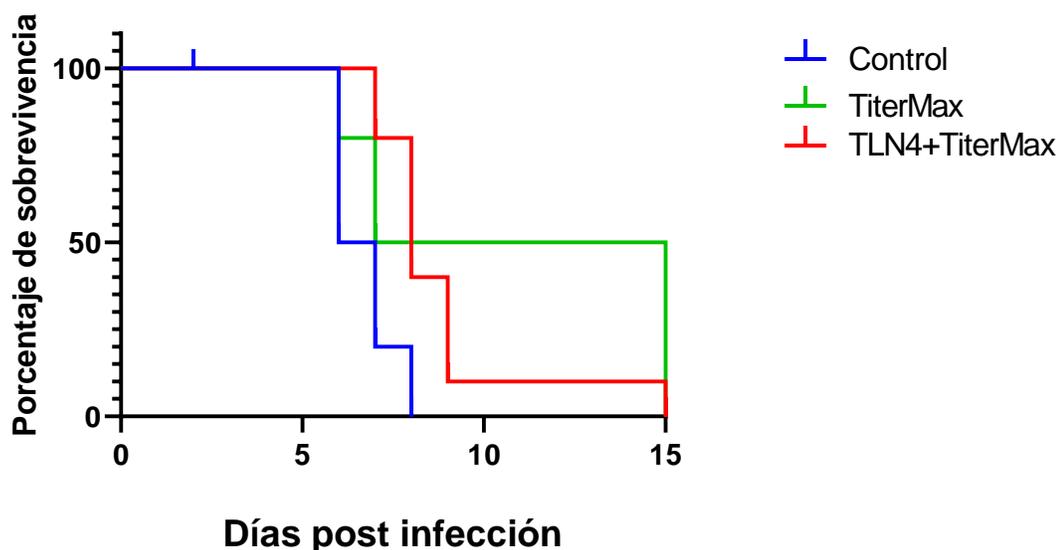


Figura 25. Sobrevida de los ratones inmunizados con el dipéptido derivado de toxolisina 4 e infectados con taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Se infectó a todos los grupos de ratones de manera intraperitoneal con 1000 taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* y se registró el número de ratones supervivientes hasta 15 días posteriores a este desafío. En el grupo 1 PBS (azul), todos los ratones murieron al día 8; en el grupo 2, TiterMax (verde), sobrevivieron 6 ratones hasta el día 15, y en el grupo 3, dipéptido + TiterMax (rojo), un solo animal logró sobrevivir > 15 días.

8. Discusión

In silico

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario capaz de infectar a cualquier animal de sangre caliente. La infección en el ser humano por *T. gondii*, se propicia por dos vías principales: la contaminación de los alimentos con ooquistes esporulados provenientes de las heces del felino doméstico y el consumo de carne infectada cruda o mal cocida. Una vez adquirida la toxoplasmosis se considera que el individuo estará infectado de por vida. Se presentan signos clínicos inespecíficos, e inclusive al realizarse el diagnóstico oportuno, no existe tratamiento eficaz contra la enfermedad, lo que da como resultado una seroprevalencia mundial de más del 30% (Hill *et al.*, 2005), mientras que en México, existe una seroprevalencia de más del 60% (Hernández *et al.*, 2015). Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna eficaz contra esta enfermedad se considera crucial para su control.

Desde hace dos décadas, la predicción de epítomos mediante análisis bioinformáticos ha permitido el desarrollo de inmunógenos contra diferentes patógenos, desde virus (Sabetian *et al.*, 2019; Tosta *et al.*, 2021) o bacterias (Moss *et al.*, 2011), hasta parásitos (Zawawi *et al.*, 2020). Con respecto a los organismos Apicomplexa, se han diseñado inmunógenos basados en epítomos contra parásitos como *Neospora canis* (Shams *et al.*, 2022), *Plasmodium falciparum* (Jelínková *et al.*, 2021) y *Babesia bovis* (Forouharmehr *et al.*, 2022).

La premisa principal para el uso de vacunas basadas en epítomos, es que existen factores limitantes en las respuestas generadas por inmunógenos naturales complejos, por ejemplo, la inmunodominancia de algunos antígenos que podrían “distraer” a la respuesta inmunológica, creando anticuerpos con escasa o nula actividad contra los patógenos (Page *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 2004). Sin embargo, estos eventos pueden evitarse mediante la selección y la optimización de epítomos relevantes (Sette & Fikes, 2003).

En el presente trabajo, se utilizaron herramientas bioinformáticas para la búsqueda de epítomos provenientes de la metaloproteasa toxolisina 4 de *T. gondii* (TgTLN4), para

el diseño de un inmunógeno basado en epítomos. La metaloproteasa toxolisina 4 es importante para el egreso efectivo del parásito a partir de una célula infectada (Hyuhn *et al.*, 2021) y podría participar en su proceso de migración transepitelial, al modificar las uniones intercelulares de los epitelios (Ramírez *et al.*, 2019 & 2020). En vista de que la TLN4 es una metaloproteasa indispensable para el egreso del parásito a partir de una célula infectada (Huynh *et al.*, 2021) posee más de 50 epítomos de reconocimiento para linfocitos B y linfocitos T (Baldriche, 2019), y es un producto de excreción secreción (PES) que podría participar en la diseminación del parásito (Ramírez *et al.*, 2019 & 2020) se considero su estudio como una potencial molécula inmunoprotectora contra la toxoplasmosis en el modelo murino.

La toxolisina 4 es una metaloproteasa de *T. gondii* que pertenece a la familia de las metaloproteasas M16A, caracterizadas por un motivo invertido de unión al Zinc, HXXEH (Gough *et al.*, 2011). Con la finalidad de obtener una estructura tridimensional aproximada de la metaloproteasa TLN4 (debido a que no se encuentra cristalizada) y poder visualizar en su superficie al epítomo seleccionado para su reconocimiento por los LB, en este trabajo, se realizó el modelado *de novo* de la secuencia de 2,435 aminoácidos obtenida a partir de la base de datos ToxoDB, mediante el servidor web SwissModel, basado en el método de modelado por homología de secuencias de > 2000 aminoácidos (**Fig. 14**).

Una vez obtenida la posible estructura de la enzima, se delimitaron los residuos que pertenecían a cada dominios: péptido señal (SP); dominio activo (A), el cual posee el motivo del sitio activo, HXXEH; los dominios inactivos (IA1, IA2, IA3), que contribuyen al acomodo del sustrato en el proceso proteolítico; y, por último, el dominio de repetidos (RD) (**Fig. 14**).

Posteriormente, se eligieron epítomos inmunogénicos de la proteína TLN4 para su uso en ensayos de inmunización *in vivo*. La selección de los mejores epítomos de la proteína TLN4 capaces de generar una respuesta humoral en el ratón, se realizó utilizando el servidor web IEDB (<https://www.iedb.org/>) a partir del cual pudieron identificarse secuencias lineares, antigénicas y superficiales de esta metaloproteasa mediante el método de Kolaskar & Tongoankar (1990). Este método de predicción de

determinantes antigénicos en las proteínas se basa en las características fisicoquímicas de los aminoácidos y la frecuencia experimental con la que han sido utilizadas esas secuencias *in vivo*, lo que arroja una escala de antigenicidad con un umbral de 1.0. Este valor representa la intensidad de respuesta inmunogénica o antigenicidad promedio de las secuencias de las proteínas probadas *in vivo*, por lo tanto, se buscan valores superiores a este en los epítomos elegidos (Sumadi *et al.*, 2022).

El epítomo rico en aminoácidos alifáticos para su reconocimiento por los LB (GPPCVLVTE), fue seleccionado con base en el puntaje arrojado por la base de datos IEDB (<https://www.iedb.org/>) (Tabla 2) y por su localización superficial directamente en el modelo tridimensional de la proteína obtenido también mediante herramientas bioinformáticas (Fig. 16).

Por otro lado, para el diseño del epítomo de reconocimiento por los LTCD4+, se valoraron los alelos específicos de la molécula de histocompatibilidad de clase II del ratón BALB/c (H2-IEd) (Zhang *et al.*, 2005), que se presenta al receptor de los linfocitos T (TCR). La secuencia arrojada por la base de datos (DEELAERKRVRKPPR), consideró el rango ajustado de menor puntaje (*adjusted rank*); cuyo valor indica una mejor unión de los epítomos a los alelos del MHC (Fathollahi *et al.*, 2021) (Tabla 3). Con respecto a este epítomo, no fue necesaria su localización superficial en la proteína, debido a que esta secuencia estará sujeta a un procesamiento interno característico de antígenos endógenos.

La selección de la secuencia peptídica *linker* o “de unión” entre ambos epítomos se basó en su utilización previa para el procesamiento de péptidos *in vivo* (Chen *et al.*, 2010; revisado por Chen *et al.*, 2013), el diseño final de la secuencia del inmunógeno siguió la disposición para su procesamiento como lo sugerido por Yano *et al.*, (2005), quedando la secuencia de reconocimiento por los linfocitos TCD4+ hacia el lado N-terminal, y la localización de la secuencia de reconocimiento por los linfocitos B hacia el extremo C-terminal, obteniéndose la siguiente secuencia final: DEELAERKRVRKPPRGSSTGPPCVLVTE.

Con la finalidad de corroborar la correcta disposición espacial de los aminoácidos, se realizó el modelado tridimensional *de novo* de la secuencia del dipéptido a partir del

servidor web PEPFOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>), el cual basa su modelado tridimensional en un conjunto de conformaciones prototipo-elementales capaces de describir la diversidad de las estructuras de las proteínas. Posteriormente, la estructura se refinó mediante el servidor GalaxyWeb (<https://galaxy.seoklab.org/>) y, una vez con el archivo en formato PDB, se verificó la conformación de los ángulos de sus residuos mediante el gráfico de Ramachandran en el servidor web de MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (**Fig. 18**). La estructura 3D obtenida mediante los servidores demostró la correcta organización espacial y estructural de los aminoácidos que conforman al dipéptido derivado de TLN4 (**Fig. 17A**), además, se determinaron las características fisicoquímicas de la secuencia a partir del servidor GenScript (<https://www.genscript.com/>) (**Tabla 4**), indicando una relativa facilidad en su síntesis y una buena hidrofiliidad, por lo tanto, se decidió enviar esta secuencia final para ser sintetizada de manera comercial.

Una vez adquirida la secuencia sintética y como un paso previo a su uso para la inmunización de los ratones, se realizó el análisis de la misma mediante un PAGE-SDS al 15%, para corroborar que su integridad y peso molecular correspondieran a la hoja técnica del fabricante (**Fig. 17B**).

In vivo

Debido a que la producción de citocinas ante una respuesta inflamatoria puede ser un indicador indirecto de la activación de los LT (Abbas *et al.*, 2021), en el presente trabajo, se realizó la evaluación de citocinas a partir de los sueros pre e inmune de los ratones.

Cuando la activación de las células T ocurre en presencia de IL-4, la tendencia de su diferenciación será hacia un perfil de tipo Th2, en donde se propiciará la proliferación de células productoras de anticuerpos especialmente contra patógenos de tipo extracelular (Owen *et al.*, 2013). Mientras que, las células T que son activadas en presencia de IFN- γ tienden a diferenciarse o polarizarse hacia un perfil Th1, citotóxico (Owen *et al.*, 2013).

Nuestros resultados indican que la inmunización con el dipéptido derivado de TLN4 no generó cambios en la producción de citocinas de perfil Th1 o Th2; sin embargo, existen disminuciones estadísticamente significativas en la producción tanto de TNF- α como de IL-2 (**Fig. 19**). La disminución de ambas citocinas en el grupo experimental podría explicarse debido a que estas dos citocinas en particular están relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune (revisado por Fontenot *et al.*, 2005; revisado por Akdis *et al.*, 2016). Si bien el TNF- α es considerado una citocina proinflamatoria, puede jugar un papel doble en la modulación de respuestas inmunes, activando respuestas pro apoptóticas, actuando como inmunosupresor al inhibir enfermedades autoinmunes y limitando la duración de los procesos inflamatorios (revisado por Akdis *et al.*, 2016).

Por otro lado, la IL-2, es considerada un factor de crecimiento característico del perfil Th1. Las células T producen IL-2 en presencia de una señal proveniente de su TCR y una señal coestimuladora, en ausencia de una segunda señal que potencie la respuesta, se induce un estado de hiporreactividad en las células T, fenómeno conocido como “anergia”, el cual está caracterizado por una represión activa de la señalización por TCR y la expresión constitutiva de IL-2 (Fontenot *et al.*, 2005; Xing & Hogguist, 2012; Ballesteros *et al.*, 2019). Esta regulación de la homeostasis mediante la proliferación y

mantenimiento de poblaciones celulares Tregs, podría explicar la presencia de ambas citocinas en el suero preinmune de los ratones que, al ser inmunizados, dirigieron la producción de citocinas hacia una tendencia de tipo Th2 (Danilova *et al.*, 2019).

Debido a que casi todas las citocinas realizan sus funciones en distancias cortas de manera autocrina o paracrina (Kindt *et al.*, 2007), se pueden realizar otros métodos para conocer el tipo de perfil de activación de respuesta de LT asociado a las inmunizaciones, por ejemplo, se pueden efectuar ensayos de cultivo de esplenocitos; en donde se obtenga una muestra de tejido del bazo de los ratones tres semanas después de la última inmunización, y posteriormente, sembrar estas células para estimularlas con antígenos de *T. gondii* a diferentes tiempos (Wang *et al.*, 2011).

Se ha observado que el patrón de citocinas característico a los 7 días de infección por *T. gondii* se define por altos niveles de IFN- γ , TNF- α e IL6, así como bajos niveles de IL-10 e IL-4 (Bastos *et al.*, 2016), mientras que, el patrón de citocinas en los grupos de ratones inmunizados e infectados con *T. gondii* mantiene un balance entre citocinas pro y antiinflamatorias (Wang *et al.*, 2011).

A pesar de que nuestro resultado de citocinas podría ser indicativo del tipo de perfil de células T generado a partir de las inmunizaciones, el análisis de la relación IgG1/IgG2a podría enriquecer el resultado del tipo de perfil generado con el dipéptido derivado de TLN4. Por ende, se realizó la cuantificación de anticuerpos IgG1 e IgG2a en los sueros de los ratones inmunizados mediante un ensayo de ELISA cuantitativo.

Como se esperaba, el diseño del dipéptido diseñado mediante herramientas bioinformáticas, fue capaz de mantener una respuesta inclinada hacia la producción de anticuerpos, o de perfil Th2, al encontrarse un cociente > 1 , indicativo de una mayor cantidad de IgG1 con respecto a IgG2a (**Fig. 21**). Este tipo de respuesta de perfil Th2 se ha observado anteriormente con otros epítomos pertenecientes a antígenos de secreción de *T. gondii*, por ejemplo, con epítomos de la proteína GRA2 (Bastos *et al.*, 2016). Para corroborar la activación de un perfil Th2, inclinado hacia la producción de anticuerpos, se decidió realizar otro ensayo de ELISA cuantitativo para la detección de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas contra la secuencia diseñada. Los resultados de este experimento demostraron que las secuencias de la enzima TLN4, elegidas para

el reconocimiento por linfocitos B y linfocitos T a partir del MHC-II, fueron capaces de inducir mayores concentraciones de anticuerpos IgM e IgG estadísticamente significativas con respecto a los grupos control (**Fig. 22**).

Sorprendentemente, se pudo observar un aumento estadísticamente significativo en la producción de IgM en el grupo de TiterMax contra el grupo de PBS. El *Hunter's TiterMax*, es un adyuvante basado en emulsiones agua-aceite, cuya principal ventaja es la utilización de micropartículas cubiertas con copolímeros (polioxietileno y polioxipropileno) que forman una emulsión estable con menos aceite (Greenfield, 2019). Se sabe que el TiterMax es un potente adyuvante capaz de generar una respuesta inmune innata, debido a que puede activar al complemento y unir componentes de este que ayuden al marcaje del antígeno para su reconocimiento por células dendríticas foliculares en los ganglios linfáticos y el bazo (Greenfield, 2019).

La inmunización intraperitoneal con este adyuvante activa una subpoblación importante de LB, los linfocitos B1, presente en la cavidad peritoneal murina, los cuales difieren de la población de linfocitos B “clásica”, B2, con respecto a que su respuesta es más rápida y cuyo isotipo predominante es la IgM (Owen *et al.*, 2013). Esta activación se lleva a cabo mediante un mecanismo de función similar al de otros adyuvantes como el LPS, MPLA, y GLA-SE, los cuales, al ser antígenos de tipo timo independientes (T-independientes), desencadenan la expansión clonal de las células B1, a través de receptores de respuesta innata (PRRs), como el TLR4, y receptores de respuesta adquirida (mIg), generando la polarización de las células T hacia un perfil de tipo Th2 para la producción de estos anticuerpos polirreactivos y poliespecíficos de tipo IgM, caracterizados por una baja afinidad, capacidad de reconocimiento de antígenos propios y de moléculas expresadas por agentes patógenos, por ejemplo, en una respuesta serológica cruzada con otros Apicomplexa, como *Eimeria falciformis*, que infecta particularmente a los ratones (Greney *et al.*, 1990; Owen *et al.*, 2013; revisado por Georg & Sander, 2019; revisado por Romero *et al.*, 2019).

Sin embargo, esta subpoblación de linfocitos B1 son incapaces de realizar el cambio de isotipo de inmunoglobulina, razón por la cual no se observa el mismo fenómeno en el resultado de IgG (**Fig. 22B**). La combinación del adyuvante más el dipéptido, pudo

haber dirigido también hacia la activación de la población de células B2 clásicas presentes de igual manera en la cavidad peritoneal del murino para la producción de inmunoglobulinas capaces de realizar *switch* hacia IgG, esto a partir de la vía clásica de presentación de antígenos exógenos mediante la captación de estos por los propios LB, las células presentadoras de antígeno (APC), y la ayuda de citocinas como la IL-4, IL-5 e IL-6 (Owen *et al.*, 2013).

Resultados similares se han obtenido con otro tipo de adyuvantes, por ejemplo, con la utilización de *Lactobacillus casei* completo (Martínez *et al.*, 2009) en donde se observó una mayor concentración de IgM con respecto al grupo control.

Estos resultados de generación de anticuerpos de respuesta primaria y secundaria contra las secuencias sintetizadas sugieren que es posible generar anticuerpos específicos contra dos epítomos provenientes de TLN4 diseñados *in silico*, no obstante, para corroborar que exista un reconocimiento en la proteína del parásito, estas secuencias deberán ser identificadas en extracto total de (ET) *T. gondii*.

Para lo anterior, se utilizaron dos estrategias distintas para evaluar el reconocimiento de las secuencias en proteínas de ET de *T. gondii* mediante el suero obtenido a partir de las inmunizaciones. En primera instancia, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en taquizoítos cosechados a partir del peritoneo de ratones infectados para localizar a la proteína de manera subcelular (**Fig. 23**); y por otro lado, se realizó una inmunoelectrotransferencia de las proteínas de ET de *T. gondii* para determinar si los sueros reconocen las secuencias directamente en la TLN4 (**Fig. 24**).

Respecto al resultado de IF, la ubicación en el extremo posterior de los núcleos de los parásitos, permitió definir la ubicación de la señal fluorescente emitida en taquizoítos incubados con sueros inmunes hacia la parte apical del parásito (**Fig. 23B**). El extremo apical del parásito es una zona en la cual se encuentran ubicados organelos de secreción como las roptrias y los micronemas a partir de los cuales se secretan componentes como las proteínas ROP y las proteínas MIC respectivamente, principalmente durante el proceso de invasión así como al interior de la VP. Debido a que la localización de la proteína TLN4 está reportada en los micronemas (Laliberté & Carruthers, 2011),

nuestros resultados sugieren que los anticuerpos generados mediante la inmunización con epítomos sintéticos pudieron reconocer las mismas secuencias presentes en la proteína nativa (**Fig. 23B**). En contraste, no se encontró alguna señal emitida a partir de taquizoítos incubados con suero preinmune (**Fig. 23A**).

Para determinar si los sueros inmunes son capaces de reconocer las secuencias en la TLN4 presente en ET de *T. gondii*, se realizó un ensayo de IET en donde se observaron al menos tres bandas reconocidas independientemente por dos sueros de ratones elegidos al azar (**Fig. 24B**), las cuales corresponden a los pesos moleculares aproximados de 75, 60 y 40 KDa. Sin embargo, no pudo reconocerse una banda superior a los 200 KDa, lo que sería correspondiente al PM de la TLN4. Lo anterior concuerda parcialmente con el trabajo de Laliberté & Carruthers en 2011, en donde determinaron que la TLN4 es una enzima que sufre procesamiento intracelular exhaustivo hacia la red transGolgi, registrando diferentes pesos moleculares de 110 KDa, 75 KDa, 65 KDa, 40 KDa y 32/34 KDa, lo que podría corresponder a productos de degradación de la misma metaloproteasa; no obstante, estos autores, tampoco pudieron evidenciar una banda de > de 200 KDa.

Probablemente, la presentación de estos productos de degradación sea dependiente de diversos factores del parásito, como el momento de invasión, el tiempo de replicación, y el egreso, eventos en los que la actividad de la TLN4 podría tener una función clave.

Estos resultados en conjunto indican que: **a)** los anticuerpos generados a partir de las inmunizaciones con el dipéptido sintético fueron capaces de reconocer directamente las secuencias en extractos totales del parásito, donde se encuentra la TLN4; **b)** el resultado de la localización de la marca fluorescente probablemente corresponda a los micronemas, organelos donde se localiza la TLN4; y **c)** las bandas reconocidas por dos anticuerpos independientes en el ensayo de IET, sugieren la presencia de algunos productos de degradación que sufre la TLN4.

Los ensayos de supervivencia ante retos con taquizoítos de *T. gondii* son importantes para medir la eficacia de vacunas experimentales contra este parásito. Particularmente, se han observado resultados prometedores con la utilización de epítomos de antígenos de secreción de *T. gondii* (Cong *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2015; Bastos

et al., 2016; Foroutan *et al.*, 2020), en cuyos casos, la principal respuesta inmunológica obtenida fue de perfil Th1, la cual parece crucial, más no exclusiva, para lograr el incremento en la sobrevivencia de los animales infectados.

En los resultados de este trabajo, se observó que, a pesar de que la inmunización con el dipéptido antigénico derivado de TLN4 generó anticuerpos específicos, su presencia no fue suficiente para conferir protección ante la infección con el parásito, debido a que, la mayor parte de los animales solo lograron sobrevivir pocos días más con respecto al grupo control, y un solo animal logró sobrevivir más de 15 días (**Fig. 25**), lo cual no puede ser considerado como significativo debido a que el número de animales sobrevivientes no fue estadísticamente representativo.

No obstante, la caracterización de la respuesta humoral a partir de un diseño *in silico* de secuencias de una proteína de secreción, demuestra el concepto y deja abierta la posibilidad de completar el diseño en conjunto con la contraparte celular de la respuesta inmune y la búsqueda de la sinergia de ambas respuestas para lograr el aclaramiento del parásito en el modelo murino.

9. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo, la utilización de herramientas bioinformáticas permitió la caracterización de la respuesta de linfocitos B contra un dipéptido sintético proveniente de la metaloproteasa TLN4 de *T. gondii* en el modelo murino.

Las secuencias elegidas fueron capaces de inducir una respuesta inmunológica predominantemente de tipo Th2, productora de inmunoglobulinas IgM e IgG. Dichos anticuerpos reconocieron de manera subcelular (sugere a micronemas) a la proteína nativa directamente en taquizoítos extracelulares y en extracto total de *T. gondii*.

Sin embargo, se constató que, aún con la producción de anticuerpos específicos contra los epítomos de la proteína TLN4, no pudo conferirse protección en el modelo murino ante una infección letal con 1,000 taquizoítos de *T. gondii*, lo que indica que los epítomos de respuesta humoral de esta metaloproteasa no son efectivos para ser considerados como un candidato a inmunógeno. A pesar de esto, no se deja de lado la

posibilidad de continuar con el estudio de la metaloproteasa TLN4, por ejemplo, para caracterizaciones celulares del parásito.

En trabajos posteriores, se buscaría una caracterización en conjunto con la respuesta celular a partir del diseño *in silico* de epítomos de esta proteína para su reconocimiento por LTCD8+, considerando la sinergia existente entre respuestas de tipo Th1 y Th2. Además, se podría evaluar la utilización de epítomos de esta proteína en otras especies domésticas de importancia económica, por ejemplo, el porcino, el cual podría ser un modelo potencial en la generación de vacunas contra la toxoplasmosis, ya que este animal juega un papel importante en la transmisión de *T. gondii* hacia el ser humano.

Cabe mencionar que se deben considerar otras vías de inmunización y otros antígenos que limiten la infección natural del parásito, por ejemplo, mediante la implementación de vacunas mucosales, o bien, utilizar otras cepas de *T. gondii* por ejemplo, para evaluar el potencial protector de esta enzima en un modelo de toxoplasmosis crónica.

Por último, se podrían realizar estudios bioinformáticos con la finalidad de dilucidar la compatibilidad de este y otros antígenos del parásito que sean capaces de generar una respuesta inmunológica en el felino doméstico, debido a que esta es la principal especie transmisora y portadora de *Toxoplasma gondii*.

10. Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). Cellular and Molecular Immunology, -South Asia Edition-E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R., & Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12889-12894.
- Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J., & Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of cell biology*, 77(1), 72-82.
- Aikawa, M., Miller, L.H, Rabbege, J.R, Epstein, N., 1981. Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *J. Cell Biol.* 91, 55-62.
- Ajzenberg, D., Banuls, A. L., Su, C., Dumetre, A., Demar, M., Carme, B., & Dardé, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality, and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 34(10), 1185-1196.
- Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R. A., Cramer, R.,... & Akdis, C. A. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 984-1010.
- Alday, P. H., & Doggett, J. S. (2017). Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and status. *Drug Design, Development, and Therapy*, 11, 273.
- Aldebert, D., Durand, F., Mercier, C., Brenier-Pinchart, M. P., Cesbron-Delauw, M. F., & Pelloux, H. (2007). *Toxoplasma gondii* triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the THP-1 human monocytic cell line. *Cytokine*, 37(3), 206-211.

- 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), e17.
- Baldriche Acosta, J. (2019). Evaluación de la inmunorreactividad de metaloproteasas secretadas por *Toxoplasma gondii* como antígenos candidatos para estudios de inmunoprotección frente a la toxoplasmosis (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Bioquímica.).
- Ballesteros-Tato, A., & Papillion, A. (2019). Mechanisms of action of low-dose IL-2 restoration therapies in SLE. *Current Opinion in Immunology*, 61, 39-45.
- Bastos, L. M., Macêdo Jr, A. G., Silva, M. V., Santiago, F. M., Ramos, E. L., Santos, F. A., & Mineo, J. R. (2016). Toxoplasma gondii-derived synthetic peptides containing B-and T-cell epitopes from GRA2 protein are able to enhance mice survival in a model of experimental toxoplasmosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 59.
- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2015). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annual Review of Microbiology*, 69, 463-485.
- Bliss, S. K., Marshall, A. J., Zhang, Y., & Denkers, E. Y. (1999). Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- α , and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 α and-1 β in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *The Journal of Immunology*, 162(12), 7369-7375.
- Burrells, A., Benavides, J., Cantón, G., Garcia, J. L., Bartley, P. M., Nath, M., & Katzer, F. (2015). Vaccination of pigs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii*—safer meat for human consumption. *Veterinary Research*, 46(1), 1-12.
- Buxton, D., & Innes, E. A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, 110(S1), S11-S16.

- Caamano, J., Tato, C., Cai, G., Villegas, E. N., Speirs, K., Craig, L., & Hunter, C. A. (2000). Identification of a role for NF- κ B2 in the regulation of apoptosis and maintenance of T cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 165
- Carruthers, V. B. (2002). Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*, 81(2), 111-122.
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, 31(2), 421-428.
- Chen, X., Bai, Y., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2010). Design of an in vivo cleavable disulfide linker in recombinant fusion proteins. *Biotechniques*, 49(1), 513-518.
- Chen, J., Li, Z. Y., Petersen, E., Huang, S. Y., Zhou, D. H., & Zhu, X. Q. (2015). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens ROP5 and GRA15 induces protective immunity against toxoplasmosis in Kunming mice. *Expert Review of Vaccines*, 14(4), 617-624.
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: property, design, and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1357-1369.
- Cong, H., Mui, E. J., Witola, W. H., Sidney, J., Alexander, J., Sette, A., ... & McLeod, R. (2010). Human immunome, bioinformatic analyses using HLA supermotifs and the parasite genome, binding assays, studies of human T cell responses, and immunization of HLA-A* 1101 transgenic mice including novel adjuvants provide a foundation for HLA-A03 restricted CD8+ T cell epitope based, adjuvanted vaccine protective against *Toxoplasma gondii*. *Immunome Research*, 6, 1-15.

- Cova, M. M., Lamarque, M. H., & Lebrun, M. (2022). How Apicomplexa Parasites Secrete and Build Their Invasion Machinery. *Annual Review of Microbiology*, 76, 619-640.
- Danilova, T. A. Danilina, G. A., Adzhieva, A. A., & Minko, A. G. (2019). Kinetics of Serum Cytokine Profile in Mice after Injection of Supernatants of Group A Streptococci Culture. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 167(3), 367-370.
- Del Carmen, M. G., Mondragon, M., Gonzalez, S., & Mondragon, R. (2009). Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 11(6), 967-982.
- Díaz-Martin, R. D., Sandoval Rodriguez, F. E., Gonzalez Pozos, S., Gomez de Leon, C. T., Mondragon Castelan, M., & Mondragon Flores, R. (2022). A comprehensive ultrastructural analysis of the *Toxoplasma gondii* cytoskeleton. *Parasitology Research*, 121(7), 2065-2078.
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503-508.
- Dubey, J. P., & Carpenter, J. L. (1993). Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203(11), 1546-1549.
- Dubey, J. P., & Frenkel, J. K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *The Journal of Protozoology*, 23(4), 537-546.
- Dubey, J. P., Kotula, A. W., Sharar, A., Andrews, C. D., & Lindsay, D. S. (1990). Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *The Journal of Parasitology*, 201-204.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., & Frenkel, J. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *The Journal of Experimental Medicine*, 132(4), 636-662.

- Dunay, I. R., & Sibley, L. D. (2010). Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current Opinion in Immunology*, 22(4), 461-466.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012, November). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 34, pp. 793-813). Springer-Verlag.
- Dziadek, B., Gatkowska, J., Grzybowski, M., Dziadek, J., Dzitko, K., & Dlugonska, H. (2012). *Toxoplasma gondii*: the vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4, and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 131(1), 133-138.
- Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, 26(4), 190-196.
- Escotte-Binet, S., Huguenin, A., Aubert, D., Martin, A. P., Kaltenbach, M., Florent, I., & Villena, I. (2018). Metallopeptidases of *Toxoplasma gondii*: *in silico* identification and gene expression. *Parasite*, 25.
- Fathollahi, M., Fathollahi, A., Motamedi, H., Moradi, J., Alvandi, A., & Abiri, R. (2021). *In silico* vaccine design and epitope mapping of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM): an immunoinformatics approach. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 1-24.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology*, 6(11), 1142-1151.
- Forouharmehr, A., Nazifi, N., Mousavi, S. M., & Jaydari, A. (2022). Designing an efficient epitope-based vaccine conjugated with a molecular adjuvant against Bovine Babesiosis: A computational study. *Process Biochemistry*, 121, 170-177

- Frénal, K., Dubremetz, J. F., Lebrun, M., & Soldati-Favre, D. (2017). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 645-660.
- Frenkel, J. K. (1956). Pathogenesis of toxoplasmosis and infections with organisms resembling *Toxoplasma*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 64(2), 215-251.
- Furtado, G. D. C., Cao, Y. A. N. G., & Joiner, K. A. (1992). Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infection and Immunity*, 60(11), 4925-4931.
- Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., & Sher, A. (1992). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 149(1), 175-180.
- Georg, P., & Sander, L. E. (2019). Innate sensors that regulate vaccine responses. *Current Opinion in Immunology*, 59, 31-41.
- Gough, M., Parr-Sturgess, C., & Parkin, E. (2011). Zinc metalloproteinases and amyloid beta-peptide metabolism: the positive side of proteolysis in Alzheimer's disease. *Biochemistry research international*, 2011.
- Greenfield, E. A. (2019). Preparing and using adjuvants. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb-prot100214.
- Grenney, P., Candolfi, E., & Kien, T. T. (1990). Specific IgA response in small intestine during experimental toxoplasmosis. *In Advances in Mucosal Immunology: Proceedings of the Fifth International Congress of Mucosal Immunology* (pp. 829-830). Springer Netherlands.
- Guzman-Bautista, E. R., Garcia-Ruiz, C. E., Gama-Espinosa, A. L., Ramirez-Estudillo, C., Rojas-Gomez, O. I., & Vega-Lopez, M. A. (2014). Effect of age

and maternal antibodies on the systemic and mucosal immune response after neonatal immunization in a porcine model. *Immunology*, 141(4), 609-616.

- Hajissa, K., Zakaria, R., Suppian, R., & Mohamed, Z. (2019). Epitope-based vaccine as a universal vaccination strategy against *Toxoplasma gondii* infection: A mini-review. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(2), 174.
- Hartley, W. J., & Marshall, S. C. (1957). Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *New Zealand Veterinary Journal*, 5(4), 119-124.
- Hernández-Cortazar, I., Acosta-Viana, K. Y., Ortega-Pacheco, A., Guzman-Marin, E. D. S., Aguilar-Caballero, A. J., & Jimenez-Coello, M. (2015). Toxoplasmosis in Mexico: epidemiological situation in humans and animals. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57, 93-103.
- 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.
- Hiszczyńska-Sawicka, E., Li, H., Xu, J. B., Akhtar, M., Holec-Gasior, L., Kur, J., & Stankiewicz, M. (2012). Induction of immune responses in sheep by vaccination with liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* MIC3 gene. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(1).
- Hu, K., Roos, D.S., Murray, J.M., 2002. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 156, 1039-1050.
- Huynh, M. H., Roiko, M. S., Gomes, A. O., Schinke, E. N., Schultz, A. J., Agrawal, S., ... & Carruthers, V. B. (2021). *Toxoplasma gondii* Toxolysin 4 contributes to efficient parasite egress from host cells. *Mosphere*, 6(3), e00444-21.
- Innes, E. A., & Vermeulen, A. N. (2006). Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma*, and *Neospora*. *Parasitology*, 133(S2), S145-S168.

- Ismael, A. B., Dimier-Poisson, I., Lebrun, M., Dubremetz, J. F., Bout, D., & Mévélec, M. N. (2006). Mic1-3 knockout of *Toxoplasma gondii* is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *The Journal of infectious diseases*, 194(8), 1176-1183.
- Jelínková, L., Jhun, H., Eaton, A., Petrovsky, N., Zavala, F., & Chackerian, B. (2021). An epitope-based malaria vaccine targeting the junctional region of circumsporozoite protein. *npi.Vaccines*, 6(1), 1-10.
- Jones, E. J., Korcsmaros, T., & Carding, S. R. (2017). Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. *Tissue Barriers*, 5(1), e1273865.
- Jung, C., Lee, C. Y. F., & Grigg, M. E. (2004). The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *International journal for parasitology*, 34(3), 285-296.
- Kafsack, B. F., Pena, J. D., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J. C., & Carruthers, V. B. (2009). Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science*, 323(5913), 530-533.
- 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.
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in inflammatory disease. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6008.
- Khodadadi, M., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., & Ahmadpour, E. (2021). Immunogenicity of in-silico designed multi-epitope DNA vaccine encoding SAG1, SAG3, and SAG5 of *Toxoplasma gondii* adjuvanted with CpG-ODN against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. *Acta Tropica*, 216, 105836.
- Kim, K., & Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International journal for parasitology*, 34(3), 423-432.

- Kimball, A. C., Kean, B. H., & Fuchs, F. (1971). The role of toxoplasmosis in abortion. *American journal of obstetrics and gynecology*, 111(2), 219-226.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. Macmillan.
- Koblansky, A. A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., & Ghosh, S. (2013). Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, 38(1), 119-130.
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276(1-2), 172-174.
- Laliberté, J., & Carruthers, V. B. (2011). *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Molecular and biochemical parasitology*, 177(1), 49-56.
- Lappin, M. R., Greene, C. E., Winston, S., Toll, S. L., & Epstein, M. E. (1989). Clinical feline toxoplasmosis: serologic diagnosis and therapeutic management of 15 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(3), 139-143.
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P. J., Vial, H., & Dubremetz, J. F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 relocalizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cellular microbiology*, 7(12), 1823-1833.
- Lee, S. H., Kang, H. J., Lee, D. H., Kang, S. M., & Quan, F. S. (2018). Virus-like particle vaccines expressing *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 18 and microneme protein 8 provide enhanced protection. *Vaccine*, 36(38), 5692-5700.
- Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2020). Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants: an update. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 36(1), 205-222.

- Lourido, S., & Moreno, S. N. (2015). The calcium signaling toolkit of the Apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Cell calcium*, 57(3), 186-193.
- Lu, G., Wang, L., Zhou, A. H., Han, Y. L., Zhou, J., Guo, J. J., ... & He, S. Y. (2016). Structural and antigenic analysis and cloning of surface antigen protein 5 in *Toxoplasma gondii*. *Tropical Biomedicine*, 33(4), 675-688.
- Lüder, C. G. K., & Gross, U. (2005). Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Role of Apoptosis in Infection*, 219-237.
- Machala, L., Kodym, P., Malý, M., Geleneky, M., Beran, O., & Jilich, D. (2015). Toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti J.E. Purkyně*, 64(2), 59-65.
- Mammari, N., Halabi, M. A., Yaacoub, S., Chlala, H., Dardé, M. L., & Courtioux, B. (2019). *Toxoplasma gondii* modulates the host cell responses: an overview of apoptosis pathways. *BioMed research international*, 2019.
- 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. (10).
- Mondragon, R., & Frixione, E. (1996). Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(2), 120-127.
- Mondragon, R., Howe, D. K., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (1998). Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *The Journal of parasitology*, 639-641.

- Mordue, D. G., & Sibley, L. D. (2003). A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *Journal of leukocyte biology*, 74(6), 1015-1025.
- Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A., & Sibley, L. D. (2001). Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4574-4584.
- Morrissette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). The cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(1), 21-38.
- Moss, S. F., Moise, L., Lee, D. S., Kim, W., Zhang, S., Lee, J., & De Groot, A. S. (2011). HelicoVax: epitope-based therapeutic Helicobacter pylori vaccination in a mouse model. *Vaccine*, 29(11), 2085-2091.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). Janeway's immunobiology. Garland science.
- Najm, R., Ruivo, M. T. G., Penarete-Vargas, D. M., Hamie, M., Mouveaux, T., Gissot, M., & Lebrun, M. (2023). Invasion of Toxoplasma gondii bradyzoites: Molecular dissection of the moving junction proteins and effective vaccination targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(5), e2219533120.
- Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). The cytoskeleton of Toxoplasma gondii 1. *The Journal of protozoology*, 34(2), 217-226.
- Nicolle, C. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (on organismes voisins) du gondi. *CR Acad Sci*, 147, 736.
- Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162-1172.
- Opitz, C., & Soldati, D. (2002). 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by Toxoplasma gondii. *Molecular microbiology*, 45(3), 597-604.

- Owen, J. A., Punt, J., & Stranford, S. A. (2013). *Kuby immunology* (p. 574). *New York: WH Freeman.*
- Page, A. P., Rudin, W., Fluri, E., Blaxter, M. L., & Maizels, R. M. (1992). *Toxocara canis*: a labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Experimental parasitology*, 75(1), 72-86.
- Ramírez-Flores, C. J., Cruz-Mirón, R., Lagunas-Cortés, N., Mondragón-Castelán, M., Mondragon-Gonzalez, R., González-Pozos, S., & Mondragón-Flores, R. (2021). *Toxoplasma gondii* excreted/secreted proteases disrupt intercellular junction proteins in epithelial cell monolayers to facilitate tachyzoites' paracellular migration. *Cellular Microbiology*, 23(3), e13283.
- Ramírez-Flores, *et al.*, (2019). Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitology Research*, 118(1), 289-306.
- Renaud, E. A., Pamukcu, S., Cerutti, A., Berry, L., Lemaire-Vieille, C., Yamaryo-Botté, Y., & Besteiro, S. (2022). Disrupting the plastidic iron-sulfur cluster biogenesis pathway in *Toxoplasma gondii* has pleiotropic effects irreversibly impacting parasite viability. *Journal of Biological Chemistry*, 298(8).
- Romero-Ramírez, S., Navarro-Hernandez, I. C., Cervantes-Díaz, R., Sosa-Hernández, V. A., Acevedo-Ochoa, E., Kleinberg-Bild, A., & Maravillas-Montero, J. L. (2019). Innate-like B cell subsets during immune responses: beyond antibody production. *Journal of leukocyte biology*, 105(5), 843-856.
- Sabetian, S., Nezafat, N., Dorosti, H., Zarei, M., & Ghasemi, Y. (2019). Exploring dengue proteome to design an effective epitope-based vaccine against dengue virus. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37, 2546 - 2563.
- Scanga, C. A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E. Y., & 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. 5720-5728.

- Sette, A., & Fikes, J. (2003). Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design, and delivery. *Current opinion in immunology*, 15(4), 461-470.
- Shams, M., Maleki, B., Kordi, B., Majidiani, H., Nazari, N., Irannejad, H., & Asghari, A. (2022). Towards the First Multiepitope Vaccine Candidate against *Neospora caninum* in Mouse Model: Immunoinformatic Standpoint. *BioMed Research International*, 2022.
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L. A., VanWormer, E., & Villena, I. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil, and food. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00049.
- Sibley, L. D., & Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359(6390), 82-85. *In Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 6, pp. 793-813). Springer-Verlag.
- Soltani, S., Kahvaz, M. S., Soltani, S., Maghsoudi, F., & Foroutan, M. (2020). Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in patients undergoing hemodialysis and healthy group. *BMC Research Notes*, 13(1), 1-5.
- Sumadi, F. A., Jamil, A. S., & Auliyana, N. (2022). Developing an Epitope-Based Peptide Vaccine for the Hepatitis C Virus Using an in Silico Approach. *KnE Medicine*, 212-222.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2015). *Veterinary Parasitology*. John Wiley & Sons.
- Tosta, S. F. D. O., Passos, M. S., Kato, R., Salgado, Á., Xavier, J., Jaiswal, A. K., & Alcantara, L. C. J. (2021). Multi-epitope based vaccine against yellow

fever virus applying immunoinformatics approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(1), 219-235.

- Vivier, E. M. I. L. E., & Petitprez, A. N. D. R. E. (1969). The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Cell Biology*, 43(2), 329-342.
- Waldman, B. S., Schwarz, D., Wadsworth II, M. H., Saeij, J. P., Shalek, A. K., & Lourido, S. (2020). Identification of a master regulator of differentiation in *Toxoplasma*. *Cell*, 180(2), 359-372.
- Wan, K. L., Carruthers, V. B., Sibley, L. D., & Ajioka, J. W. (1997). Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Molecular and biochemical parasitology*, 84(2), 203-214.
- Wang, L., Tang, D., Yang, C., Yang, J., & Fang, R. (2020). *Toxoplasma gondii* ADSL knockout provides excellent immune protection against a variety of strains. *Vaccines*, 8(1), 16.
- 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 peptides containing B-and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens. *Vaccine*, 29(47), 8619-8623.
- Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International journal for parasitology*, 39(8), 895-901.
- Weiss, L. M., LaPlace, D., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B., Cali, A.N.N., & Wittner, M. (1995). A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(2), 150-157.
- Xing, Y., & Hogquist, K. A. (2012). T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(6), a006957.

- 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.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., ... & Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308(5728), 1626-1629.
- York, A. (2020). The master of Toxoplasma differentiation. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 122-122.
- Zawawi, A., Forman, R., Smith, H., Mair, I., Jibril, M., Albaqshi, M. H., & Else, K. J. (2020). In silico design of a T-cell epitope vaccine candidate for parasitic helminth infection. *PLoS pathogens*, 16(3), e1008243.
- Zhang, G. L., Srinivasan, K. N., Veeramani, A., August, J. T., & Brusic, V. (2005). PRED BALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2 d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W180-W183.
- Zhang, J., Zhang, L., Zhou, Y., Zhao, J., & Shen, B. (2019). Regulating the expression of bradyzoite specific genes in *Toxoplasma gondii* by AP2 transcription factors. Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Veterinary Parasitism Collection of abstracts of the first academic forum for young scientists of the Entomology Branch.
- Zhu, Y. C., Ma, L. J., Zhang, J. L., Liu, J. F., He, Y., Feng, J. Y., & Chen, J. (2021). Protective Immunity Induced by TgMIC5 and TgMIC16 DNA Vaccines Against Toxoplasmosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 858