

**Identificación y caracterización *in silico* de péptidos potencialmente
antigénicos de *Toxoplasma gondii* con afinidad al HLA-DRβ1**

Estudiante

Carlos Ernesto Cabrera Velasco

DIRECTOR

Néstor Iván Cardona Pérez Lic. Biol. M.Sc. Dr. Sc.

CO-TUTOR

Jorge Enrique Gómez Marín MD. PhD.

**Trabajo de grado de Maestría presentado como requisito parcial para
optar al título de Magister en Ciencias Biomédicas**

**Universidad del Quindío
Facultad de Ciencias de la Salud
Maestría en Ciencias Biomédicas
Diciembre de 2018**

Resumen:

Introducción: La Toxoplasmosis es una parasitosis con una prevalencia mundial del 40% que es causada por *Toxoplasma gondii* y pese a que la mayoría de hospederos humanos controlan la infección, pueden llegarse a presentar complicaciones incapacitantes como la toxoplasmosis ocular, cerebral, ganglionar y diseminada; principalmente en individuos inmunosuprimidos o infectados congénitamente. Debido a esto y a la falta de un tratamiento efectivo contra la enfermedad, se han tomado diversos caminos para hallar una vacuna. Entre estos se destaca la identificación mediante herramientas bioinformáticas de péptidos de *Toxoplasma gondii* presentados a través del HLA-I, los cuales tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune con predominio de linfocitos T CD8+, en individuos que manifiestan la infección crónica asintomática. Sin embargo, este método no se ha utilizado con el objetivo de estimular la actividad de los linfocitos T CD4+ que normalmente orientan la respuesta inflamatoria, controlan su intensidad y apoyan el establecimiento de una memoria inmunológica.

Objetivos: Identificar y caracterizar *in silico* péptidos derivados de proteínas de *Toxoplasma gondii* con afinidad hacia más del 40% de los alelos prevalentes de HLA-DRβ1.

Metodología: Se utilizó un método de búsqueda con múltiples herramientas bioinformáticas que incluían la base de datos de *Toxoplasma gondii* ToxoDB para la selección de proteínas e identificación de sus características moleculares, NetMHCII pan 3.2 para predicción de péptidos de unión a HLA-II, AllerTOP 2.0 para determinar alergenidad de los mismos y ProtParam para estimar algunas de características fisicoquímicas como la hidropatía, la vida media y la estabilidad

Resultados: A partir de 9 péptidos iniciales, se obtuvo 4 candidatos provenientes de un antígeno de superficie (LAG1) y procesos metabólicos (Nucleasa S1/P1 y poli(ADP-ribosa)-glicohidrolasa). Compuestos de 15 aminoácidos, con probable unión a al menos el 57.8% de los alelos de DRβ1 en la población general, conservados entre cepas de *Toxoplasma gondii* y con poca probabilidad de comportarse como alérgenos.

Conclusión general: En este estudio, utilizando una estrategia racional mediante herramientas de biología computacional, se logró identificar 4 péptidos de *Toxoplasma gondii* con una afinidad a al menos el 57.8% de los alelos mas prevalentes de cada grupo de HLA-II DRβ1, que constituyen elementos importantes para futuros experimentos en busca de un posible candidato vacunal

Descriptores / Palabras Claves: *Toxoplasma gondii*, Biología Computacional, Cadenas HLA-DRB1, Péptidos, Proteínas.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad del Quindío por las instalaciones y las herramientas que tuve a mi disposición para incrementar mi aprendizaje, a los docentes por su tiempo y estar siempre prestos a enseñar y ayudar durante este proceso.

Gracias mis compañeras de maestría Mónica Rincón, Lorena García, Diana Carolina Ramírez y Margarita Cardona por su grata compañía, apoyo y enseñanzas en todo el tiempo que tuve la fortuna de compartir con ellas. A todos los profesores de la maestría y su directora la doctora Olga Alicia Nieto, muchas gracias por su diligencia en todos los procesos académicos y administrativos.

Al Grupo de investigación GEPAMOL porque a través de su asesoría científica, técnica y académica permitieron la ejecución de esta investigación. A mis tutores Néstor Iván Cardona y Jorge Enrique Gómez por todo el conocimiento que me aportaron a lo largo del proyecto, porque su ayuda y orientación hicieron posible su culminación. Agradezco a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia que no solo me aportó herramientas claves para el desarrollo del proyecto si no también enseñanzas sobre cómo utilizarlas de manera óptima y así orientar el trabajo para una mejor culminación.

Agradezco a mi esposa Anabeli Coronel Gaviria por su amor incondicional y apoyo todo este tiempo, así como a mi hermana Ruth Gabriela Cabrera y mis padres Ruth Mercedes Velasco y Jesús Antonio Cabrera Moncayo que no solo fueron la razón por la que inicie este importante proceso académico, sino también por la que lo culmino en aras de continuar con mi formación futura.

Tabla de contenido

1. Introducción.	9
2. Objetivos.	12
2.1. Objetivo General.	12
2.2. Objetivos Específicos.	12
3. Marco Teórico.	13
3.1. Generalidades de <i>Toxoplasma gondii</i>	13
3.2. Manifestaciones Clínicas de la Toxoplasmosis.	14
3.3. Impacto social y económico de la Toxoplasmosis.	15
3.4. Respuesta Inmune contra <i>Toxoplasma gondii</i>	16
3.5. Hallazgos en inmunización contra <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.6. Papel de las Herramientas bioinformáticas.	22
4. Materiales y métodos.	25
4.1. Selección de proteínas.	25
4.2. Selección de alelos de HLA-II DR β 1.	26
4.3. Predicción de péptidos con afinidad a los alelos DR β 1 seleccionados.	28
4.4. Determinación de características biológicas y fisicoquímicas de los péptidos.	29
4.5. Análisis de datos.	30
5. Resultados.	31
5.1. Proteínas seleccionadas	31
5.2. Péptidos afines a los alelos seleccionados	38
5.3. Características fisicoquímicas y biológicas de los péptidos identificados	39
6. Discusión.	42
7. Conclusión.	52
8. Bibliografía.	53
9. Anexos.	65

- Anexo 1: Diccionario de alelos de HLA-II DR β 1 provisto por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC. 65
- Anexo 2: Lista de proteínas de las diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* con un incremento en su expresión mayor a 1.5 veces (FC: fold change) en las primeras 44 horas de infección en humanos. 73
- Anexo 3. Afinidad peptídica por los alelos utilizados 76
- Anexo 4: Lista de resultados de BLASTp de cada péptido seleccionado en las diferentes cepas existentes en ToxoDB. 80

Lista de Tablas

Tabla 1: Estudios de Espectrometrías de masas disponibles en ToxoDB con los intervalos en el tiempo que permiten evaluar.	25
Tabla 2: Numero de alelos de DR β 1 seleccionados en cada grupo y prevalencia en porcentaje que abarcan dentro del mismo.	26
Tabla 3: Lista de alelos de HLA-DR β 1 más reportados en allelefrequencies.net.	27
Tabla 4: Distribución de las proteínas de cada cepa según su incremento en expresión a lo largo de la infección.	34
Tabla 5: Lista de las 3 proteínas de cada cepa de <i>Toxoplasma gondii</i> con mayor incremento en su expresión durante la infección.	35
Tabla 6: Incremento en la expresión de las 9 proteínas con mayor FC (Fold Change) durante la infección por 4 cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> en su momento más alto (H: horas de infección).	37
Tabla 7: Péptidos predichos mediante NetMHCIIIPAN 3,2 que se unen los alelos HLA-II DR β 1 seleccionados.	38
Tabla 8: Características fisicoquímicas y biológicas de péptidos.	40

Lista de Figuras

Figura 1: Vías de interacción de <i>Toxoplasma gondii</i> con la célula presentadora de antígeno.	20
Figura 2: Flujo-grama de herramientas utilizadas en el proceso de identificación de péptidos de unión a HLA-DR β 1.	30
Figura 3: Grupos estructurales y/o funcionales de las proteínas con mayor incremento en su expresión.	31

Figura 4. Distribución de las proteínas de cada grupo estructural y/o funcional según el máximo aumento en la expresión que alcanzan.	32
Figura 5. Comportamiento del incremento en las proteínas de las diferentes cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> a través del tiempo.	33

1. Introducción

La toxoplasmosis es una patología que pese a generar un estado crónico sin sintomatología en la mayoría de los individuos a los que afecta, puede llegar a causar diversos estados de discapacidad en algunas personas. Debido a esto, a su distribución global, a la no disposición de medicamentos para eliminar el parásito en su estado crónico sintomático e incapacitante y a las repercusiones socioeconómicas que se generan anualmente; se han realizado múltiples estudios en busca de comprender tanto el parásito como su interacción con el sistema inmune, para encontrar una manera de evocar una respuesta adecuada en los individuos que aún no han entrado en contacto con la infección ([Montoya et al. 2004](#), [Pappas et al. 2009](#)).

De estos procesos, se ha logrado encontrar que pacientes con toxoplasmosis crónica asintomática, a quienes se considera que lograron un adecuado control de la enfermedad, en contraste a los que desarrollan lesiones incapacitantes como la toxoplasmosis ocular, cerebral o generalizada; presentan una respuesta inmune citotóxica con predominio de linfocitos T CD8+, con producción de IL – 2, IL-12, IFN- γ y TNF- α ([Goldszmid et al. 2012](#), [Mordue et al. 2014](#)). Por esta razón, la presencia de estas características ha sido considerada como el objetivo a alcanzar al intentar lograr una vacuna por diversos métodos. De manera particular, el proceso que busca identificar péptidos de *Toxoplasma gondii* mediante biología computacional, se ha llevado a cabo seleccionando epítopes presentados mediante HLA-I, con la finalidad de estimular directamente los linfocitos citotóxicos y de esa manera promover la respuesta inmune descrita previamente ([Goodswen et al. 2014](#), [El Bissati et al. 2014](#), [Chen et al. 2013](#), [Wang et al. 2011](#), [Duquesne et al. 1991](#)).

En lo que respecta a los linfocitos T CD4+ activados por medio de la presentación de epitopes utilizando el HLA-II, se han encontrado múltiples funciones entre las que se destaca la orientación del predominio de la respuesta inmune hacia la citotoxicidad o la producción de anticuerpos. Esta depende del patógeno que se encuentre afectando al organismo y se da principalmente al haber una diferenciación hacia linfocitos Th1 o Th2 respectivamente, los cuales además de potenciar la respuesta que los caracteriza, también poseen la capacidad de regular la actividad del otro grupo (Th1 o Th2). Por otra parte, en todo proceso inflamatorio también se generan linfocitos T reguladores que tienen la finalidad de controlar dicho suceso, ya que si se le permite progresar de manera desmesurada, el daño que puede llegar a sufrir el organismo sería mayor que el atribuible a la causa externa que inició el problema ([Hunter et al 2012](#), [Rojas et al. 2010](#)).

Dichas regulaciones, tanto específicas (Th1, Th2) como generales (L Treg); facilitan la aparición de células efectoras con capacidad de madurar hacia células de memoria, lo cual es mucho menos frecuente durante un proceso inflamatorio que cursa de manera descontrolada, puesto que en estos casos el sistema inmune tiende a producir más células que se especializan principalmente en controlar la agresión y carecen de la capacidad de diferenciarse hacia una forma duradera que facilite la respuesta ante una nueva exposición al mismo factor dañino ([Jankovic et al. 2010](#), [Yap et al. 2006](#), [Butler et al. 2013](#) [Yap et al. 2006](#)).

Teniendo en cuenta las funciones de este tipo de respuesta inmune, es importante considerar la identificación de péptidos para ser presentados por el HLA-II a linfocitos T CD4+, con la finalidad de complementar la citotoxicidad observada en los epitopes hallados hasta el momento como los 6 descritos por Cong et al. en el 2010, o los 9 propuestos por Cardona et al. en el 2015. Sin embargo, actualmente la búsqueda *in silico* de péptidos de *Toxoplasma gondii*

con características que les permitan la estimulación de linfocitos ayudadores no ha sido preeminente debido a la existencia de un péptido (pan DR epitope [PADRE]), que ha mostrado la inducción de la respuesta inmune propia de los linfocitos T CD4+ (IL-4, IL-10, IFN- γ) que puede ser utilizado como adyuvante (Alexander et al. 1994, Cong et al. 2010).

Debido a lo anterior, hasta el momento no se conocen los epítopes naturales del parásito que pueden cumplir esta función en la historia natural de la enfermedad. Y si se tiene en cuenta que con el desarrollo futuro de un posible candidato vacunal se pretende evocar una respuesta inmune similar a la de los individuos que controlan la enfermedad sin complicaciones; además de la respuesta específica por parte de linfocitos T CD8+, también se debe contar con las múltiples funciones que cumplen los linfocitos ayudadores en la respuesta contra la infección utilizando péptidos provenientes de *Toxoplasma gondii*. Por esta razón y considerando que la biología computacional cuenta con diversas herramientas que pueden facilitar este proceso, como se ha observado en otras circunstancias, el presente estudio utilizó métodos bioinformáticos para identificar péptidos *Toxoplasma gondii* afines a HLA-II.

2. Objetivos

2.1. Objetivos General

Identificar y caracterizar *in silico* péptidos derivados de proteínas de *Toxoplasma gondii* con afinidad hacia el HLA-DRB1.

2.2. Objetivos Específicos

- Elegir proteínas de *Toxoplasma gondii* con altos niveles de expresión extracelular mediante una estrategia racional de búsqueda.
- Identificar péptidos presentados por el HLA-II DR β 1 en las proteínas de *T. gondii* seleccionadas.
- Evaluar las características biológicas y fisicoquímicas de los péptidos identificados por medio de biología computacional.

3. Marco teórico

3.1. Generalidades de *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmosis es una infección causada por un parásito intracelular clasificado según la sociedad de protozoología en el supergrupo Sar, primer rango Alveolata, segundo rango Apicomplexa y especie *Toxoplasma gondii* (Adl et al. 2012). Se trata de una zoonosis de distribución mundial, puesto que posee la capacidad de infectar a todos los animales de sangre caliente (Tentera et al. 2000, Sepulveda et al. 2014, Schlüter et al. 2014), entre ellos el humano. Además, se estima que alrededor de un tercio de la población ha entrado en contacto con este agente patógeno, por lo cual existe una prevalencia de la infección que en la mayoría de los países oscila entre el 40 y el 60% (Montoya et al. 2004, Botero et al. 2012), llegando a estar cerca del 90% en algunas áreas geográficas (Torgerson et al. 2013).

Su ciclo de vida inicia cuando un hospedero definitivo infectado (Felino) elimina ooquistes en las heces, los cuales esporulan en el medio ambiente y se vuelven infectantes para un ave o cualquier mamífero que los ingiera. En un hospedero intermediario se lleva a cabo el ciclo asexual cuando los esporozoítos salen y atraviesan el epitelio intestinal para diseminarse por el cuerpo del hospedero, ya que poseen la capacidad de ingresar en cualquier célula nucleada ya sea por endocitosis o invasión activa. Una vez en las células blanco, estos se transforman en taquizoítos, los cuales se reproducen rápidamente por endodiogenia y destruyen las células para proceder a invadir las adyacentes. Cuando el sistema inmune del hospedero logra controlar el proceso infeccioso agudo, el parásito produce quistes tisulares compuestos por bradizoítos, los cuales constituyen la forma latente de la infección. Finalmente, el ciclo se cierra cuando los felinos ingieren dichos quistes tisulares de sus presas y estos proceden a infectar las células epiteliales intestinales donde se lleva a cabo el ciclo sexual del parásito (Tentera et al. 2000, Montoya et al. 2004, Botero et al. 2012, Hehl et al. 2015). Cabe resaltar que cualquier mamífero puede adquirir la infección tanto al ingerir ooquistes

como quistes tisulares, pero solo en los felinos se desarrollan tanto el ciclo sexuado como el asexuado (Montoya et al. 2004, Botero et al. 2012, Hill et al 2002, Hehl et al. 2015).

3.2. Manifestaciones Clínicas de la Toxoplasmosis

En los seres humanos inmunocompetentes, se ha encontrado que alrededor del 80% de la población, cursa con una forma asintomática de la infección y progresa a un estado crónico que no genera ningún compromiso en las funciones y/o capacidades del hospedero (Dubey et al. 2009, Pappas et al. 2009, Gangneuxa et al. 2012). Incluso, aquellos que presentan una enfermedad febril con adenopatías en su primera interacción con el parásito, terminan controlando el parasito sin mayor problema. Sin embargo, también se puede encontrar una presentación clínica caracterizada por compromiso ocular en alrededor del 2% de los pacientes seropositivos, la cual llega a ser una causa mayor de uveítis en diferentes países (Gangneuxa et al. 2012, Maenz et al. 2014, Park et al. 2013, Pleyer et al. 2014). La toxoplasmosis ocular se caracteriza por una retinocoroiditis que a pesar de resolverse de manera espontanea hacia un estado latente, ocasiona un daño irreversible en el tejido afectado, lo cual se agrava por la presencia de periodos de reactivación de la infección (Butler et al. 2013, Senaka et al. 2013). Por otra parte, cuando la infección por *Toxoplasma gondii* se da en una mujer gestante, este parasito puede inducir abortos espontáneos, o partos prematuros en la embarazada (Torgersona et al. 2013, Pappas et al. 2009, Woodhall et al. 2014), e infección congénita en el feto y recién nacido. El compromiso de la toxoplasmosis congénita depende del periodo de la gestación en que se da el contagio; y éste puede oscilar desde un estado asintomático en el niño afectado, hasta un compromiso neurológico y/u ocular, que puede llegar a causar grandes discapacidades e incluso la muerte (Bollani et al. 2013, McLeod et al. 2009). Finalmente, cuando la toxoplasmosis compromete

pacientes con inmunodeficiencias como los VIH positivos con recuentos de CD4+ menores a 200, los cuales carecen de competencia para lidiar con el parásito de manera adecuada, éste no solo se replica de manera activa y descontrolada en una primo-infección, sino que también puede reactivarse de su estado latente, lo cual genera no sólo afecciones locales de mal pronóstico como la infección cerebral, si no también cuadros clínicos de afectación sistémica multiorgánica con desenlaces fatales ([Montoya et al. 2004](#), [Mesquita et al. 2010](#), [Mordue et al. 2014](#)).

3.3. Impacto social y económico de la toxoplasmosis.

Debido a que la infección por *Toxoplasma gondii* tiene una prevalencia variable dependiendo de la población en estudiada, los costos que representa para los sistemas de salud tanto por la atención directa como por la pérdida de calidad de vida son también diferentes entre poblaciones. Por ejemplo, para el 2012 se estimó que en Estados Unidos había una pérdida anual de aproximadamente 11000 años de vida ajustados por calidad (QALY del inglés quality adjusted life years), así como un gasto de 3 billones de dólares en el mismo periodo de tiempo ([Hoffman et al 2012](#)). En contraste, en el 2016 se encontró que este parásito es el responsable de la pérdida anual de 1903 años de vida saludable DALYs (del inglés Disability adjusted life years) en Holanda, con un gasto aproximado de 50.66 millones de dólares ([Mangen et al. 2017](#)).

Pese a la diferencia entre los países, se puede evidenciar que las cifras permanecen elevadas en general, lo cual está representado en el análisis del impacto de la Toxoplasmosis congénita a nivel mundial en el 2013, donde se estimó una prevalencia de 190100, la que a su vez causa una pérdida anual de 1.2 millones de DALYs ([Torgerson et al. 2013](#)). Considerando estas cifras, se puede evidenciar que pese a la variabilidad entre regiones, en general la carga socioeconómica que el parásito representa para la población es elevada.

3.4. Respuesta Inmune contra *Toxoplasma gondii*.

La **Figura 1** muestra un resumen de la respuesta que se requiere para lograr un adecuado control de esta infección. El sistema inmune cuenta con un amplio arsenal de mecanismos tanto en la respuesta específica como inespecífica. La respuesta inmune innata es la primera en entrar en contacto con el parásito mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés Pathogen associated molecular patterns), principalmente por los receptores tipo Toll (TLR del inglés Toll like receptors), en los que se destacan el TLR-2 y TLR-4 que interactúan con el glicosilfosfatidilinositol (GPI), TLR-7 y TLR-9 que reconocen ARN y ADN del parásito respectivamente y aparentemente TLR-5 que juega en los humanos el mismo papel que en murinos llevan a cabo TLR-11 y TLR-12 al ser activados por profilina. Cabe resaltar que, si bien estas vías de reconocimiento no son indispensables en la respuesta inmune, si han demostrado jugar un papel importante en la inducción de una inmunidad protectora al ser estimulados ([Debierre et al. 2007](#), [Gonzalez et al. 2014](#), [Hitziger et al. 2005](#), [Mordue et al. 2014](#), [Yarovinski 2014](#), [Yarovinski et al. 2006](#)). Esta respuesta puede lograr un control adecuado del parásito mediante la producción de TNF- α e IL-12 por parte de los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas en mayor proporción ([Mashayekhi et al. 2011](#), [Miller et al. 2009](#), [Sanecka et al. 2012](#)).

Dichas citoquinas han sido identificadas como las principales efectoras en el inicio de la respuesta inmune, ya que el TNF- α se encarga de promover un estado proinflamatorio protector y la IL-12 tiene la capacidad de inducir en las células asesinas naturales y en los linfocitos T, la producción de IFN- γ , el cual es considerado como el principal factor para el control de la toxoplasmosis ([Goldszmid et al. 2012](#), [Mordue et al. 2014](#)). Cabe resaltar, que estas mismas células tienen la capacidad de producirlo mediante el reconocimiento directo

del parásito, aunque en menor medida (Ge et al. 2014). Este interferón es el encargado no sólo de inducir la síntesis de derivados reactivos del oxígeno en células fagocíticas y de provocar destrucción directa del mismo mediante la vía de las IRGs, como ha sido observado en ratones (Ge et al. 2014, Hunter et al 2012), sino también, tiene la capacidad de alterar la presencia de células en el sitio de la inflamación al atraer a una mayor cantidad de células dendríticas pro-inflamatorias y al mismo tiempo estimular la producción de IL-12, con lo que consigue mayor liberación de sí mismo (Goldszmid et al. 2012, Mordue et al. 2014). Finalmente, el IFN- γ no ha sido totalmente dilucidado puesto que induce la expresión de alrededor de 1000 genes y de la mayoría de estos no se conoce aún su función (Mordue et al. 2014).

La inmunidad adaptativa parte de un adecuado reconocimiento del parásito por la inmunidad inespecífica, ya que esta influye en la calidad de la respuesta (Roberts et al. 2014), y se basa principalmente en las múltiples capacidades del espectro funcional de los linfocitos T para controlar el parásito. Uno de los pasos iniciales en la respuesta contra *Toxoplasma* de la inmunidad específica y hasta ahora considerado el más importante, es la activación de los linfocitos T CD8+, mediante la presentación de antígenos por medio del antígeno leucocitario humano tipo I (HLA-I). Éste, se encuentra presente en todas las células salvo en los eritrocitos (Bhadra et al. 2011) y consta de las cadenas β 2 Microglobulina y α , siendo las subunidades 1 y 2 de esta última, las que conforman el bolsillo en el cual los epítopes son presentados a los linfocitos mencionados (Kindt et al. 2007). Como se ha observado en otros parásitos intracelulares, la importancia de los linfocitos T CD8+ activados subyace no solo en la citotoxicidad mediante el uso de perforinas, granzimas y derivados reactivos del oxígeno; si no también en su considerable producción de IFN- γ y el TNF- α , con lo cual en el caso particular de *Toxoplasma gondii*, aparte de acabar con un gran número de parásitos, también induce su paso hacia su

estado latente en forma de bradizoítos ([Hunter et al 2012](#), [Bhadra et al. 2011](#), [Jordan et al. 2010](#)).

Por otra parte, otro proceso de vital importancia en el control de la toxoplasmosis consiste en la activación del repertorio de linfocitos T CD4 +. La presentación de antígenos en este caso, se lleva a cabo mediante el antígeno leucocitario humano tipo II (HLA-II), el cual se diferencia del tipo I porque sólo lo expresan las células presentadoras de antígeno profesionales y debido a que su bolsillo es abierto por estar compuesto de la primera subunidad tanto de la cadena α como β ([Kindt et al. 2007](#), [Rojas et al. 2010](#)). Estos linfocitos poseen múltiples funciones debido a la capacidad que tienen de diferenciarse en diversos tipos de efectores; en primer lugar, si se diferencian a células Th1 no solo producen IFN- γ , cuya función ya fue descrita previamente, si no también producen IL-2, la cual es importante en el proceso de maduración de los linfocitos T CD8+, lo que a su vez potencia la actividad que permite el adecuado manejo de la infección por el parásito ([Ge et al. 2014](#), [Hunter et al 2012](#), [Bhadra et al. 2011](#), [Jordan et al. 2010](#)). Además, cuando hay una diferenciación hacia Th2, predomina la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y la IL-4, acompañadas de una orientación a la respuesta inmune humoral, que para el caso de la infección por este parásito significa una medida para evitar la respuesta inflamatoria exagerada. Esto último se ha demostrado de importancia, debido a lo observado en ratones carentes de IL-10, en los cuales este déficit en la regulación de la respuesta inmune desencadena en el hospedero un daño aun mayor que el atribuible a la infección ([Jankovic et al. 2010](#), [Yap et al. 2006](#), [Butler et al. 2013](#)); principalmente porque el proceso inflamatorio descontrolado genera un daño no solo más amplio si no también más rápido que cuando existe una deficiencia de IFN- γ o IL-12 ([Yap et al. 2006](#)). También, cabe mencionar que la respuesta inmune citotóxica que no se acompaña de una regulación adecuada; es decir cuando hay un exceso de IL-12 e IFN- γ , desencadena una

mayor diferenciación de los linfocitos T CD8+ hacia un subtipo efector de corta duración y una limitada aparición de precursores de memoria inmunológica, lo cual se contrasta con una distribución equitativa de dichas células en la presencia de una respuesta inmune balanceada ([Bhadra et al. 2011](#)).

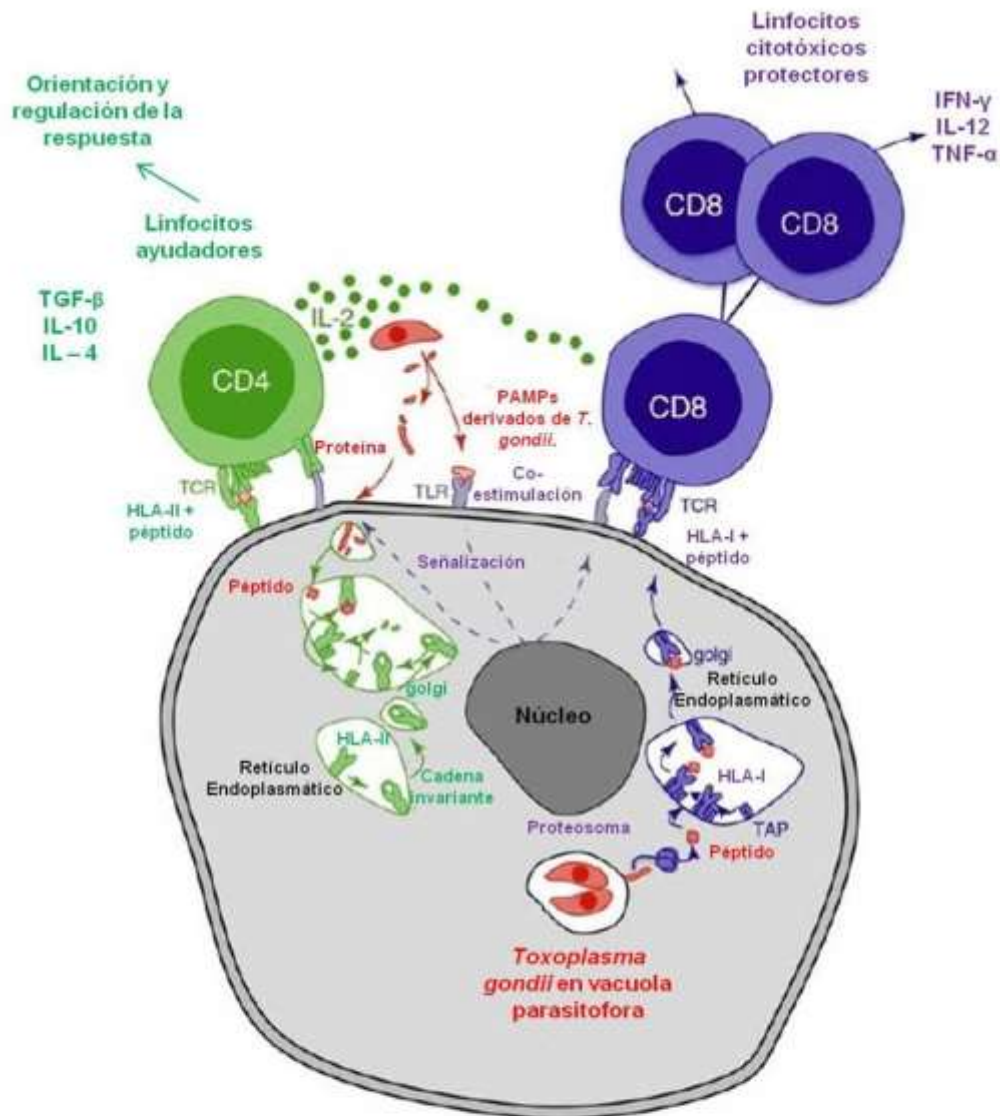


Figura 1: Vías de interacción de *Toxoplasma gondii* con la célula presentadora de antígeno. El parásito cuenta con diversas moléculas que actúan como patrones moleculares asociados a patógenos, incluyendo el glicosilfosfatidilinositol, la profilina y su información genética (ADN, ARN); que al unirse a sus TLR respectivos inducen una cascada de señalización que culminan en la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α y de diversas moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígenos. Por otra parte, cuando el parásito invade activamente la célula y se encuentra en la vacuola parasitofora, las proteínas que produce son procesadas en el proteosoma para después ser transportadas al retículo endoplasmático por el TAP (del inglés transporter associated with antigen processing), ahí los péptidos resultantes se asocian a las moléculas HLA-I y este complejo sale a la superficie celular donde activa los linfocitos CD8+ al interactuar con su receptor de células T (TCR del inglés T cell receptor). Lo que resulta en la inducción de una respuesta citotóxica con abundancia de citoquinas proinflamatoria entre las que se destaca el IFN- γ que ha sido asociado con el adecuado control de la infección. Finalmente, cuando *Toxoplasma gondii* es fagocitado, sus proteínas son degradadas por proteólisis en el fagolisosoma para después ser expuestas a las moléculas HLA-II que llegan unidas a la cadena invariante desde el retículo endoplasmático a través del aparato de golgi. Una vez esta cadena removida, se permite la formación de un complejo HLA-II – péptido que luego sale a la superficie celular, donde activa los linfocitos CD4+ al interactuar con su TCR, lo que induce una respuesta ayudadora que tiene la capacidad de fortalecer la citotoxicidad por medio de citoquinas como la IL-2 y a su vez puede controlar el proceso inflamatorio para que éste no se salga de control, por medio de interleuquinas como la 4, la 10 y el factor de crecimiento transformante. **Tomado, traducido y modificado de Henríquez et al, 2010**

3.5. Hallazgos en inmunización contra *Toxoplasma gondii*.

Pese al repertorio inmunológico descrito previamente y a la eficacia con que los fármacos existentes logran que el parásito pase a la etapa de lenta replicación en su ciclo de vida, este no puede ser eliminado una vez alcanza este estado (bradizoíto) y el individuo infectado queda expuesto a una recaída en caso de un déficit inmunológico. Por lo tanto, los conocimientos que se han ido adquiriendo acerca de la inmunología de la respuesta contra él, y las nuevas herramientas tecnológicas que se han venido desarrollando en el área de la Bioinformática, como las bases de datos de genes y proteínas, ([Gajria et al. 2008](#)), han sido empleados en el intento de desarrollar vacunas por diferentes vías, ya que el uso de organismos completos vivos o atenuados no ha dado resultados satisfactorios por el riesgo que implica su manipulación y administración ([Fereig et al. 2016](#), [Li et al. 2018](#), [Lu et al. 2015](#), [Zhang et al. 2015](#), [Henriquez et al. 2010](#), [Sette et al. 2003](#), [Torres et al. 2014](#)). De lo anterior, se destaca la identificación de péptidos y proteínas pertenecientes a *Toxoplasma gondii* con potencial de inducir inmunidad tanto citotóxica como humoral, mediante el uso tanto de algoritmos predictivos, como de procesos experimentales. ([Goodswen et al. 2014](#), [El Bissati et al. 2014](#), [Chen et al. 2013](#), [Wang et al. 2011](#), [Duquesne et al. 1991](#)). Utilizando HLA-I para la presentación de péptidos, se ha logrado la identificación de candidatos que tienen la capacidad de inducir la liberación de citoquinas asociadas a respuesta citotóxica (INF γ , IL-12), en PBMCs (del inglés peripheral blood mononuclear cell) de pacientes que han controlado previamente la infección ([Cong et al. 2010, 2011](#)), lo cual podría ser tomado como un primer paso en la elaboración de una vacuna contra *Toxoplasma gondii* ([Cardona et al. 2015](#), [Cong et al. 2010, 2011](#), [Tana et al. 2010](#), [Torres et al. 2014](#),).

Cabe mencionar también, que el estímulo de la respuesta inmune CD4+ mediante la presentación de antígenos por HLA-II, ha sido evaluada predominantemente con el fin de obtener respuesta en modelos murinos

([Roozbehani et al. 2018](#)). Sin embargo, en humanos no ha sido profundamente investigada utilizando los medios bioinformáticos y experimentales, o ha sido adjudicada al uso de adyuvantes específicos que provienen de otros microorganismos y tienen una alta afinidad por el HLA-II como el péptido AKFVAAWTLKAAA denominado pan DR epitope (PADRE) ([Cong et al. 2010](#), [Tana et al. 2010](#)).

3.6. Papel de las herramientas bioinformáticas

Actualmente, con el incremento constante de información genómica y proteómica entre otras, se hace necesario el funcionamiento de bases de datos que permitan un fácil acceso a todos estos datos. Tal es el ejemplo de ToxoDB [<http://toxodb.org/toxo/>] para *Toxoplasma*, *Cyclospora*, *Cystoisospora*, *Eimeria*, *Hammondia*, *Neospora* y *Sarcocystis*, así como PlasmoDB [<http://plasmodb.org/plasmo/>] para las 21 especies de *Plasmodium* registradas en la misma ([Aurrecoechea et al. 2008](#), [Gajria et al. 2007](#)). Estas bases de datos no solo permiten obtener información molecular por cualquier investigador para que la utilice en sus propios estudios, si no también fomenta su mismo crecimiento.

Por otra parte, existen diversas herramientas que permiten hacer aproximaciones en otras áreas como por ejemplo la inmunológica, destacándose NetMHC 4.0 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>] que permite predecir péptidos que puedan unirse a diferentes alelos del HLA-I y que ya se ha probado su eficacia predictiva a la hora de hacer pruebas *in vitro* ([Andreatta et al. 2016](#), [Cong et al. 2010, 2011](#), [Tana et al. 2010](#), [Torres et al. 2014](#)). También existen plataformas que tienen disponibles varias opciones como TEPITOPE [<http://datamining-iip.fudan.edu.cn/service/TEPITOPEpan/TEPITOPEpan.html>] o IEDB [www.iedb.org/], que tienen la opción de predecir la unión a los alelos del HLA-

I, HLA-II e incluso a linfocitos B (Bordner et al. 2010, Vita et al. 2018). Sin embargo, en cuanto a predicción de unión a HLA-II se trata, es difícil obtener resultados más acertados en comparación con HLA-I, debido a múltiples razones entre las que se destaca que el bolsillo de la molécula es abierto y por ende se une a péptidos más largos, cuyos extremos pueden interactuar de manera muy variable con el resto de la proteína de presentación. Además, el DR β 1 que es el locus más frecuente en la población y el principal presentador de antígeno para activar linfocitos T CD4, tiene una amplia variedad de alelos, lo que sugiere que incluso si se logra identificar una molécula con alta probabilidad de unión al DRB1, es muy posible que las pruebas experimentales posteriores den resultados negativos si el alelo utilizado en estas no coincide con el utilizado *in silico*. Por esta razón, los resultados no suelen ser tan confiables como los obtenidos para el HLA-I, sin embargo se destacan herramientas como NetMHCII pan 3.2 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>], que con actualizaciones continuas y cambios en sus algoritmos para dar resultados de unión similares a los observados *in vitro*, constituye una buena opción para la predicción de éstos epítopes (Jensen et al. 2018).

Finalmente, existen herramientas con diversas funciones que permiten caracterizar proteínas como Phobius [<http://phobius.sbc.su.se/>] (Lukas et al. 2004), que predice la presencia de péptido señal, o AllerTop [<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>] (Dimitrov et al. 2014) que compara proteínas o péptidos problema con una base de datos extensa de alérgenos con el fin de hallar similitudes que sugieran posibilidad de alergenicidad; así como métodos en particular como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que es una estrategia para alinear secuencias ya sea de ácidos nucleicos o de proteínas con el fin de hallar similitudes entre diferentes especies. BLAST es utilizado en plataformas de múltiples herramientas como las bases de datos descritas previamente o espacios web de herramientas bioinformáticas como ExPASy

[<https://www.expasy.org/>], que se trata de un sitio web con múltiples utilidades que permiten realizar todo tipo de procedimientos como traducción, identificación de características fisicoquímicas de diversas moléculas, e incluso llevar a cabo análisis estructurales entre muchas otras posibilidades (Artimo et al. 2012).

4. Materiales y métodos.

4.1. Selección de proteínas

En la metodología de selección de proteínas para analizar, se buscó en primer lugar aquellas que contaran con dominios transmembrana, y considerando que la principal característica de una proteína que será secretada es contar con un péptido señal, esta fue una segunda condición buscada en el proceso. La identificación de proteínas con estas cualidades se llevó a cabo mediante el sistema de búsqueda disponible en ToxoDB [<http://toxodb.org/toxo/>]([Gajria et al. 2007](#)).

Además, también se utilizó el sistema de ToxoDB para determinar cuáles de estas tenían un aumento en su expresión durante la infección en fibroblastos provenientes de *Homo sapiens*, ya que la base cuenta con información de espectrometría de masas cuantitativa en 6 experimentos con 4 cepas diferentes que muestran el número de veces que incrementa o disminuye una proteína (**FC**: Fold Change) en determinado momento de la infección (**Tabla 1**). Por esto, fue posible adicionar a las características anteriores, el aumento en la expresión en 1.5 veces o más para contar con candidatos que no solo hagan parte de la superficie y/o espacio extracelular, si no también que incrementen su expresión más durante la infección.

Tabla 1: Estudios de espectrometría de masas disponibles en ToxoDB con los intervalos en el tiempo que permiten evaluar.

Ensayos	Intervalos de tiempo
Infección por ME49 0-44 horas	2-36-44 Horas
Infección por ME49 0-16 horas	2-4-8-16 Horas
Infección por VEG 49 0-44 horas	2-36-44 Horas
Infección por VEG 0-16 horas	2-4-8-16 Horas

Infección por RH 0-36 horas	2-22-36 Horas
Infección por GT1 0-16 horas	2-4-8-16 Horas

4.2. Selección de alelos de HLA-II DR β 1

La selección de alelos utilizados en la predicción se realizó a través de un diccionario provisto y empleado por grupos de investigación de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC, en el que figuran la lista de los grupos de alelos de DR β 1 (Ejemplo: DR β 1_01, 04, 07, etc.) con el porcentaje de prevalencia que tiene dentro del mismo cada alelo en particular (Ejemplo: DR β 1_01:01, 04:01, 07:01, etc) (**Anexo 1**). De este catálogo se escogieron 118 alelos que representan por lo menos el 59.5% de los prevalentes dentro de cada grupo, y su distribución se puede observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Numero de alelos de DR β 1 seleccionados en cada grupo y prevalencia en porcentaje que abarcan dentro del mismo

Grupo de alelos	Alelo con mayor prevalencia en cada grupo y porcentaje de la misma	Numero de alelos seleccionados	Prevalencia dentro del grupo de los alelos
DRB1_01	0101 (51.7%)	4	71,20%
DRB1_03	0301 (51.8%)	8	71,30%
DRB1_04	0401 (14%)	22	70,20%
DRB1_07	0701 (50%)	6	72,90%
DRB1_08	0801 (30%)	9	70,90%
DRB1_09	0901 (57%)	4	71,30%

DRB1_10	1001 (43%)	3	71%
DRB1_11	1101 (27%)	15	65%
DRB1_12	1201 (60%)	5	83,50%
DRB1_13	1301 (19%)	17	59,5
DRB1_14	1401 (15%)	17	52,20%
DRB1_15	1501 (55%)	5	78,90%
DRB1_16	1601 (64%)	3	80

También existe una plataforma que recopila todos los resultados de tipificación de antígenos leucocitarios humanos realizados mundialmente llamada [allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) [<http://www.allelefrequencies.net/>] (Faviel et al. 2015), y al hacer la comparación de su lista de los alelos de DRB1 más reportados, se encuentra que concuerdan con los mas prevalentes en cada grupo según el diccionario provisto por FIDIC como los de mayor prevalencia dentro de cada grupo (**Tabla 3**). Razón por la cual también se decidió proceder con la lista mencionada en la **Tabla 2**.

Tabla 3: Lista de alelos de HLA-DRB1 más reportados en allelefrequencies.net **A.** En la columna izquierda se muestran los alelos reportados en la base de datos en orden descendente de mayor a menor. **B.** En la columna derecha se muestra la prevalencia de cada uno de ellos en su grupo según el diccionario de FIDIC.

A: Alelos más reportados en allele frequencies.net	B: Porcentaje de prevalencia dentro de cada grupo según diccionario de la FIDIC
HLA-DRB1*03:01	51.8%
HLA-DRB1*01:01	51.7%

HLA-DRB1*15:01	55%
HLA-DRB1*04:03	11%
HLA-DRB1*13:01	19%
HLA-DRB1*10:01	43%
HLA-DRB1*11:01	27%
HLA-DRB1*14:01	15%
HLA-DRB1*13:02	11%
HLA-DRB1*04:04	7.7%
HLA-DRB1*07:01	50%

4.3. Predicción de péptidos con afinidad a los alelos DR β 1 seleccionados

Una vez seleccionadas las proteínas, su secuencia de aminoácidos (también disponible en ToxoDB) fue utilizada en la herramienta NetMHCIIpan 3.2 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>] (Jensen et al. 2018), predictor de unión al HLA-II. Los resultados son arrojados como SB (Strong binding) cuando se requiere un concentración menor 15 nM para su unión y WB (Weak binding) cuando dicha concentración es entre 15 y 50 nM.

Considerando que en la actualidad *Toxoplasma gondii* cuenta con gran variedad de cepas infectantes, se realizó una comparación para determinar si los péptidos seleccionados se conservaban en las 11 cepas reportadas para *Toxoplasma*, para esto se utilizó la herramienta BLAST, particularmente en su sub-sección BLASTp que permite comparar secuencias de aminoácidos. Este análisis se realizó con la información existente en la base de datos ToxoDB.

4.4. Determinación de características biológicas y fisicoquímicas de los péptidos

Con el objetivo de complementar la información acerca de los péptidos identificados, se utilizó la herramienta AllerTOP 2.0 [<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>] (Dimitrov et al. 2014), que al realizar una comparación de la secuencia problema con una base de datos de alérgenos conocidos, la clasifica como posible alérgeno o no alérgeno. Por otra parte, la herramienta ProtParam [<https://web.expasy.org/protparam/>] disponible en la plataforma ExPASy (Gasteiger et al 2005), fue utilizada para determinar algunas características fisicoquímicas, como la estabilidad mediante el índice de estabilidad (II) que se calcula con valor asignado a los dipéptidos existentes y permite estimar la estabilidad de una proteína en un tubo de ensayo; un valor de 40 o superior sugiere inestabilidad. También se aprovechó su capacidad de arrojar una aproximación a la vida media del péptido en tres especies (humano, levadura y *E. coli*) considerando el aminoácido en el extremo N-terminal y en este caso se tomó en cuenta la información sugerida para *Homo sapiens*, puesto que el objetivo final de estos péptidos es su uso en esta especie. Finalmente, en cuanto a características fisicoquímicas, se tomó en cuenta también el índice GRAVY (Grand Average of Hydropathy) que suma los valores de hidropatía de cada aminoácido y luego promedia por el número de residuos de la secuencia, obteniendo así valores entre 4.5 y -4.5 siendo más hidrofóbico en cuanto más positivo sea el resultado.

4.5. Análisis de datos

En síntesis, los resultados obtenidos al seguir el flujograma expuesto en la **Figura 2**, fueron analizados de manera cualitativa, dependiendo de la

presencia o ausencia de las características buscadas en las proteínas y péptidos. Se consideraron como candidatos definitivos, los péptidos con unión a al menos el 50% de los HLA DR β -I de la población, conservados en las 11 cepas de *Toxoplasma gondii*, considerados como probables no alérgenos y provenientes de las proteínas que contaran con péptido señal, dominios transmembrana y que tuvieran el mayor incremento en su expresión durante la infección por el parásito en células humanas.

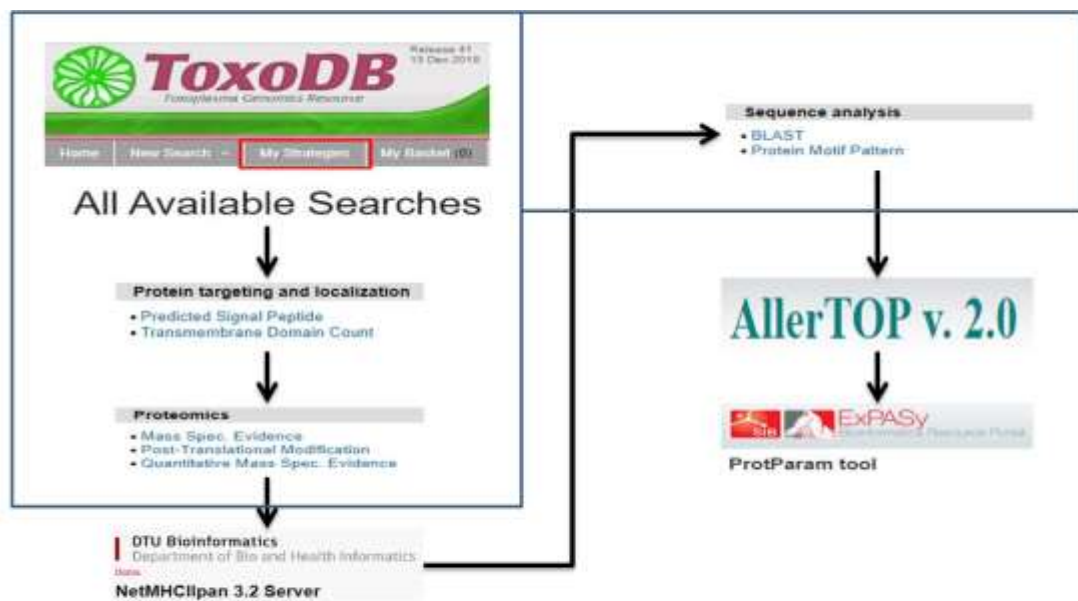


Figura 2. Flujo-grama de herramientas utilizadas en el proceso de identificación de péptidos de unión a HLA-DR β 1.

5. Resultados

5.1. Proteínas seleccionadas

Por medio de las herramientas disponibles en ToxoDB (Toxoplasma Genomic Resource) para búsqueda de genes, se obtuvieron 22978 que codificaban para proteínas con péptido señal, 19398 que tenían dominios transmembrana y 6628 con ambas características sin incluir las proteínas hipotéticas (1089).

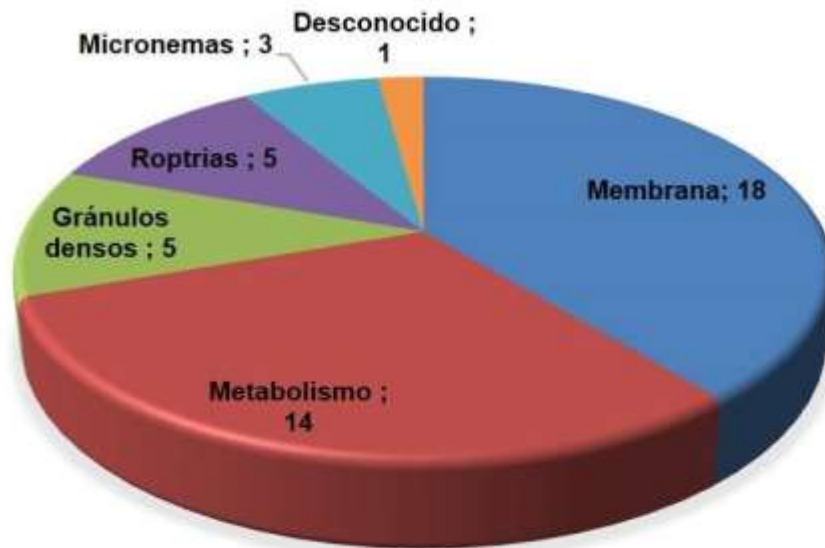


Figura 3. Grupos estructurales y/o funcionales de las proteínas con mayor incremento en su expresión: se muestra la distribución de las 46 proteínas con incremento en su expresión de al menos 1,5 veces durante las primeras 44 horas de infección por *Toxoplasma gondii*.

Posteriormente, al utilizar la información de los experimentos con diferentes cepas (VEG, GT1, RH y ME49) registrados en la base de datos sobre los cambios cuantitativos de las proteínas de *Toxoplasma gondii* durante infección en *Homo sapiens* (FC: **fold change**), se identificaron 46 proteínas con péptido señal y dominios transmembrana que presentan un incremento mayor a 1.5 veces sus niveles en las primeras 44 horas de infección (**Anexo 2**). De las cuales 32 hacen parte ya sea de la membrana celular o de procesos metabólicos del parásito y las restantes provienen de los organelos secretorios

de *Toxoplasma gondii* (**Figura 3**). De esta distribución se resalta que la mayoría de las proteínas solo se incrementan entre 1.5 y 2 veces sin importar de que estructura provengan (**Figura 4**), a excepción de las 5 que hacen parte de los gránulos densos que alcanzan incrementos más elevados.

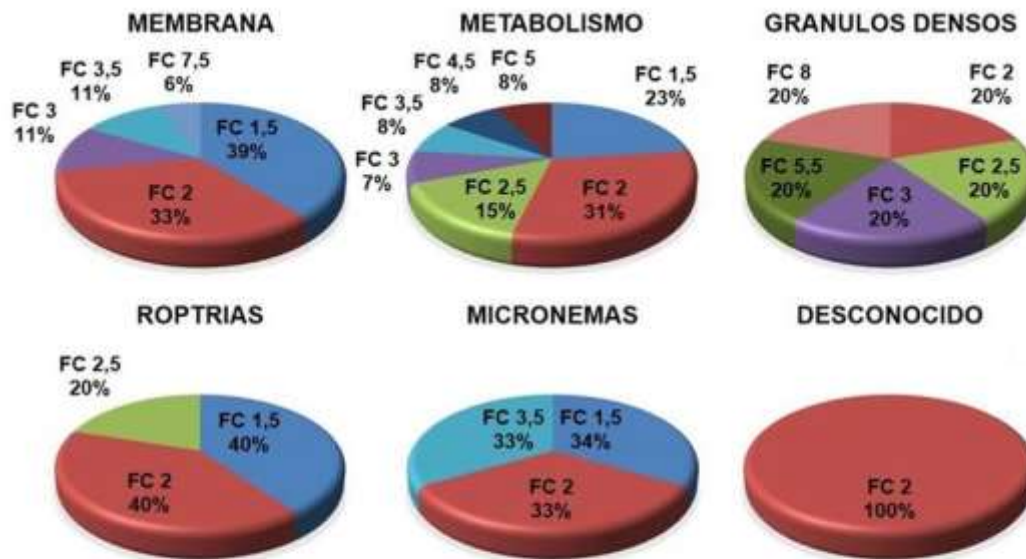


Figura 4. Distribución de las proteínas de cada grupo estructural y/o funcional según el máximo aumento en la expresión que alcanzan: Se muestran diagramas de cada grupo con el máximo FC (Fold Change) que alcanzan las proteínas que las integran, distribuidas en porcentaje.

Además, se observó que el incremento varía tanto a través del tiempo como entre las diferentes cepas utilizadas en los experimentos (**Figura 5**). Por ejemplo, la cepa RH cuenta con una proteína que alcanza un pico en su incremento de 5.5 FC a las 22 horas, pero a las 36 ya ha disminuido a 2.5. A diferencia de la cepa VEG que posee un incremento constante de 3.5 FC en una de sus proteínas desde las 16 hasta las 44 horas de la infección. Cabe resaltar que, en todos los momentos de la infección analizados en cada experimento, cada cepa tiene al menos una proteína con incremento en su

expresión, las columnas vacías son simplemente porque el experimento no aporta datos en ese determinado tiempo.

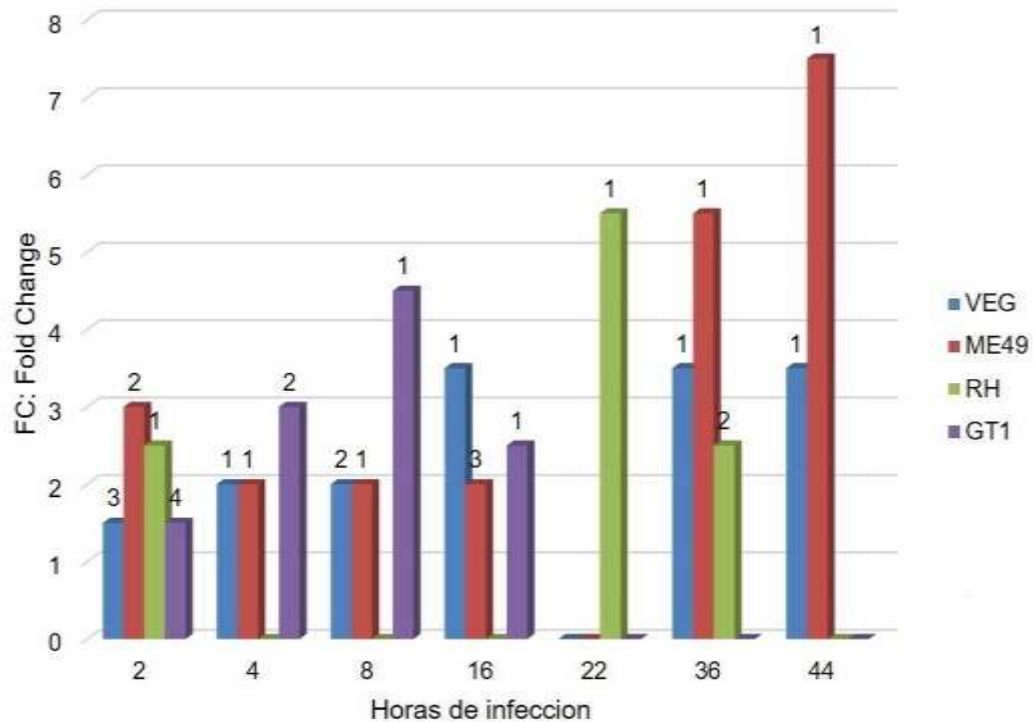


Figura 5. Comportamiento del incremento en las proteínas de las diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* a través del tiempo: Se observa el máximo incremento en la expresión que pueden alcanzar las proteínas de cada cepa en un determinado momento de la infección en células humanas. A la izquierda los valores de FC (Fold Change) y sobre las barras el número de proteínas que presenta el incremento.

Esta variabilidad también se evidencia claramente en la **Tabla 4**, donde se listan el número de proteínas que se incrementan en cada cepa a lo largo de la infección en células humanas. Por ejemplo, la cepa VEG tiene 15 proteínas que incrementan sus niveles hasta en 1.5 veces a lo largo de las primeras 44 horas de la infección, pero solo 8 mantienen este cambio hasta el final del lapso descrito y solo 3 pueden alcanzar un aumento de 3.5 veces su cuantía sin persistir por mucho tiempo.

Tabla 4: Distribución de las proteínas de cada cepa según su incremento en expresión a lo largo de la infección. Se muestra el número de proteínas de cada cepa según su incremento en FC (Fold Change) durante un determinado momento de la infección. Y se listan las horas de infección para cada cepa puesto que difieren entre experimentos.

	GT1				ME49						RH			VEG						
Horas de infección	2	4	8	16	2	4	8	16	36	44	2	22	36	2	4	8	16	36	44	
FC: Fold Change	Numero de proteínas																			
1,5	4	5	9	2	18	3	5	4	20	15	7	12	4	3	5	3	5	10	8	
2	-	4	6	2	10	1	1	3	13	14	2	8	2	-	1	2	3	4	5	
2,5	-	4	5	1	2	-	-	-	3	1	1	5	2	-	-	-	1	2	3	
3	-	2	4	-	2	-	-	-	3	1	-	3	-	-	-	-	1	2	3	
3,5	-	-	4	-	-	-	-	-	3	1	-	2	-	-	-	-	1	1	1	
4	-	-	3	-	-	-	-	-	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
4,5	-	-	2	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	2	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
5,5	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6,5	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7,5	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

En contraste con lo sucedido con VEG, en la infección por RH se encuentran 2 proteínas que alcanzan estos niveles máximos de expresión a las 22 horas

de infección e incluso hay una que alcanza un incremento de 5.5 veces en este mismo lapso de tiempo (GRA 5), sin embargo, disminuye a poco menos de la mitad al alcanzar las 36 horas. Por otra parte, la infección por la cepa ME49 muestra 20 proteínas con un incremento de 1,5 FC en las primeras 36 horas y se identifica una con 7.5 FC a las 44 horas (LAG1); finalmente se destaca la proteína de los gránulos densos 32 (DG32) por ser la de mayor expresión de las 46 listadas, ya que incrementa 8 veces a las 8 horas de infección en *Homo sapiens* por la cepa GT1.

Debido a esta variabilidad en los niveles de expresión, las 3 proteínas con el mayor incremento en cada una de las 4 cepas durante el proceso infeccioso fueron seleccionadas para continuar el análisis (**Tabla 5**).

Tabla 5: Lista de las 3 proteínas de cada cepa de *Toxoplasma gondii* con mayor incremento en su expresión durante la infección. Se listan las 3 proteínas con mayor incremento expresado en FC: Fold Change. Asociando el momento en horas de infección en que la expresión de cada proteína alcanza su cenit.

Cepas	Proteínas	Máximo aumento	Horas de infección
GT1	DG32	8 FC	8 H
	GAPDH2	4.5 FC	8 H
	GRA5	4 FC	8H
VEG	MIC6	3.5 FC	16 H
	GRA5	3.5 FC	36 H
	Glyco-hydrolase	3.5 FC	44 H
RH	GRA5	5.5 FC	22 H
	ABC transporter	3.5 FC	22 H

	DG32	3 FC	22 H
ME49	LAG1	7.5 FC	44 H
	S1/P1 nuclease	5 FC	36 H
	SRS17B	3.5 FC	36 H

Se identificaron 9 proteínas que constituían el total de las 3 de mayor incremento por cada cepa, de las cuales se destacaban GRA 5, que incrementó sus niveles de expresión en tres de las cuatro cepas, con excepción de la cepa ME49, y DG32 que cuenta con un FC elevado tanto en GT1 como en RH. Posteriormente, se realizó un análisis del incremento de éstas 9 proteínas en las cepas en que no ocupaban los 3 primeros lugares de mayor elevación en FC (**Tabla 6**), y de esta evaluación se encontró que tanto DG 32 como GRA 5 tienen al menos 1.5 FC en las 4 cepas, seguidas por la nucleasa S1/P1, LAG1 y ADP-Ribosa glucohidrolasa que solo no se incrementan en GT1, aunque cabe resaltar que los ensayos con esta última cepa solo van hasta las 16 horas de infección y como estas 3 últimas proteínas tienen niveles elevados después de 36 a 44 horas en ME49 y VEG, se podría considerar que hay una posibilidad de que también se incrementen en GT1. Las otras 4 proteínas solo alcanzan incrementos en 1 o máximo 2 de las cepas como en el caso de GADPH2 y SRS17B, por lo que se descartaron para llevar a la predicción de péptidos que se puedan presentar por HLA-II.

Tabla 6: Incremento en la expresión de las 9 proteínas con mayor FC (Fold Change) durante la infección por 4 cepas de *Toxoplasma gondii* en su momento más alto (H: horas de infección). Se expone el máximo incremento alcanzado y el momento de la infección en que lo hacen las 9 proteínas listadas en la Tabla 5 en las cepas de *Toxoplasma gondii* en que no eran las de mayor FC.

	ME49	VEG	RH	GT1
--	------	-----	----	-----

Dense granule protein DG32	2 FC	44 H	1.5 FC	44 H	3 FC	22H	8 FC	8 H
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase GAPDH2	2 FC	36 H	-	-	-	-	4.5 FC	8 H
Dense granule protein GRA5	2 FC	44 H	3.5 FC	36 H	5.5 FC	22 H	4 FC	8 H
ABC transporter transmembrane region domain-containing protein	-	-	-	-	3.5 FC	22 H	-	-
Microneme protein MIC6	-	-	3.5 FC	16 H	-	-	-	-
Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	2 FC	44 H	3.5 FC	44 H	1.5 FC	2 H	-	-
Longevity-assurance protein (LAG1) domain- containing protein	7.5 FC	44 H	1.5 FC	2 H	1.5 FC	2 H	-	-
S1/P1nuclease	5 FC	36 H	1.5 FC	44 H	1.5 FC	2 H	-	-
SAG-related sequence SRS17B	3.5 FC	36 H	-	-	1.5 FC	36 H	-	-

5.2. Péptidos afines a los alelos seleccionados

Al utilizar la herramienta NetMHCIIIPAN 3.2 con las secuencias de aminoácidos de las 5 proteínas seleccionadas, se lograron identificar 8 péptidos de 15 aminoácidos con la capacidad de ser presentados por al menos 44.8% de los diferentes HLA-II DR β 1 prevalentes en cada grupo de alelos (**Tabla 7**). De éstos, únicamente el # 8 tiene una unión menor al 50% de los HLA, pero compensa con una unión fuerte (SB) al 39% de los alelos, porcentaje que es

mayor al obtenido para otros péptidos como 2, 3, 6 y 7, que se unen en total a un mayor número de alelos con mayor prevalencia en sus grupos respectivos.

Tabla 7: Péptidos predichos mediante NetMHCIIIPAN 3,2 que se unen los alelos HLA-II DRB1 seleccionados. Se listan los péptidos, proteína a la que pertenecen, porcentaje de alelos prevalentes al que se unen y afinidad con la que lo hacen (%SB: % de alelos con alta afinidad, %WB: % de alelos con baja afinidad, Total: porcentaje % de alelos con los que el péptido puede unirse).

Proteína (ID del gen y descripción del producto)		Péptidos (Número asignado y secuencia de aminoácidos)	%SB	% WB	Total
TGME49_240280 S1/P1nuclease	1	LKKRILLAGARVAIV	48.7	20.7	69.4
TGME49_283710 longevity-assurance protein (LAG1) domain-containing protein	2	ACFISLLLSPKLPDF	33.9	29.3	63.2
	3	ACLVIQSVGRLLQS	27.7	33.5	61.2
	4	SWGYLRLFAFPVAAL	50	11.7	61.7
TGME49_280380 poly(ADP-ribose) glycohydrolase	5	GNLYKAIQNALSRRS	39.6	19.9	59.5
	6	KTLIQWLAASYAGRS	29.7	28.1	57.8
TGME49_297880 dense granule protein DG32	7	LQIMQLSSSSARANA	10.3	43.4	53.7

TGME49_286450 dense granule protein GRA5	8	VVSLLRLLRRRRRRA	39	5.8	44.8
---	---	-----------------	----	-----	------

Por otra parte, al utilizar la herramienta BLASTp disponible en ToxoDB, para determinar si se conservaban las secuencias en las 11 cepas existentes en esta base de datos, se identificó que la mayoría se encontraban conservados, únicamente los péptidos 3 y 8 no aparecían conservados en todas las cepas. El 3 no presentó coincidencias únicamente con la cepa RUB, en cambio el péptido 8 sólo se conservaba en la cepa TgCatPRC2 (**Anexo4**).

5.3. Características fisicoquímicas y biológicas de los péptidos identificados

En la **Tabla 8** se encuentran algunas características de los péptidos listados previamente, obtenidas al utilizar la herramienta ProtParam, en general se puede evidenciar que la mayoría de los compuestos son inestables, poseen una vida media relativamente corta (menor a 10 horas) y no son marcadamente hidrofóbicos ni hidrofílicos. Por otra parte, con la evaluación utilizando AllerTop se identificó que el péptido 5 podría ser alérgeno debido a su similitud con la apolipoporina 3 y el péptido 7 por ser similar a la colina oxidasa.

Tabla 8: Características fisicoquímicas y biológicas de péptidos.

Péptidos	Estabilidad	Vida Media	Hidropatía (GRAVY)	Alergenicidad	Conservación
----------	-------------	------------	--------------------	---------------	--------------

1	LKKRILLAGARVAIV	Estable	5.5 horas	1.13	No	Si
2	ACFISLLLSPKLPDF	Inestable	4.4 horas	1.16	No	Si
3	ACLVIQSVGRLLQS	Inestable	4.4 horas	0.70	No	No
4	SWGYLRLFAPVAAL	Estable	1.9 horas	1.14	No	Si
5	GPLYKAIQNALSRRS	Inestable	30 horas	-0.73	Si	Si
6	KTLIQWLAASYAGRS	Inestable	1.3 horas	0.047	No	Si
7	LQIMQLSSSSARANA	Inestable	5.5 horas	0.080	Si	Si
8	VVSLLRLLRRRRRRA	Inestable	100 horas	-0.46	No	No

Finalmente, los péptidos 1, 2, 4 y 6, son los que cuentan con todas las características buscadas inicialmente, puesto que son conservados en las cepas cuya información genética hace parte de ToxoDB, están catalogados como posibles no alérgenos, son presentados por al menos 57.8% de los alelos, y provienen de las proteínas con péptido señal, dominios transmembrana que tenían el mayor incremento en su expresión durante la infección por 4 cepas de *Toxoplasma gondii* en fibroblastos humanos.

6. Discusión

La biología computacional ha sido utilizada previamente para la identificación de péptidos que induzcan respuesta inmune ante infecciones de diversos microorganismos como micobacterias, bacterias y virus ([Hassan et al. 2016](#), [Hossain et al. 2017](#), [Kalyanaraman et al. 2018](#)). Por su parte, *Toxoplasma gondii* también ha sido blanco de investigaciones que han permitido la identificación de epítopes con la capacidad de inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias reconocidas como claves en el control de la infección (IL-12, IFN- γ); sin embargo, dada la complejidad del sistema inmune,

no es posible obtener una respuesta completa con solo un pequeño fragmento proteico dirigido contra un receptor en particular como es el HLA-I, y se precisa el uso de ayuvantes (Cong et al. 2010, 2011, Cardona et al. 2015). Y si bien existe ya un péptido utilizado como adyuvante en este tipo de estudios por estar dirigido a la estimulación de linfocitos T CD4+, es importante considerar la identificación de epitopes propios de *Toxoplasma* para completar el estímulo al sistema inmune con un posible candidato vacunal, contemplando que de esta manera se logre una respuesta inflamatoria más concordante con la que caracteriza a la infección.

Por lo anterior, este proyecto utilizó diversas herramientas de biología computacional en el proceso de identificar proteínas y posteriormente péptidos de *Toxoplasma gondii* con afinidad a diferentes alelos del HLA-II. A diferencia de los virus, los organismos procariotas y eucariotas cuentan con un amplio repertorio de proteínas, y por esta razón es clave la selección de aquellas que por sus características tengan mayor probabilidad de ser reconocidas por el sistema inmune, para de esta manera evitar dificultades a la hora de establecer una respuesta

Actualmente, en el proceso de identificación de posibles candidatos vacúnales por medios bioinformáticos, la selección de proteínas a evaluar puede ser de dos maneras, la primera es utilizar las que ya estén descritas como potencialmente inmunógenas en experimentos previos y/o que tengan funciones importantes para la supervivencia del microorganismo en cuestión. Y la segunda, que fue la utilizada en el presente proyecto, consiste en seleccionar proteínas que sean secretadas o hagan parte de la superficie celular, ya que de esta manera hay más posibilidad de ser reconocidas y procesadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (Hossain et al 2017, He et al, 2010, Jagusztyń-Krynicka et al. 2009). Además, considerando que en el reconocimiento de antígenos por parte del HLA-II, los péptidos pasan por

un proceso en el que su número se ve ampliamente reducido por catepsinas y otras proteasas (Neefjes et al. 2013), se decidió además tener en cuenta los niveles de expresión de las mismas como criterio de selección.

Cabe resaltar que el procedimiento utilizado para la selección de proteínas se puede considerar más complejo, puesto que se necesita realizar trabajo extra en la búsqueda de las mismas por que se parte desde cero; a diferencia de cuando se inicia con proteínas que ya previamente se han descrito como importantes para el microorganismo a estudiar, ya sea por ser parte del proceso infeccioso o por tener inmunogenicidad demostrada (Cong et al. 2010, Khare et al. 2016, Yassin et al. 2016).

Para seleccionar las proteínas de las que se buscarían epitopes afines a HLA-II, se consideraron como características importantes la presencia de péptido señal en las proteínas, dado que es éste el que orienta la localización final de la mayoría de las proteínas que lo poseen, y la presencia de dominios transmembrana, puesto que estos también sirven de localización, incluso cuando la proteína no dispone de péptido señal e indican alta probabilidad de que se establezcan en la superficie (Crane et al. 2017, Staudt et al. 2016). Y para llevar a cabo dicha selección, se utilizó la base de datos ToxoDB, ya que cuenta con la información genómica y proteómica de las 11 cepas de *Toxoplasma gondii* secuenciadas hasta el momento, además de otros microorganismos similares, y tiene las herramientas necesarias para registrar toda la información disponible acerca de características moleculares específicas que se desee conocer. De esta manera se obtuvo 7717 posibles candidatos para mayor análisis de los cuales se sustrajeron 1089 por ser hipotéticos ya que se deseaba trabajar con proteínas con expresión y función confirmadas.

Con el fin de disminuir este gran número de primeros candidatos, se decidió seleccionar las proteínas que más se expresaran en una infección por *Toxoplasma gondii* en células humanas, considerando que unos elevados niveles de expresión indican, no solo una alta probabilidad de tratarse de elementos importantes en la fisiología del organismo, si no también que sus niveles elevados podrían significar una mayor interacción con el sistema inmune, y por ende ser potenciales estimuladores de respuesta por parte del hospedero. Por esta razón, se utilizaron los datos disponibles en ToxoDB de 6 experimentos con 4 cepas diferentes que evaluaban los cambios de expresión en las proteínas mediante espectrometría de masas cuantitativa, durante la infección en fibroblastos humanos y permitía hacer comparaciones en diferentes intervalos de tiempo disponibles para analizar en cada uno (**Tabla 1**) ([Datos de ToxoDB sin publicaciones asociadas](#)).

En total se identificaron 46 proteínas con péptido señal y dominios transmembrana que incrementaban su cuantía (FC) al menos 1.5 veces (**Anexo 2**), en las que se observó variabilidad considerable entre cepas, en cuanto a que las proteínas que incrementaban no lo hacían por igual en las 4 evaluadas, ya que muchas de estas no aumentaban en la misma cantidad o en similar intervalo de tiempo (**Tabla 4**). Por otra parte, las proteínas que alcanzaban los más altos niveles de expresión tendían a disminuir con el paso del tiempo, ya que ninguna conservaba su FC máximo hasta el final del experimento. Estas diferencias descritas en la expresión proteica de las 4 cepas que hacen parte de los estudios, son compatibles con el comportamiento en la infección que presenta cada una, en cuanto no todas tienen la misma virulencia ([Rico et al. 2016](#), [Xiao et al. 2015](#)). Es importante notar, que pese a la gran cantidad de candidatos previos al incorporar este último criterio, los resultados se ven marcadamente reducidos, lo que sugeriría que se requieren más estudios para corroborar si el incremento en la expresión

de las proteínas inicialmente identificadas o es muy discreto o se da más adelante en la infección.

Entre las 46 proteínas identificadas se destacan varias provenientes de sus tres organelos secretores: micronemas, roptrias, y gránulos densos. Los primeros suelen dar inicio al proceso de unión entre el parásito y la célula hospedera al liberar su contenido, y los segundos, se les ha atribuido la función de secretar proteínas encargadas de formar la vacuola parasitófora, interfiriendo así con la respuesta inmune del hospedero. Por su parte, a las secretadas por los gránulos densos se les ha descrito la capacidad no solo de modificar el ambiente dentro de la vacuola, sino también de alterar la expresión genética de las células que invade el parásito ([Hakimi et al. 2017](#), [Nam et al. 2009](#), [Sheiner et al. 2010](#)).

Por otra parte, en este grupo de proteínas también se identificaron múltiples asociadas a antígenos de superficie que previamente se han descrito con la capacidad de mediar en la interacción entre *Toxoplasma* y el hospedero, no solo durante la invasión del parásito, sino también en el proceso de reconocimiento inmunológico como las provenientes de roptrias, micronemas y granulos densos. Por tal razón, se han considerado como importantes en el proceso de control de la infección y en el diagnóstico de la misma cuando son utilizadas en pruebas serológicas ([Alibakhski et al. 2017](#)).

Al realizar la selección de las 9 proteínas producto de las 3 más expresadas por cada cepa, se encontró que estas pertenecían a los mismos grupos mayoritarios descritos previamente (**Tabla 5**), 2 proteínas fueron provenientes de gránulos densos (GRA 5 [TGME49_286450] y DG 32 [TGME49_297880]), una de micronemas (MIC 6 [TGME49_218520]), 2 del metabolismo de carbohidratos (Poli-(ADP ribosa)-glicohidrolasa [TGME49_280380], GAPDH2 [TGME49_269190]), 1 del metabolismo de ADN (Nucleasa S1/P1

[TGME49_240280]) y 3 constitutivas de la membrana (LAG1 [TGME49_283710], ABC transporter [TGME49_209190] y SRS17B [TGME49_319350]), siendo la última también asociada a antígeno de superficie ([Datos de ToxoDB sin publicaciones asociadas](#)). Por esto, se puede considerar que las razones por las que se decidió seleccionar las proteínas, tienen coherencia con hallazgos previos en los que se describe que estas juegan papeles importantes tanto en el proceso infeccioso del parásito, como en la respuesta inmune contra éste ([Hakimi et al. 2017](#), [Nam et al. 2009](#), [Sheiner et al. 2010](#)), y por ende se pueden considerar resultados con potencial para el proceso de búsqueda de péptidos inmunogénicos.

Pese a lo anterior, solo las 2 proteínas de los gránulos densos conservaban la expresión elevada en las 4 cepas, aunque no en la misma cuantía, y solo 3 proteínas tuvieron un aumento de FC en 3 de las cepas que hacían parte de los estudios (**Tabla 6**). La variabilidad observada desde elevaciones moderadas en las cuantías proteicas, además de ser compatible con las virulencias diferentes entre cepas, también podrían significar que las funciones de las que no están preservadas sean reemplazadas por otras ([Frenal et al. 2015](#)), o que su elevación se dé más adelante en la infección y esta fue la razón por lo que las últimas 3 proteínas mencionadas (Poli-(ADP ribosa)-glicohidrolasa, LAG1 y Nucleasa (S1/P1) fueron utilizadas para la selección de péptidos, pese a que no aumentaban su expresión en el experimento con GT1 que solo tenía un seguimiento de 16 horas.

Por otro lado, la selección de los 118 alelos del HLA-DR β 1 utilizados para la predicción de péptidos, se llevó a cabo mediante un diccionario provisto por el Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC (**Anexo 1**), ya que al revisar datos descritos localmente hay información muy variable y no del todo extrapolable, donde lo más frecuente es que se describa la distribución de los alelos de acuerdo a una patología. Por ejemplo, un meatanálisis del 2007 muestra que

en pacientes de Latinoamérica con artritis reumatoide los alelos más frecuentes hacen parte del grupo de alelos HLA-DRB1 04. Así mismo, un reporte del 2008 en el que describían los más asociados a lupus arrojó que el alelo 03:01 tenía mayor frecuencia ([Castaño et al. 2008](#), [Delgado et al. 2007](#)).

Sin embargo, estos hallazgos no aportan la información necesaria para determinar los alelos presentes en la población en general y más si se consideran publicaciones locales como la de [Arnaiz et al. 2018](#), en la que describen que en la población barranquillera los alelos de mayor frecuencia superan únicamente el 4% (DRB1 01:01, DRB1 03:01, DRB1 04:01, DRB1 07:01, DRB1 13:01 y DRB1 15:01). Por esta razón, se optó por utilizar la información aportada por la FIDIC, ya que gracias a su concordancia con la lista de los alelos de DRB1 más reportados en la base de datos [allelefreqencies.net](#) (**Tabla 3**), indica que utilizar esta herramienta permite lograr una cobertura de gran parte de la población al seleccionar los alelos que están potencialmente expresados en más del 50% de los individuos, existiendo además la posibilidad de que este número pueda llegar a ser mayor si se tiene en cuenta que cada individuo cuenta con 2 alelos.

Para la predicción de péptidos con afinidad por los alelos de HLA-II DRβ1 seleccionados, se utilizó la herramienta NetMHCIIIPAN 3.2 debido a que no solo se actualiza constantemente comparando sus algoritmos con los resultados de experimentos *in vitro* y ha mostrado resultados superiores a otras herramientas bioinformáticas con la misma función, sino también cuenta con una plataforma de fácil utilización con la mayoría de los alelos en sus listas y la posibilidad de adicionar los alelos restantes en formato FASTA, lo cual da más seguridad con respecto a otras herramientas incluyendo antiguas versiones de la misma, considerando la dificultad en realizar predicciones de unión a este HLA con respecto al HLA-I, por su bolsillo abierto, la interacción

del péptido con la molécula por fuera del mismo y la gran variedad de alelos existentes ([Jensen et al. 2018](#), [Neeffjes et al. 2013](#)).

Una vez obtenidos los péptidos candidatos, se destaca que pese al gran número de alelos utilizados como objetivos para la predicción, cada proteína tuvo por lo menos 1 péptido con posible cobertura de al menos el 44% de los alelos de cada grupo (Tabla 6), siendo el de mayor cobertura el péptido 1 y el de menor el péptido 8; aunque también cabe resaltar que el de mayor cobertura con unión fuerte fue el péptido 4, que también tuvo una cobertura de unión débil de 11.7%. Esto permite suponer que *Toxoplasma gondii* puede tener múltiples proteínas con el potencial de ser reconocidas por un determinado número de alelos de HLA-II, lo que se puede relacionar con el hecho de que en todas las poblaciones existan individuos con la capacidad de establecer una respuesta inmune sólida contra la infección, atribuyendo ésta al adecuado reconocimiento de diversos epitopes del parásito por parte de su sistema inmunológico. Además, si bien no existen publicaciones acerca de algún alelo de HLA-II en particular que se asocie a diferentes desenlaces en la infección por *Toxoplasma gondii*, sí se ha descrito que el parásito disminuye la expresión de estas proteínas en las células que infecta ([Leroux et al. 2015](#)); lo cual significaría que los desenlaces adversos dependen más de las capacidades del microorganismo que de un problema de reconocimiento.

Otro hallazgo importante aparte de la disponibilidad de péptidos con amplia cobertura de HLA-II DRB1, es la similitud entre la afinidad que suele haber en un mismo grupo de alelos, dado que la ausencia de posibilidad de unión, o la fuerza de ésta en caso de existir tiende a preservarse (**Anexo3**). Por ejemplo, para el péptido 1 la unión a todos los alelos de grupo HLA-DRB1_01 es fuerte y la unión a los del grupo HLA-DRB1_03 es débil y solo en el grupo HLA-DRB1_04 se observa más variabilidad entre la intensidad de la fuerza de unión. Esto indicaría que los péptidos que tienen una amplia cobertura para

los alelos utilizados muy probablemente también tengan un elevado potencial de unión a los que no fueron tomados en cuenta para la predicción.

Los péptidos finalmente seleccionados fueron 1, 2, 4 y 6 siendo este último el único con una cobertura menor al 60% (**Tabla 7**); ya que tanto el péptido 3 como el 8 no estaban conservados en todas las cepas y esto restaría su utilidad, puesto que contrario a lo conocido anteriormente en que se consideraban que la mayoría de las infecciones eran causadas por 3 cepas en particular, el reconocimiento actual de la gran variedad de cepas infectantes de *Toxoplasma gondii*, sugiere la necesidad de identificar la conservación por lo menos en las 11 cepas disponibles en ToxoDB de un péptido para el que se considere su futuro uso en una posible inmunización. Sin embargo, existen estudios de predicción de epitopes con el fin de lograr inmunización para diferentes patógenos en los que postulan el potencial que tiene la utilización de varios péptidos predichos ([Kashyap et al. 2017](#), [Swetha et al. 2016](#), [Yin et al. 2016](#)); lo cual deja abierta la opción de utilizar estos dos péptidos no conservados en caso de que a futuro se pruebe *in vitro* su capacidad inmunogénica.

Por otra parte, los péptidos 5 y 7 descritos con un potencial alergénico según la herramienta AlerTOP 2.0 que utiliza 2427 alérgenos conocidos de diferentes especies y clasifican una proteína problema como alérgeno o no dependiendo si hay similitud con las moléculas previamente identificadas como tal. Si bien son retirados de los candidatos seleccionados por esta posibilidad, cabe considerar que la respuesta inmune que se podría desencadenar por ellos, en caso de presentarse durante la infección por el parásito, sería considerada como respuesta inflamatoria normal durante la misma. Y dado el caso de que se logre identificar una buena presentación por HLA-II, no se pueden descartar del todo para futuros estudios.

En cuanto a las características fisicoquímicas encontramos que tanto el péptido 1 como el 4 tienen una predicción de estabilidad *in vitro* según el la herramienta ProtParam [<https://web.expasy.org/protparam/>] (Gasteiger et al 2005), que los hace candidatos apropiados para posibles pruebas que se deseen llevar a cabo; contrario a esto, el hecho de que la vida media de la mayoría de los péptidos sea menor a 6 horas podría representar dificultades en su utilización y se pueden precisar concentraciones más altas o la adición de secuencias en los extremos y así disminuir su degradación, con el fin de lograr un adecuado tiempo de exposición de los péptidos a las células de un hipotético experimento inicial para confirmar su inmunogenicidad.

Finalmente, el proceso llevado a cabo arrojó varias secuencias peptídicas con un potencial de unión a un amplio porcentaje de alelos del HLA-DRB1, lo cual significa la obtención de información importante para continuar experimentos a futuro en aras de obtener el desarrollo de una vacuna basada en péptidos contra *T. gondii*. Para esta última ya se han hallado diversos componentes por medios bioinformáticos y experimentales, como péptidos específicos para activar la respuesta celular mediada por linfocitos T CD8 y adyuvantes que estimulan los receptores tipo Toll, los cuales se podrían complementar con los péptidos seleccionados en el presente trabajo, con el fin de obtener una respuesta inmune más completa, que incluya los linfocitos T CD4+ (Goodswen et al. 2014, El Bissati et al. 2014, Cardona et al. 2015, Chen et al. 2013, Wang et al. 2011, Duquesne et al. 1991, Torres et al. 2014). Y si bien se han descrito experimentos fallidos luego de hacer predicciones por estas herramientas (Schmidt et al. 2017), la continua actualización de estos métodos compensa progresivamente sus falencias y sus aciertos permiten considerar el hecho de continuar llevando a cabo experimentos para confirmar estos resultados.

7. Conclusión

En este estudio, utilizando una estrategia racional se lograron identificar 4 péptidos de *Toxoplasma gondii* con una afinidad a al menos el 57.8% de los alelos prevalentes en cada grupo de HLA-II DR β 1, conservados en las cepas disponibles en ToxoDB, posibles no alérgenos y provenientes de proteínas con péptido señal y dominios transmembrana con el mayor incremento en su expresión durante la infección *in vitro* de 4 cepas de *Toxoplasma gondii* en fibroblastos humanos.

8. Bibliografia

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., ... & Heiss, A. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429-514.
- Alexander J, Sidney J, Southwood S, Ruppert J, Oseroff C, Maewal A, Snoke K, Serra HM, Kubo RT, Sette A, Grey HM. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity*. 1994 Dec 1;1(9):751-61.
- Alibakhshi A, Bandehpour M, Kazemi B. Cloning, expression and purification of a polytopic antigen comprising of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Iranian journal of microbiology*. 2017 Aug;9(4):251.

- Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2015 Oct 29;32(4):511-7.
- Arnaiz-Villena A, Bayona B, Palacio-Gruber J, Hernández E, Muñiz E, Campos C, Juarez I, Gomez-Casado E, Martín-Villa JM, Silvera C. HLA genes in Barranquilla (North Colombia): Searching for cryptic Amerindian genes. *Human immunology*. 2018 Jan 1;79(1):3-4.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, De Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*. 2012 May 31;40(W1):W597-603.
- Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic acids research*. 2008 Oct 28;37(suppl_1):D539-43.
- Bhadra R, Gigley JP, Khan IA. The CD8 T-cell road to immunotherapy of toxoplasmosis. *Immunotherapy*. 2011 Jun;3(6):789-801.
- Bollani L, Strocchio L, Stronati M. Congenital toxoplasmosis. *Early Human Development*. 2013 Oct 1;89:S70-2.
- Bordner AJ, Mittelman HD. MultiRTA: A simple yet reliable method for predicting peptide binding affinities for multiple class II MHC allotypes. *BMC bioinformatics*. 2010 Dec;11(1):482.
- Botero D, Restrepo M. Toxoplasmosis. En: Botero D, Restrepo M. *Parasitosis Humanas*. 5ª ed. Medellín: CIB; 2012. p. 351 – 384.
- Butler NS, Harris TH, Blader IJ. Regulation of immunopathogenesis during Plasmodium and Toxoplasma infections: more parallels than distinctions?. *Trends in parasitology*. 2013 Dec 1;29(12):593-602.

- Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2013 Jan;41(1):95-108.
- Cardona NI, Moncada DM, Gómez-Marin JE. A rational approach to select immunogenic peptides that induce IFN- γ response against *Toxoplasma gondii* in human leukocytes. *Immunobiology*. 2015 Dec 1;220(12):1337-42.
- Castaño-Rodríguez N, Diaz-Gallo LM, Pineda-Tamayo R, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*. 2008 Feb 1;7(4):322-30.
- Chen J, Zhou DH, Li ZY, Petersen E, Huang SY, Song HQ, Zhu XQ. *Toxoplasma gondii*: protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis. *Experimental parasitology*. 2014 Apr 1;139:42-8.
- Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, Maewal A, McLeod R. 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*. 2010 Dec;6(1):12.
- Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, Maewal A, McLeod R. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A* 0201. *Vaccine*. 2011 Jan 17;29(4):754-62.
- Crane JM, Randall LL. The Sec system: protein export in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2017 Nov;7(2).
- Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT,

Gazzinelli RT. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *The journal of immunology*. 2007 Jul 15;179(2):1129-37.

- Delgado-Vega AM, Anaya JM. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2007 Jun 1;6(6):402-8.
- Dimitrov I, Bangov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP v. 2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of molecular modeling*. 2014 Jun 1;20(6):2278.
- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International journal for parasitology*. 2009 Jul 1;39(8):895-901.
- Duquesne V, Auriault C, Gras-Masse H, Boutillon C, Darcy F, Cesbron-Delauw MF, Tartar A, Capron A. Identification of T cell epitopes within a 23-kD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. *Clinical and experimental immunology*. 1991 Jun;84(3):527.
- El Bissati K, Zhou Y, Dasgupta D, Cobb D, Dubey JP, Burkhard P, Lanar DE, McLeod R. Effectiveness of a novel immunogenic nanoparticle platform for *Toxoplasma* peptide vaccine in HLA transgenic mice. *Vaccine*. 2014 May 30;32(26):3243-8.
- González-Galarza FF, Takeshita LY, Santos EJ, Kempson F, Maia MH, Silva AL, Silva AL, Ghattaoraya GS, Alfirevic A, Jones AR, Middleton D. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic acids research*. 2014 Nov 20;43(D1):D784-8.
- Fereig RM, Nishikawa Y. Towards a preventive strategy for toxoplasmosis: current trends, challenges, and future perspectives for vaccine development. In *Vaccine Design 2016* (pp. 153-164). Humana Press, New York, NY.
- Fereig RM, Nishikawa Y. Towards a preventive strategy for toxoplasmosis: current trends, challenges, and future perspectives for

vaccine development. In *Vaccine Design 2016* (pp. 153-164). Humana Press, New York, NY.

- Frenal, K., & Soldati-Favre, D. (2015). Plasticity and redundancy in proteins important for *Toxoplasma* invasion. *PLoS pathogens*, *11*(8), e1005069.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*. 2012 Apr 1;25(2):264-96.
- Ge Y, Chen J, Qiu X, Zhang J, Cui L, Qi Y, Liu X, Qiu J, Shi Z, Lun Z, Shen J. Natural killer cell intrinsic toll-like receptor MyD88 signaling contributes to IL-12-dependent IFN- γ production by mice during infection with *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 2014 Jun 1;44(7):475-84.
- Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, Hieny S, Kelsall B, Trinchieri G, Sher A. NK cell-derived interferon- γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity*. 2012 Jun 29;36(6):1047-59.
- Gonzalez RM, Shehata H, O'connell MJ, Yang Y, Moreno-Fernandez ME, Chougnet CA, Aliberti J. *Toxoplasma gondii*-derived profilin triggers human toll-like receptor 5-dependent cytokine production. *Journal of innate immunity*. 2014;6(5):685-94.
- Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. Enhancing in silico protein-based vaccine discovery for eukaryotic pathogens using predicted peptide-MHC binding and peptide conservation scores. *PloS one*. 2014 Dec 29;9(12):e115745.
- Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clinical microbiology reviews*. 2017 Jul 1;30(3):615-45.
- Hassan A, Naz A, Obaid A, Paracha RZ, Naz K, Awan FM, Muhammad SA, Janjua HA, Ahmad J, Ali A. Pangenome and immuno-proteomics

analysis of *Acinetobacter baumannii* strains revealed the core peptide vaccine targets. *BMC genomics*. 2016 Dec;17(1):732.

- He Y, Rappuoli R, De Groot AS, Chen RT. Emerging vaccine informatics. *BioMed Research International*. 2011 Jun 15;2010.
- Hehl AB, Basso WU, Lippuner C, Ramakrishnan C, Okoniewski M, Walker RA, Grigg ME, Smith NC, Deplazes P. Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. *BMC genomics*. 2015 Dec;16(1):66.
- Henriquez FL, Woods S, Cong H, McLeod R, Roberts CW. Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design. *Trends in parasitology*. 2010 Nov 1;26(11):550-5.
- Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*. In *Foodborne Parasites 2018* (pp. 119-138). Springer, Cham.
- Hitziger N, Dellacasa I, Albiger B, Barragan A. Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cellular microbiology*. 2005 Jun;7(6):837-48.
- Hoffmann, S., Batz, M. B., & Morris Jr, J. G. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of food protection*, 75(7), 1292-1302
- Hossain M, Azad AK, Chowdhury PA, Wakayama M. Computational identification and characterization of a promiscuous T-cell epitope on the extracellular protein 85B of *Mycobacterium* spp. for peptide-based subunit vaccine design. *BioMed research international*. 2017; 2017.
- Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*. 2012 Nov;10(11):766.

- Jagusztyn-Krynicka EK, Roszczenko PA, Grabowska A. Impact of proteomics on anti-Myco**acterium tuberculosis** (MTB) vaccine development. *Polish journal of microbiology*. 2009 Jan 1;58(4):281-7.
- Jankovic D, Kugler DG, Sher A. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal immunology*. 2010 May;3(3):239.
- Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, Sette A, Peters B, Nielsen M. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018 Jul.
- Jordan KA, Hunter CA. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Experimental parasitology*. 2010 Nov 1;126(3):318-25.
- Kalyanaraman N. In silico prediction of potential vaccine candidates on capsid protein of human bocavirus 1. *Molecular immunology*. 2018 Jan 31;93:193-205.
- Kashyap M, Jaiswal V, Farooq U. Prediction and analysis of promiscuous T cell-epitopes derived from the vaccine candidate antigens of *Leishmania donovani* binding to MHC class-II alleles using in silico approach. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017 Sep 1;53:107-15.
- Khare P, Jaiswal AK, Tripathi CD, Sundar S, Dube A. Immunoprotective responses of T helper type 1 stimulatory protein-S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase against experimental visceral leishmaniasis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2016 Aug;185(2):165-79.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Kuby IMMUNOLOGY*. 6th ed. New York, USA: McGraw-Hill;2007.
- Leroux LP, Dasanayake D, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Jardim A, Dzierszinski FS. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. *International journal for parasitology*. 2015 Apr 1;45(5):319-32.

- Leroux LP, Nishi M, El-Hage S, Fox BA, Bzik DJ, Dzierszinski FS. Parasite Manipulation of the Invariant Chain and the Peptide Editor H2-DM Affects Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation during *Toxoplasma gondii* Infection. *Infection and immunity*. 2015 Oct 1;83(10):3865-80.
- Li Y, Zhou H. Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*. *Expert opinion on biological therapy*. 2018 Mar 4;18(3):273-80.
- Lu G, Wang L, Zhou A, Han Y, Guo J, Song P, Zhou H, Cong H, Zhao Q, He S. Epitope analysis, expression and protection of SAG5A vaccine against *Toxoplasma gondii*. *Acta tropica*. 2015 Jun 1;146:66-72.
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology*. 2004 May 14;338(5):1027-36.
- Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in retinal and eye research*. 2014 Mar 1;39:77-106.
- Mangen, M. J., Friesema, I. H. M., Haagsma, J. A., & Van Pelt, W. (2017). *Disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2016*
- Mashayekhi M, Sandau MM, Dunay IR, Frickel EM, Khan A, Goldszmid RS, Sher A, Ploegh HL, Murphy TL, Sibley LD, Murphy KM. CD8 α + dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity*. 2011 Aug 26;35(2):249-59.
- McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis?. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):320-44.
- Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma*

gondii by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010 Aug;14(4):346-50.

- Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 2009 Jan 1;39(1):23-39.
- Montoya JG, Liesenfeld O. *Toxoplasmosis* *Lancet*. 2004; 363: 1965–1976. doi: 10.1016. S0140-6736 (04).
- Mordue DG, Hunter CA. Innate Immunity to *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma Gondii (Second Edition)* 2014 (pp. 797-817).
- Nam HW. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *The Korean journal of parasitology*. 2009 Oct;47(Suppl):S29.
- Neefjes J, Ovaas H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nature chemical biology*. 2013 Dec;9(12):769.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME. *Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. *International journal for parasitology*. 2009 Oct 1;39(12):1385-94.
- Park YH, Nam HW. Clinical features and treatment of ocular toxoplasmosis. *The Korean journal of parasitology*. 2013 Aug;51(4):393.
- Rico-Torres CP, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016 Jul 1;35(7):1079-88.
- Roberts CW, Gazzinelli RT, Khan IA, Nowakowska D, Esquivel A, Mcleod R. Adaptive immunity and genetics of the host immune response. In *Toxoplasma gondii 2007* (pp. 609-720).
- Rojas OL, Rojas-Villarraga A, Cruz-Tapias P, Sánchez JL, Suárez-Escudero JC, Patarroyo MA, Anaya JM. HLA class II polymorphism in

Latin American patients with multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2010 Apr 1;9(6):407-13.

- Roozbehani, M., Falak, R., Mohammadi, M., Hemphill, A., Razmjou, E., reza Meamar, A., ... & Gharavi, M. J. (2018). Characterization of a multi-epitope peptide with selective MHC-binding capabilities encapsulated in PLGA nanoparticles as a novel vaccine candidate against *Toxoplasma gondii* infection. *Vaccine*, 36(41), 6124-6132.
- Sanecka A, Frickel EM. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. *Virulence*. 2012 Nov 15;3(7):678-89.
- Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014 Oct 1;304(7):917-29.
- Schmidt J, Guillaume P, Dojcinovic D, Karbach J, Coukos G, Luescher I. In silico and cell-based analyses reveal strong divergence between prediction and observation of T cell recognized tumor antigen T cell epitopes. *Journal of Biological Chemistry*. 2017 May 23:jbc-M117.
- Rajapakse S, Chrishan Shivanthan M, Samaranayake N, Rodrigo C, Deepika Fernando S. Antibiotics for human toxoplasmosis: a systematic review of randomized trials. *Pathogens and global health*. 2013 Jun 1;107(4):162-9.
- Sepúlveda-Arias JC, Gómez-Marin JE, Bobić B, Naranjo-Galvis CA, Djurković-Djaković O. Toxoplasmosis as a travel risk. *Travel medicine and infectious disease*. 2014 Nov 1;12(6):592-601.
- Sette A, Fikes J. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Current opinion in immunology*. 2003 Aug 1;15(4):461-70.
- Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini F, Jemmely N, Friedrich N, Ward GE, Soldati-Favre D. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Molecular microbiology*. 2010 Aug;77(4):912-29.

- Palmulli R, van Niel G. To be or not to be... secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis. *Essays in biochemistry*. 2018 May 15;62(2):177-91.
- Pleyer U, Schlüter D, Mänz M. Ocular toxoplasmosis: Recent aspects of pathophysiology and clinical implications. *Ophthalmic Res*. 2014;52(3):116–23.
- Swetha RG, Sandhya M, Ramaiah S, Anbarasu A. Identification of CD4+ T-cell epitope and investigation of HLA distribution for the immunogenic proteins of *Burkholderia pseudomallei* using in silico approaches—A key vaccine development strategy for melioidosis. *Journal of theoretical biology*. 2016 Jul 7;400:11-8.
- Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, Sidney J, Alexander J, Sette A, Grigg ME, Maewal A. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine*. 2010 May 21;28(23):3977-89.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*. 2000 Nov 1;30(12-13):1217-58.
- Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*. 2013;91:501-8.
- Torres-Morales E, Taborda L, Cardona N, De-la-Torre A, Sepulveda-Arias JC, Patarroyo MA, Gomez-Marin JE. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. *Medical microbiology and immunology*. 2014 Oct 1;203(5):315-22.
- Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, Wheeler DK, Sette A, Peters B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Research*. 2018 Oct 24.
- Wang Y, Wang M, Wang G, Pang A, Fu B, Yin H, Zhang D. Increased survival time in mice vaccinated with a branched lysine multiple

antigenic peptide containing B-and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens. *Vaccine*. 2011 Nov 3;29(47):8619-23.

- Woodhall D, Jones JL, Cantey PT, Wilkins PP, Montgomery SP. Neglected parasitic infections: what every family physician needs to know. *Am Fam Physician*. 2014 May 15;89(10):803-11.
- Xiao J, Yolken RH. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiologica*. 2015 Apr;213(4):828-45.
- Yap GS, Shaw MH, Ling Y, Sher A. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes and infection*. 2006 Apr 1;8(4):1174-8.
- Yassin GM, Amin MA, Attia AS. Immunoinformatics Identifies a Lactoferrin binding protein a peptide as a promising vaccine with a global protective prospective against *Moraxella catarrhalis*. *The Journal of infectious diseases*. 2016 Feb 10;213(12):1938-45.
- Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature Reviews Immunology*. 2014 Feb;14(2):109.
- Yarovinsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 2006 Mar 1;36(3):255-9.
- Yin D, Li L, Song D, Liu Y, Ju W, Song X, Wang J, Pang B, Xu K, Li J. A novel recombinant multi-epitope protein against *Brucella melitensis* infection. *Immunology letters*. 2016 Jul 1;175:1-7.
- Zhang TE, Yin LT, Li RH, Wang HL, Meng XL, Yin GR. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T- and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. *Parasites & vectors*. 2015 Dec;8(1):15.

9. Anexos

Anexo 1: Diccionario de alelos de HLA-II DR β 1 provisto por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC, donde figuran varias tablas con la misma distribución. Contenido en columnas de izquierda a derecha: La primera columna muestra el grupo de alelos de HLA-II DR β 1, seguido por la lista de alelos en particular y luego la prevalencia de cada alelo dentro de su grupo. Finalmente, los recuadros rojos contienen los alelos seleccionados para la predicción de péptidos.

		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*01	HLA-DRB1*010101
HLA-DRB1*010201	14.9		
HLA-DRB1*0104	2.3		
HLA-DRB1*0109	2.3		
HLA-DRB1*0153	1.1		
HLA-DRB1*0157	1.1		
HLA-DRB1*0142	1.1		
HLA-DRB1*0123	1.1		
HLA-DRB1*0143	1.1		
HLA-DRB1*0126	1.1		
HLA-DRB1*0113	1.1		
HLA-DRB1*0103	1.1		
HLA-DRB1*0151	1.1		
HLA-DRB1*0110	1.1		
HLA-DRB1*0116	1.1		
HLA-DRB1*0112	1.1		
HLA-DRB1*0121	1.1		
HLA-DRB1*0107	1.1		
HLA-DRB1*0149	1.1		
HLA-DRB1*0114	1.1		
HLA-DRB1*0156	1.1		
HLA-DRB1*0137	1.1		
HLA-DRB1*0108	1.1		
HLA-DRB1*0122	1.1		
HLA-DRB1*0117	1.1		
HLA-DRB1*0155	1.1		
HLA-DRB1*0129	1.1		
HLA-DRB1*0106	1.1		
HLA-DRB1*0158	1.1		

		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*03	HLA-DRB1*03010101
HLA-DRB1*030201	5.3		
HLA-DRB1*030501	4.4		
HLA-DRB1*0325	2.6		
HLA-DRB1*0357	1.8		
HLA-DRB1*0340	1.8		
HLA-DRB1*0326	1.8		
HLA-DRB1*031301	1.8		
HLA-DRB1*030401	1.8		
HLA-DRB1*0320	0.9		
HLA-DRB1*0348	0.9		
HLA-DRB1*0335	0.9		
HLA-DRB1*0317	0.9		
HLA-DRB1*0327	0.9		
HLA-DRB1*0388	0.9		
HLA-DRB1*0338	0.9		
HLA-DRB1*0381	0.9		
HLA-DRB1*0324	0.9		
HLA-DRB1*0321	0.9		
HLA-DRB1*0307	0.9		
HLA-DRB1*0349	0.9		
HLA-DRB1*0303	0.9		
HLA-DRB1*0370	0.9		
HLA-DRB1*0376	0.9		
HLA-DRB1*0384	0.9		
HLA-DRB1*031101	0.9		
HLA-DRB1*0387	0.9		
HLA-DRB1*0342	0.9		
HLA-DRB1*0369	0.9		
HLA-DRB1*0386	0.9		
HLA-DRB1*0360	0.9		
HLA-DRB1*0343	0.9		
HLA-DRB1*0330	0.9		
HLA-DRB1*0371	0.9		
HLA-DRB1*0310	0.9		
HLA-DRB1*0312	0.9		
HLA-DRB1*0379	0.9		
HLA-DRB1*0344	0.9		
HLA-DRB1*0351	0.9		
HLA-DRB1*0356	0.9		

		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*04	HLA-DRB1*040101
	HLA-DRB1*040501	13	
	HLA-DRB1*040301	11	
	HLA-DRB1*040401	7.7	
	HLA-DRB1*040201	3.8	
	HLA-DRB1*040601	3.8	
	HLA-DRB1*040701	2.9	
	HLA-DRB1*040801	2.4	
	HLA-DRB1*0415	1.4	
	HLA-DRB1*0418	1.4	
	HLA-DRB1*041001	1.4	
	HLA-DRB1*041101	1.4	
	HLA-DRB1*04132	1	
	HLA-DRB1*0410501	1	
	HLA-DRB1*0409	1	
	HLA-DRB1*049801	1	
	HLA-DRB1*041701	1	
	HLA-DRB1*04122	1	
	HLA-DRB1*04100	1	
	HLA-DRB1*0427	0.5	
	HLA-DRB1*04106	0.5	
	HLA-DRB1*0447	0.5	
	HLA-DRB1*0482	0.5	
	HLA-DRB1*0454	0.5	
	HLA-DRB1*0486	0.5	
	HLA-DRB1*04139	0.5	
	HLA-DRB1*04155	0.5	
	HLA-DRB1*0466	0.5	
	HLA-DRB1*04113	0.5	
	HLA-DRB1*0421	0.5	
	HLA-DRB1*0462	0.5	
	HLA-DRB1*0434	0.5	
	HLA-DRB1*0464	0.5	
	HLA-DRB1*04140	0.5	
	HLA-DRB1*04128	0.5	
	HLA-DRB1*04141	0.5	
	HLA-DRB1*0490	0.5	
	HLA-DRB1*04152	0.5	
	HLA-DRB1*0477	0.5	
	HLA-DRB1*0419	0.5	
	HLA-DRB1*0484	0.5	
	HLA-DRB1*0457	0.5	
	HLA-DRB1*04102	0.5	
	HLA-DRB1*0420	0.5	
	HLA-DRB1*0431	0.5	
	HLA-DRB1*04103	0.5	

		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*04	HLA-DRB1*0448
	HLA-DRB1*0475	0.5	
	HLA-DRB1*0424	0.5	
	HLA-DRB1*0469	0.5	
	HLA-DRB1*04123	0.5	
	HLA-DRB1*04115	0.5	
	HLA-DRB1*04153	0.5	
	HLA-DRB1*0499	0.5	
	HLA-DRB1*04136	0.5	
	HLA-DRB1*0412	0.5	
	HLA-DRB1*0413	0.5	
	HLA-DRB1*0467	0.5	
	HLA-DRB1*04114	0.5	
	HLA-DRB1*0422	0.5	
	HLA-DRB1*0432	0.5	
	HLA-DRB1*0468	0.5	
	HLA-DRB1*04108	0.5	
	HLA-DRB1*04121	0.5	
	HLA-DRB1*0450	0.5	
	HLA-DRB1*0449	0.5	
	HLA-DRB1*0441	0.5	
	HLA-DRB1*0491	0.5	
	HLA-DRB1*04146	0.5	
	HLA-DRB1*0455	0.5	
	HLA-DRB1*04126	0.5	
	HLA-DRB1*0497	0.5	
	HLA-DRB1*0465	0.5	
	HLA-DRB1*0478	0.5	
	HLA-DRB1*04101	0.5	
	HLA-DRB1*04134	0.5	
	HLA-DRB1*0487	0.5	
	HLA-DRB1*04129	0.5	
	HLA-DRB1*0470	0.5	
	HLA-DRB1*0451	0.5	

		Allele prototype	
		Allele prototype	PPF
HLA - DRB1 * 07	HLA-DRB1*07010101	50	
	HLA-DRB1*0704	7.7	
	HLA-DRB1*0703	3.8	
	HLA-DRB1*0706	3.8	
	HLA-DRB1*0708	3.8	
	HLA-DRB1*0709	3.8	
	HLA-DRB1*0712	3.8	
	HLA-DRB1*0717	3.8	
	HLA-DRB1*0718	3.8	
	HLA-DRB1*0720	3.8	
	HLA-DRB1*0722	3.8	
	HLA-DRB1*0723	3.8	
	HLA-DRB1*0724	3.8	
	HLA - DRB1 * 08	HLA-DRB1*080101	30
HLA-DRB1*080201		14	
HLA-DRB1*080401		11	
HLA-DRB1*0805		2.9	
HLA-DRB1*0806		2.9	
HLA-DRB1*0812		2.9	
HLA-DRB1*0824		2.9	
HLA-DRB1*0834		2.9	
HLA-DRB1*0807		1.4	
HLA-DRB1*0808		1.4	
HLA-DRB1*0809		1.4	
HLA-DRB1*0811		1.4	
HLA-DRB1*0814		1.4	
HLA-DRB1*0815		1.4	
HLA-DRB1*0816	1.4		
HLA-DRB1*0819	1.4		
HLA-DRB1*0820	1.4		
HLA-DRB1*0821	1.4		
HLA-DRB1*0825	1.4		
HLA-DRB1*0829	1.4		
HLA-DRB1*0831	1.4		
HLA-DRB1*0832	1.4		
HLA-DRB1*0835	1.4		
HLA-DRB1*0840	1.4		
HLA-DRB1*0842	1.4		
HLA-DRB1*0846	1.4		
HLA-DRB1*0847	1.4		
HLA-DRB1*0849	1.4		
HLA-DRB1*0853	1.4		
HLA-DRB1 * 09	HLA-DRB1*090102	57	
	HLA-DRB1*090201	7.1	
	HLA-DRB1*0903	3.6	
	HLA-DRB1*0905	3.6	
	HLA-DRB1*0906	3.6	
	HLA-DRB1*0907	3.6	
	HLA-DRB1*0908	3.6	
	HLA-DRB1*0910	3.6	
	HLA-DRB1*0912	3.6	
	HLA-DRB1*0916	3.6	
	HLA-DRB1*0917	3.6	
	HLA-DRB1*0920	3.6	
	HLA-DRB1 * 10	HLA-DRB1*100101	43
		HLA-DRB1*1002	14
HLA-DRB1*1003		14	
HLA-DRB1*1004		14	
HLA-DRB1*1005		14	
HLA-DRB1 * 12	HLA-DRB1*120101	60	
	HLA-DRB1*121601	8.5	
	HLA-DRB1*120302	6.4	
	HLA-DRB1*1204	4.3	
	HLA-DRB1*1205	4.3	
	HLA-DRB1*1208	2.1	
	HLA-DRB1*1214	2.1	
	HLA-DRB1*1220	2.1	
	HLA-DRB1*1227	2.1	
	HLA-DRB1*1228	2.1	
	HLA-DRB1*1232	2.1	
	HLA-DRB1*1236	2.1	
	HLA-DRB1*1238	2.1	

		Allele prototype	PPF
		HLA - DRB 1 * 11	HLA-DRB1*110101
HLA-DRB1*110401	15		
HLA-DRB1*110201	6.2		
HLA-DRB1*110601	2.6		
HLA-DRB1*111101	2.6		
HLA-DRB1*111001	2.1		
HLA-DRB1*11105	2.1		
HLA-DRB1*11113	2.1		
HLA-DRB1*1109	1.5		
HLA-DRB1*1123	1.5		
HLA-DRB1*11119	1		
HLA-DRB1*11122	1		
HLA-DRB1*11127	1		
HLA-DRB1*111301	1		
HLA-DRB1*11136	1		
HLA-DRB1*11142	1		
HLA-DRB1*1116	1		
HLA-DRB1*1131	1		
HLA-DRB1*1144	1		
HLA-DRB1*114901	1		
HLA-DRB1*115401	1		
HLA-DRB1*1169	1		
HLA-DRB1*1173	1		
HLA-DRB1*1105	0.5		

		Allele prototype	PPF
		HLA - DRB 1 * 11	HLA-DRB1*1107
HLA-DRB1*11104	0.5		
HLA-DRB1*11108	0.5		
HLA-DRB1*11110	0.5		
HLA-DRB1*11114	0.5		
HLA-DRB1*11116	0.5		
HLA-DRB1*11120	0.5		
HLA-DRB1*11128	0.5		
HLA-DRB1*1122	0.5		
HLA-DRB1*1167	0.5		
HLA-DRB1*11131	0.5		
HLA-DRB1*11132	0.5		
HLA-DRB1*11135	0.5		
HLA-DRB1*11143	0.5		
HLA-DRB1*11144	0.5		
HLA-DRB1*1115	0.5		
HLA-DRB1*1117	0.5		
HLA-DRB1*1121	0.5		
HLA-DRB1*1124	0.5		
HLA-DRB1*1126	0.5		
HLA-DRB1*1129	0.5		
HLA-DRB1*1130	0.5		
HLA-DRB1*1132	0.5		
HLA-DRB1*1134	0.5		
HLA-DRB1*1147	0.5		
HLA-DRB1*1151	0.5		
HLA-DRB1*1152	0.5		
HLA-DRB1*1155	0.5		
HLA-DRB1*1159	0.5		
HLA-DRB1*1163	0.5		
HLA-DRB1*1170	0.5		
HLA-DRB1*1172	0.5		
HLA-DRB1*1176	0.5		
HLA-DRB1*1177	0.5		
HLA-DRB1*1179	0.5		
HLA-DRB1*1181	0.5		
HLA-DRB1*1183	0.5		
HLA-DRB1*1186	0.5		
HLA-DRB1*1187	0.5		
HLA-DRB1*1189	0.5		
HLA-DRB1*1191	0.5		
HLA-DRB1*1192	0.5		
HLA-DRB1*1195	0.5		
HLA-DRB1*1198	0.5		
HLA-DRB1*1199	0.5		

Allele prototype		PPF
HLA-DRB1*130101		19
HLA-DRB1*130201		11
HLA-DRB1*130301		7.5
HLA-DRB1*13118		5
HLA-DRB1*130701		4
HLA-DRB1*130501		3
HLA-DRB1*13149		2.5
HLA-DRB1*132301		2
HLA-DRB1*1304		1.5
HLA-DRB1*1308		1.5
HLA-DRB1*131101		1.5
HLA-DRB1*1313		1.5
HLA-DRB1*1389		1.5
HLA-DRB1*1306		1
HLA-DRB1*13107		1
HLA-DRB1*13115		1
HLA-DRB1*13116		1
HLA-DRB1*13119		1
HLA-DRB1*13139		1
HLA-DRB1*1315		1
HLA-DRB1*13156		1
HLA-DRB1*1319		1
HLA-DRB1*132601		1
HLA-DRB1*1327		1
HLA-DRB1*1332		1
HLA-DRB1*1378		1
HLA-DRB1*1309		0.5
HLA-DRB1*1310		0.5
HLA-DRB1*13100		0.5
HLA-DRB1*13101		0.5
HLA-DRB1*13102		0.5
HLA-DRB1*13103		0.5
HLA-DRB1*13104		0.5
HLA-DRB1*13106		0.5
HLA-DRB1*13108		0.5
HLA-DRB1*13110		0.5
HLA-DRB1*13121		0.5
HLA-DRB1*13124		0.5
HLA-DRB1*13129		0.5
HLA-DRB1*13133		0.5
HLA-DRB1*13136		0.5
HLA-DRB1*13141		0.5
HLA-DRB1*13143		0.5
HLA-DRB1*13144		0.5
HLA-DRB1*13145		0.5
HLA-DRB1*13146		0.5

HLA-DRB1*13

Allele prototype		PPF
HLA-DRB1*13147		0.5
HLA-DRB1*13151		0.5
HLA-DRB1*13152		0.5
HLA-DRB1*13159		0.5
HLA-DRB1*1316		0.5
HLA-DRB1*13160		0.5
HLA-DRB1*1331		0.5
HLA-DRB1*1334		0.5
HLA-DRB1*1337		0.5
HLA-DRB1*1338		0.5
HLA-DRB1*1339		0.5
HLA-DRB1*1341		0.5
HLA-DRB1*1343		0.5
HLA-DRB1*1344		0.5
HLA-DRB1*1345		0.5
HLA-DRB1*1346		0.5
HLA-DRB1*1347		0.5
HLA-DRB1*1354		0.5
HLA-DRB1*1358		0.5
HLA-DRB1*1360		0.5
HLA-DRB1*1362		0.5
HLA-DRB1*1364		0.5
HLA-DRB1*1367		0.5
HLA-DRB1*1368		0.5
HLA-DRB1*1376		0.5
HLA-DRB1*1377		0.5
HLA-DRB1*1381		0.5
HLA-DRB1*1384		0.5
HLA-DRB1*1385		0.5
HLA-DRB1*1386		0.5
HLA-DRB1*1387		0.5
HLA-DRB1*1398		0.5

HLA-DRB1*13

		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*140101	15
HLA-DRB1*140501	8.3		
HLA-DRB1*140301	3.8		
HLA-DRB1*1404	3.2		
HLA-DRB1*1414	3.2		
HLA-DRB1*140601	2.6		
HLA-DRB1*1408	1.9		
HLA-DRB1*1425	1.9		
HLA-DRB1*143201	1.9		
HLA-DRB1*1402	1.3		
HLA-DRB1*140701	1.3		
HLA-DRB1*1409	1.3		
HLA-DRB1*14100	1.3		
HLA-DRB1*14105	1.3		
HLA-DRB1*14107	1.3		
HLA-DRB1*1411	1.3		
HLA-DRB1*141201	1.3		
HLA-DRB1*1417	1.3		
HLA-DRB1*1463	1.3		
HLA-DRB1*1468	1.3		
HLA-DRB1*1410	0.6		
HLA-DRB1*14101	0.6		
HLA-DRB1*14102	0.6		
HLA-DRB1*14103	0.6		
HLA-DRB1*14104	0.6		
HLA-DRB1*14106	0.6		
HLA-DRB1*14109	0.6		
HLA-DRB1*14110	0.6		
HLA-DRB1*14111	0.6		
HLA-DRB1*14114	0.6		
HLA-DRB1*14115	0.6		
HLA-DRB1*14116	0.6		
HLA-DRB1*14119	0.6		
HLA-DRB1*14121	0.6		
HLA-DRB1*14124	0.6		
HLA-DRB1*14128	0.6		
HLA-DRB1*1413	0.6		
HLA-DRB1*14132	0.6		
HLA-DRB1*14133	0.6		
HLA-DRB1*14134	0.6		
HLA-DRB1*14136	0.6		
HLA-DRB1*1415	0.6		
HLA-DRB1*1416	0.6		
HLA-DRB1*1418	0.6		
HLA-DRB1*1419	0.6		
HLA-DRB1*1420	0.6		

		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*1421	0.6
HLA-DRB1*1422	0.6		
HLA-DRB1*1424	0.6		
HLA-DRB1*1428	0.6		
HLA-DRB1*1429	0.6		
HLA-DRB1*1431	0.6		
HLA-DRB1*1433	0.6		
HLA-DRB1*1434	0.6		
HLA-DRB1*1437	0.6		
HLA-DRB1*1439	0.6		
HLA-DRB1*1440	0.6		
HLA-DRB1*1441	0.6		
HLA-DRB1*1442	0.6		
HLA-DRB1*1446	0.6		
HLA-DRB1*1448	0.6		
HLA-DRB1*1449	0.6		
HLA-DRB1*1451	0.6		
HLA-DRB1*1452	0.6		
HLA-DRB1*1455	0.6		
HLA-DRB1*1456	0.6		
HLA-DRB1*1457	0.6		
HLA-DRB1*1458	0.6		
HLA-DRB1*1459	0.6		
HLA-DRB1*1462	0.6		
HLA-DRB1*1464	0.6		
HLA-DRB1*1465	0.6		
HLA-DRB1*1470	0.6		
HLA-DRB1*1471	0.6		
HLA-DRB1*1473	0.6		
HLA-DRB1*1475	0.6		
HLA-DRB1*1476	0.6		
HLA-DRB1*1477	0.6		
HLA-DRB1*1478	0.6		
HLA-DRB1*1481	0.6		
HLA-DRB1*1482	0.6		
HLA-DRB1*1484	0.6		
HLA-DRB1*1489	0.6		
HLA-DRB1*1491	0.6		
HLA-DRB1*1494	0.6		
HLA-DRB1*1495	0.6		
HLA-DRB1*1497	0.6		
HLA-DRB1*1499	0.6		

HLA-DRB1*15		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*15010101	55
HLA-DRB1*150201	16		
HLA-DRB1*15030101	4.7		
HLA-DRB1*1538	1.6		
HLA-DRB1*1527	1.6		
HLA-DRB1*1510	0.8		
HLA-DRB1*1512	0.8		
HLA-DRB1*1518	0.8		
HLA-DRB1*1521	0.8		
HLA-DRB1*1525	0.8		
HLA-DRB1*1528	0.8		
HLA-DRB1*1529	0.8		
HLA-DRB1*1530	0.8		
HLA-DRB1*1532	0.8		
HLA-DRB1*1533	0.8		
HLA-DRB1*1535	0.8		
HLA-DRB1*1536	0.8		
HLA-DRB1*1540	0.8		
HLA-DRB1*1544	0.8		
HLA-DRB1*1546	0.8		
HLA-DRB1*1554	0.8		
HLA-DRB1*1558	0.8		
HLA-DRB1*1560	0.8		
HLA-DRB1*1561	0.8		
HLA-DRB1*1566	0.8		
HLA-DRB1*1569	0.8		
HLA-DRB1*1571	0.8		
HLA-DRB1*1578	0.8		
HLA-DRB1*1582	0.8		
HLA-DRB1*1584	0.8		
HLA-DRB1*1591	0.8		
HLA-DRB1*1592	0.8		

HLA-DRB1*16		Allele prototype	PPF
		HLA-DRB1*160101	64
HLA-DRB1*1604	8		
HLA-DRB1*1615	8		
HLA-DRB1*1603	4		
HLA-DRB1*1608	4		
HLA-DRB1*1611	4		
HLA-DRB1*1612	4		
HLA-DRB1*1614	4		

Anexo 2: Lista de proteínas de las diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* con un incremento en su expresión mayor a 1.5 veces (FC: fold change) en las primeras 44 horas de infección en humanos y grupos funcionales y/o estructurales al que pertenecen. En la columna derecha se muestra el máximo FC alcanzado por cada proteína.

Membrana	
ID del gen/descripción del producto.	Máximo FC alcanzado
TGME49_208370 myosin heavy chain, putative	1.5
TGME49_209190 ABC transporter transmembrane region domain-containing protein	3.5
TGME49_214080 toxofilin	1.5
TGME49_215490 transporter, major facilitator family protein	2
TGME49_219320 acid phosphatase G	1.5
TGME49_238100 transmembrane protein	1.5
TGME49_239890 SCP family extracellular subfamily protein	3
TGME49_258950 lectin family protein	1.5
TGME49_269980 preprotein translocase Sec61, putative	3
TGME49_283710 longevity-assurance protein (LAG1) domain-containing protein	7.5
TGME49_290160 sortilin, putative	2
TGME49_292280 sAG-related sequence SRS36D	1.5
TGME49_300060 signal peptidase subunit protein	2
TGME49_301180 SAG-related sequence SRS19F	2
TGME49_308020 SAG-related sequence SRS57	1.5

TGME49_310750 emp24/gp25L/p24 family protein	2
TGME49_315320 SAG-related sequence SRS52A	2
TGME49_319350 SAG-related sequence SRS17B	3.5
Metabolismo	
ID del gen/descripción del producto.	Máximo FC alcanzado
TGME49_219630 flavodoxin domain-containing protein	2
TGME49_232830 vacuolar proton translocating ATPase subunit A, putative	2
TGME49_240280 S1/P1nuclease	5
TGME49_244560 heat shock protein 90, putative	2
TGME49_247350 thioredoxin domain-containing protein	1.5
TGME49_254010 serine carboxypeptidase s28 protein	2
TGME49_254880 Alpha-galactosidase	2.5
TGME49_269190 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH2	4.5
TGME49_269920 phosphatidylserine decarboxylase	3
TGME49_270240 MAG1	2.5
TGME49_280380 poly(ADP-ribose) glycohydrolase	3.5
TGME49_283780 glucose-6-phosphate isomerase GPI	1.5
TGME49_286630 redoxin domain-containing protein	1.5
TGME49_294200 glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	2
Granulos densos	
ID del gen/descripción del producto.	Máximo FC alcanzado
TGME49_203310 dense granule protein GRA7	2
TGME49_227280 dense granule protein GRA3	3
TGME49_286450 dense granule protein GRA5	5.5
TGME49_288650 dense granule protein GRA12	2.5
TGME49_297880 dense granule protein DG32	8
Roptrias	

ID del gen/descripción del producto.	Máximo FC alcanzado
TGME49_205250 rhoptry protein ROP18	1.5
TGME49_215775 rhoptry protein ROP8	1.5
TGME49_215785 rhoptry protein ROP2A	2
TGME49_295110 rhoptry protein ROP7	2
TGME49_295125 rhoptry protein ROP4	2.5
Micronemas	
ID del gen/descripción del producto.	Máximo FC alcanzado
TGME49_218520 microneme protein MIC6	3.5
TGME49_250710 microneme protein MIC10	2
TGME49_277080 microneme protein MIC5	1.5
Desconocido	
ID del gen/descripción del producto.	Máximo FC alcanzado
<u>TGME49_218540 peptidase S15, putative</u>	2

Anexo 3. Afinidad peptídica por los alelos utilizados. Se categoriza la afinidad de cada péptido por cada alelo DR β 1, (SB): Unión fuerte, (WB): Unión débil, (-): Sin unión.

Alelo DR β 1	Peptidos Predichos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Tipo de afinidad cada alelo							
0101	SB	SB	WB	SB	SB	SB	SB	-
0102	SB	SB	SB	SB	SB	SB	WB	SB
0104	SB	SB	SB	SB	SB	SB	WB	SB
0109	SB	SB	WB	SB	SB	SB	WB	-
0301	WB	-	WB	-	-	-	WB	SB
0302	WB	-	-	-	WB	-	-	WB
0304	WB	-	WB	-	-	-	WB	SB
0305	WB	-	-	-	-	-	-	-
0313	WB	-	WB	-	-	-	WB	SB
0325	WB	-	WB	-	-	-	WB	SB
0326	WB	-	WB	-	-	-	WB	SB
0340	WB	-	-	-	-	-	-	-
0401	WB	WB	-	SB	SB	WB	SB	-
0402	SB	SB	SB	SB	SB	SB	SB	SB
0403	SB	SB	WB	SB	SB	SB	SB	SB
0404	SB	SB	-	SB	SB	SB	SB	SB
0405	WB	SB	-	SB	SB	WB	SB	-
0406	SB	SB	WB	SB	SB	SB	SB	SB
0407	WB	WB	-	SB	SB	WB	SB	-
0408	WB	SB	-	SB	SB	WB	SB	-
0409	WB	SB	-	SB	SB	WB	WB	-
0410	SB	SB	WB	SB	SB	SB	WB	SB
0411	SB	SB	WB	SB	SB	SB	SB	SB
0415	SB	SB	WB	SB	SB	WB	WB	SB
0417	WB	SB	-	SB	SB	WB	WB	-
0418	SB	SB	WB	SB	SB	SB	SB	SB
0421	WB	WB	-	SB	SB	WB	SB	-
0427	SB	SB	WB	SB	SB	SB	SB	SB
0434	WB	WB	-	SB	SB	WB	SB	-
0447	SB	SB	WB	SB	SB	WB	WB	SB
0454	SB	SB	WB	SB	SB	SB	SB	SB

0462	WB	SB	-	SB	SB	WB	WB	-
0466	WB	WB	WB	WB	SB	WB	WB	-
0482	SB	SB	-	SB	SB	SB	SB	-
0701	SB	WB	WB	SB	WB	WB	WB	-
0703	SB	WB	WB	SB	WB	WB	WB	-
0704	SB	WB	SB	SB	WB	-	-	-
0706	SB	WB	WB	SB	WB	WB	WB	-
0708	SB	WB	WB	SB	WB	WB	WB	-
0709	SB	WB	WB	SB	WB	WB	WB	-
0801	SB	WB	SB	SB	SB	WB	-	SB
0802	SB	WB	WB	SB	SB	WB	WB	SB
0804	SB	WB	SB	WB	WB	WB	WB	SB
0805	SB	WB	WB	SB	SB	WB	-	SB
0806	SB	WB	SB	WB	WB	WB	-	SB
0807	SB	WB	WB	SB	SB	WB	WB	SB
0812	SB	WB	SB	WB	WB	WB	WB	SB
0824	SB	WB	WB	SB	SB	WB	WB	SB
0834	SB	-	WB	WB	WB	WB	WB	-
0901	SB	WB	WB	SB	SB	SB	WB	-
0902	SB	WB	WB	SB	SB	SB	SB	-
0903	SB	WB	SB	SB	SB	SB	WB	WB
0905	SB	WB	WB	SB	SB	SB	WB	-
1001	SB	SB	-	SB	SB	SB	WB	-
1002	SB	SB	WB	SB	SB	SB	WB	SB
1003	SB	SB	-	SB	SB	SB	WB	-
1101	SB	WB	SB	WB	SB	-	-	SB
1102	SB	WB	SB	-	SB	-	WB	SB
1104	SB	WB	SB	WB	WB	WB	-	SB
1106	SB	WB	SB	WB	WB	-	-	SB
1109	SB	WB	SB	WB	SB	-	-	SB
1110	SB	WB	SB	WB	SB	-	-	SB
1111	SB	WB	SB	WB	SB	-	-	SB
1113	SB	SB	SB	WB	SB	WB	WB	WB
1116	SB	WB	SB	-	WB	-	WB	SB
1131	SB	WB	WB	WB	WB	-	WB	SB
1144	SB	WB	SB	WB	WB	WB	-	SB
1149	SB	WB	SB	WB	SB	-	-	SB
1154	SB	WB	SB	WB	WB	WB	-	SB
1169	SB	WB	SB	SB	SB	WB	-	SB
1173	SB	-	SB	WB	WB	-	WB	WB

1201	SB	SB	SB	SB	-	SB	WB	SB
1203	SB	SB	SB	SB	-	WB	WB	SB
1204	SB	SB	SB	WB	WB	WB	WB	SB
1205	SB	SB	SB	SB	-	SB	WB	SB
1216	SB	SB	SB	SB	-	SB	WB	SB
1301	SB	WB	SB	-	WB	-	WB	SB
1302	SB	-	WB	-	WB	-	-	-
1303	SB	WB	SB	WB	SB	-	-	SB
1304	SB	WB	SB	WB	WB	-	-	SB
1305	SB	WB	SB	WB	SB	-	-	SB
1306	SB	WB	SB	WB	WB	WB	WB	SB
1307	SB	WB	WB	WB	SB	WB	-	SB
1308	SB	WB	SB	WB	SB	WB	WB	SB
1311	SB	WB	SB	WB	WB	WB	-	SB
1313	SB	WB	WB	WB	SB	WB	WB	WB
1315	SB	WB	SB	-	WB	-	-	SB
1319	SB	WB	SB	-	WB	-	WB	SB
1323	SB	-	WB	-	WB	-	-	-
1326	SB	WB	SB	WB	SB	WB	-	SB
1327	SB	WB	SB	-	WB	WB	WB	SB
1332	SB	WB	SB	WB	WB	WB	-	SB
1378	SB	WB	SB	-	WB	-	WB	SB
1401	SB	SB	SB	WB	SB	WB	WB	SB
1402	SB	WB	WB	WB	SB	WB	WB	WB
1403	SB	-	WB	WB	SB	WB	WB	WB
1404	SB	SB	SB	WB	WB	WB	WB	SB
1405	SB	WB	SB	WB	SB	WB	SB	SB
1406	SB	WB	SB	WB	SB	WB	WB	SB
1407	WB	WB	-	WB	SB	-	-	-
1408	SB	WB	SB	WB	SB	WB	SB	SB
1409	SB	WB	WB	WB	SB	WB	WB	WB
1411	SB	WB	SB	WB	SB	WB	SB	SB
1412	SB	WB	SB	WB	SB	WB	WB	SB
1414	SB	-	-	WB	SB	WB	WB	-
1417	SB	SB	SB	WB	WB	WB	WB	SB
1425	SB	WB	WB	SB	SB	WB	-	SB
1432	SB	SB	SB	SB	SB	WB	WB	SB
1463	SB	WB	SB	WB	WB	-	WB	WB
1468	WB	WB	-	WB	WB	WB	-	-
1501	WB	SB	SB	SB	WB	SB	WB	WB

1502	WB	WB	WB	SB	WB	WB	WB	-
1503	WB	SB	WB	SB	WB	SB	WB	SB
1527	WB	SB	-	SB	SB	WB	WB	-
1538	WB	WB	WB	SB	WB	WB	WB	-
1601	WB	SB	WB	SB	SB	WB	-	SB
1604	WB	SB	WB	SB	SB	SB	WB	SB
1615	WB	SB	WB	SB	WB	WB	-	SB

Anexo 4: Lista de resultados de BLASTp de cada péptido seleccionado en las diferentes cepas existentes en ToxoDB. Al lado izquierdo están las listas de las diferentes cepas de *Toxoplasma gondii* disponibles en ToxoDB, al lado derecho los hallazgos de conservación de péptidos entre ellas y en el encabezado de cada subsección el péptido que se comparó. Positives: Numero de aminoácidos que concuerdan, Gaps: número de aminoácidos que faltan.

LKKRILLAGARVAIV	
TGARI_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGMAS_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVEG_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
ACFISLLLSPKLPDF	
TGARI_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGMAS_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVEG_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)

ACLVIQSVGRLLQS	
TGARI_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGMAS_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVEG_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
SWGYLRLFAFPVAAL	
TGARI_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGMAS_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVEG_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
GNLYKAIQNALSRRS	
TGARI_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)

TGMAS_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVEG_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
KTLIQWLAASYAGRS	
TGARI_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGMAS_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVEG_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
LQIMQLSSSSARANA	
TGARI_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGMAS_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)

TGVEG_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
VVSLLRLLRRRRRRA	
TGARI_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGDOM2_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGFOU_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGGT1_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGMAS_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGME49_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGP89_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGPRC2_240280	Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
TGRUB_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGVAND_240280	Positives = 0/15 (0%)
TGVEG_240280	Positives = 0/15 (0%)