Revista de Ciencias Químico Biológicas (2025)
Número III, 39-47

Diseño *in silico* de una vacuna de ADN contra *Toxoplasma gondii* basada en los epítopos del antígeno ROP35 específicos para linfocitos B y T CD4⁺ múridos

In silico design of a DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* based on ROP35 antigen epitopes specific for murine B and CD4⁺ T lymphocytes

Velázquez-Escobar, F.M.[1], Beltrán-López, E.[1], Vega-Castillo, U.[1], López-Moreno, H.S.[1]*

[1]*Laboratorio de Biomedicina Molecular, CAC Biotecnología Biomédica UAS-264, Posgrado en Ciencias Biomédicas y Posgrado en Biotecnología, énfasis en Salud, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80010.*

RESUMEN

La toxoplasmosis, causada por *Toxoplasma gondii (T. gondii)*, es una zoonosis con una alta prevalencia mundial oscilando del 30 % al 70 %. Afecta principalmente a individuos inmunocomprometidos y mujeres embarazadas, pudiendo generar complicaciones graves, incluso la muerte. Las proteínas ROP, ubicadas en las roptrias de *T. gondii* son clave en la invasión y persistencia del parásito, de ellas ROP35 ha sido identificada como un antígeno relevante, por lo que fue elegida para el desarrollo *in silico* de una vacuna de ADN que prevenga la infección por *T. gondii*. Con la secuencia de ROP35 se predijeron epítopos B y T CD4⁺ restringidos para H2-IA^d de ratones BALB/c mediante los *softwares* MHC-II *Binding* y *ElliPro*, y se evaluaron con *VaxiJen 2.0* y *MHCPred*. Los epítopos MPEQDLASGFL y WDDAHLVQVSTSHPD mostraron las mejores propiedades antigénicas para linfocitos B y T CD4⁺ respectivamente. Las secuencias génicas correspondientes fueron clonadas en el vector de expresión pVAX1, incorporando un codón de inicio y la secuencia génica del espaciador GSGGSG para su óptima expresión. Esta construcción fue denominada pR35BT y permite la síntesis simultánea de ambos epítopos, representando un avance hacia el desarrollo de una vacuna genética contra la toxoplasmosis, con potencial para su validación *in vitro* e *in vivo* en modelos múridos que contribuya a establecer las bases moleculares para la prevención de toxoplasmosis en seres humanos.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii, ROP35, Vacuna genética, Predicción* in silico*, Epítopos B y T*.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a globally prevalent zoonosis caused by *Toxoplasma gondii (T. gondii),* with an incidence ranging from 30 % to 70 %. It primarily affects immunocompromised individuals and pregnant women, potentially leading to severe complications, including death. ROP proteins, which are located in the *T. gondii* rhoptries, are crucial for parasite invasion and persistence. Among them, ROP35 has been identified as a relevant antigen, making it a suitable target for the *in silico* development of a DNA vaccine to prevent *T. gondii* infection. Using the ROP35 sequence, B and T cell epitopes restricted to H2-IA^d in BALB/c mice were predicted with MHC-II Binding and ElliPro software and further evaluated using VaxiJen 2.0 and MHCPred. The epitopes MPEQDLASGFL and WDDAHLVQVSTSHPD exhibited the highest antigenic properties for B and T CD4⁺ cells respectively. The corresponding genetic sequences were cloned into the pVAX1 expression vector, incorporating a start codon and the GSGGSG spacer sequence to ensure optimal expression. This construct, named pR35BT, enables the simultaneous synthesis of both epitopes, representing a significant step toward the development of a genetic vaccine against toxoplasmosis. It holds potential for *in vitro* and *in vivo* validation in murine models, contributing to the establishment of molecular foundations for toxoplasmosis prevention in humans.

Keywords: Toxoplasma gondii*, ROP35, Genetic vaccine,* In silico *prediction, B and T epitopes*.

***Autor de correspondencia:** Héctor Samuel López Moreno
Email: hslmoreno@ms.uas.edu.mx
ORCID ID: 0000-0001-7391-205X
Registro ORCID Autores: EBL: 0000-0002-8604-2847 **UVC:** 0009-0006-1796-8845

Enviado: Abril 2025
Aceptado: Junio 2025

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un protozoario parásito intracelular obligado causante de la enfermedad conocida como toxoplasmosis (Smith et al., 2021). Esta enfermedad puede manifestarse tanto como una infección aguda como crónica debido a la formación de quistes (Al-Malki, 2021; Smith et al., 2021). La incidencia de la toxoplasmosis es mayor en regiones con climas húmedos o cálidos, con una prevalencia mundial del 30 % (Molan et al., 2019). En México, la incidencia es más alta en las zonas costeras, con un 64 %, y en Yucatán, con un 70 % (Castillo-Morales et al., 2012). Además, en 2024, Sinaloa reportó 132 casos de toxoplasmosis, ubicándose en el séptimo lugar a nivel nacional (Boletín Epidemiológico, 2025). Estos registros de alta prevalencia mundial ponen en evidencia la necesidad de implementar medidas más efectivas para su prevención y control.

La toxoplasmosis puede afectar tanto a hospederos definitivos como intermedios, siendo el gato doméstico (*Felis catus*) uno de los hospederos definitivos y el principal reservorio de este parásito (Smith et al., 2021). El ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* inicia cuando los hospederos intermediarios ingieren ooquistes presentes en agua, alimentos o suelo contaminados, una vez dentro del organismo, los ooquistes son degradados por enzimas digestivas en el estómago, lo que permite la liberación de esporozoítos que se diferencian en taquizoítos (Al-Malki, 2021). Estas formas móviles del parásito se diseminan a través del torrente sanguíneo y se alojan en diversos tejidos, especialmente en el tejido nervioso y muscular (Al-Malki, 2021). En estas localizaciones, los taquizoítos disminuyen su velocidad de replicación y se diferencian en bradizoítos, los cuales se agrupan formando quistes tisulares que pueden persistir durante largos periodos (Al-Malki, 2021). La transmisión al hospedero definitivo, generalmente un felino, ocurre mediante la ingestión de quistes presentes en la carne cruda de hospederos intermediarios, o por contacto con agua o suelo contaminado (Castillo-Morales et al., 2012; S. Al-Malki, 2021; Smith et al., 2021).

En el caso de los seres humanos, la toxoplasmosis puede adquirirse por el consumo de carne cruda o mal cocida proveniente de animales infectados, por la ingestión de agua o alimentos contaminados con ooquistes, así como por transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos o por transmisión vertical durante la gestación (Castillo-Morales et al., 2012; Al-Malki, 2021; Smith et al., 2021). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen del estado inmunológico del paciente, frecuentemente en individuos inmunocompetentes, la toxoplasmosis suele ser asintomática o manifestarse como toxoplasmosis ocular (Espinoza Rojas et al., 2022). Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos puede causar lesiones cerebrales como encefalitis, complicaciones oftalmológicas como retinocoroiditis, daño sistémico generalizado, trastornos de la consciencia o crisis convulsivas y en mujeres embarazadas, puede afectar al feto provocándole encefalitis, hidrocefalia, daño cerebral y abortos espontáneos (Castillo-Morales et al., 2012; Espinoza Rojas et al., 2022).

Para invadir al hospedero, *T. gondii* secreta proteínas denominadas ROP (cinasas), localizadas en orgánulos llamados roptrias, que facilitan la invasión y establecimiento de la infección (Gaji et al., 2021). Entre ellas está la proteína antigénica ROP35, un componente de la pared celular de *T. gondii*, que contribuye a la persistencia del parásito y al desarrollo de infecciones crónicas (Gaji et al., 2021; Mani et al., 2023). Su importancia en el proceso de establecimiento de la enfermedad se puso de manifiesto en el reporte de Mani et al. (2023) quienes demostraron que los niveles de RNA de ROP35 aumentan en ratones con alta carga quística (Mani et al., 2023). Además, Fox et al. (2016) observaron que la inactivación del gen *ROP35* reduce la carga de quistes en modelos múridos (Fox et al., 2016; Mani et al., 2023).

Históricamente la vacunación es la estrategia inmunitaria cúspide de la prevención y control de las enfermedades a nivel mundial, hecho que quedó de manifiesto durante la pandemia de COVID-19 (Dey et al., 2021; Lagos et al., 2020), la comunidad científica aún no ha logrado obtener con éxito una vacuna que prevenga alguna enfermedad parasitaria en seres humanos, como la toxoplasmosis. Adicionalmente, el diseño de vacunas es complejo y puede demorar varios años (Pollard & Bijker, 2021). Existen diversos formatos para el diseño de vacunas, como atenuadas, inactivadas con vectores virales, de ADN y las más exitosas para prevenir la COVID-19, las de ARN mensajero modificado (Pollard & Bijker, 2021; WHO, 2022).

Aunque las vacunas de ARN han mostrado porcentajes de protección que superan el 90 %, tienen la desventaja de requerir ultracongelación para su mantenimiento, en cambio las vacunas de ADN son más estables requiriendo solo refrigeración convencional, y por ello pueden estar al alcance de la población de países en vías de desarrollo que además son las comunidades más afectadas por las parasitosis, incluida la toxoplasmosis, aunado a ello confieren buenos porcentajes de protección, lo cual se confirmó con el éxito de la vacuna de ADN diseñada por investigadores de la India, denominada ZyCov-D, empleada para prevenir la COVID-19, confiriendo alrededor de un 66.6 % de protección (Dey et al., 2021; Khobragade et al., 2022).

Por otro lado, el empleo de herramientas bioinformáticas diseñadas para el análisis *in silico* de secuencias de proteínas antigénicas representan la base para la selección de epítopos restringidos para linfocitos B y T basadas en algoritmos de predicción, acelerando la identificación de las regiones más inmunogénicas de una proteína y emplearlas como base para el diseño y validación de candidatos vacunales (Yurina & Adianingsih, 2022). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue predecir los epítopos de linfocitos B y T CD4⁺ múridos derivados de la proteína antigénica ROP35 de *T. gondii* para diseñar una construcción genética vacunal que brinde protección contra la toxoplasmosis experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

ROP35 *T. GONDII*

La obtención de la secuencia genética de la proteína *Rop35* de *T. gondii* se realizó por medio de la página bioinformática NCBI (secuencia de referencia XM_018782426.1) en el apartado de nucleótidos y el archivo obtenido fue en formato FASTA con un total de 6009 bp. El modelado 3D de la proteína ROP35 se llevó a cabo en la página bioinformática I-TASSER, la cual recaba conocimientos sobre la posible función del objetivo mediante la reconstrucción de los modelos 3D de las proteínas (Zhou et al., 2022). Los resultados se obtuvieron 3 días después, haciendo uso de la secuencia en formato FASTA para predecir tanto la estructura como la anotación de las funciones de la proteína ROP35 basadas en su estructura y haciendo uso de plantillas como referencia a partir de la página bioinformática Protein Data Bank (PDB), y en ella se señalaron las regiones correspondientes a los epítopos predichos.

PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS B

Para la predicción de epítopos de linfocitos B, se utilizó el programa bioinformático *ElliPro* (Ponomarenko et al., 2008), el cual identifica epítopos antigénicos lineales y discontinuos basándose en la estructura tridimensional de las proteínas en formato PDB. *ElliPro* asigna a cada epítopo un puntaje basado en el *Protrusion Index* (PI), que corresponde al valor promedio calculado sobre los residuos del epítopo. Este índice se define según el centro de masa del residuo que se encuentra fuera del elipsoide de mayor tamaño posible (Ponomarenko et al., 2008). La predicción de epítopos se realizó utilizando un umbral de 0.6 para seleccionar aquellos con mayor antigenicidad (Ponomarenko et al., 2008).

PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS T CD4⁺

Para la predicción de epítopos restringidos para linfocitos T CD4⁺, se empleó la herramienta bioinformática *MHC-II Binding Predictions* (Reynisson et al., 2021). Se ingresó la secuencia de aminoácidos de la proteína ROP35 en formato FASTA y se utilizó, por defecto, un umbral de afinidad fuerte superior a 0.5 (Reynisson et al., 2021), y se seleccionó el alelo del complejo principal de clase-II (MHC-II) H2-IA^{d}, expresado en ratones de la cepa BALB/c. La longitud elegida para del péptido analizado fue de 15 residuos de aminoácidos.

ANTIGENICIDAD DE LOS EPÍTOPOS B

Para llevar a cabo la evaluación de la antigenicidad de los epítopos predichos para los linfocitos B se utilizó la página bioinformática *VaxiJen 2.0* (Doytchinova & Flower, 2008a), la cual permite evaluar a los péptidos uno por uno y mide su antigenicidad con base en las propiedades fisicoquímicas del péptido sin necesidad de ser sometido a un alineamiento previo. Por otra parte, también permite seleccionar un organismo a partir del cual predice la probabilidad de que el péptido sea considerado un antígeno. En este caso, se seleccionó el organismo parásito debido a que la proteína de interés pertenece al parásito *T. gondii* y los péptidos deben superar el valor umbral de 0.5 para poder ser considerados como candidatos (Doytchinova & Flower, 2008a). Para la evaluación, se ingresó la secuencia en formato FASTA de los epítopos lineales y discontinuos de manera manual, se seleccionó el organismo de interés y, por último, se seleccionó el archivo de salida al igual en formato FASTA en conjunto con la predicción y el valor del umbral obtenido para cada secuencia.

ANTIGENICIDAD DE LOS EPÍTOPOS T CD4⁺

Para la evaluación de la antigenicidad de los epítopos restringidos para linfocitos T CD4⁺ se utilizó la herramienta bioinformática *MHCpred* (Guan et al., 2003), la cual emplea un método aditivo para predecir si un péptido tiene la capacidad de unión al MHC de clase I y clase II, lo cual se mide a través de un valor probable IC_{50}, el cual oscila de 0.01 a 5000 nM y hace referencia a la capacidad de unión del péptido predicho a MHC. Se seleccionó la especie de ratón para realizar la predicción y se centró en el alelo (H2-IA^{d}) debido a que se trabajó con ese alelo para la predicción de los epítopos T CD4⁺ y por último se cargó la secuencia en formato FASTA de los epítopos predichos de ROP35 de *T. gondii*.

CONSTRUCCIÓN GENÉTICA VACUNAL

Para el diseño de la construcción genética vacunal las secuencias de aminoácidos de los epítopos específicos para linfocitos B y T predichos en las herramientas bioinformáticas *MHC-II Binding Prediction* y *ElliPro*, y su antigenicidad validada con *VaxiJen 2.0* y *MHCpred* como se describió anteriormente, fueron ingresadas a la herramienta *ReverseTranslate* para obtener la secuencia de nucleótidos codificante para cada uno. Se adaptaron a formato FASTA para facilitar su incorporación en el software *SnapGene* y generar la construcción genética vacunal. La cual está integrada por un codón de inicio (ATG) unido a la secuencia correspondiente al epítopo lineal específico para linfocitos B ($R35B_{1-11}$), la secuencia génica del espaciador (GSGGSG) (Wan et al., 2019), la secuencia génica del epítopo para linfocitos T $CD4^+$ ($R35T_{226-240}$), todo ello flanqueado por los sitios de restricción en 5´-EcoRI y en 3´-XhoI, para facilitar su inserción en el sitio de clonación múltiple del vector pVAX1 (disponible en nuestro grupo de investigación por el donativo del MC. Antonio Cruz, Tecnológico de Monterrey, México).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EPÍTOPO $R35B_{1-11}$

A través del sitio bioinformático *Ellipro*, se predijeron cuatro epítopos lineales para la cadena A (única cadena de la proteína) de la proteína ROP35 de *T. gondii*. Se identificó el epítopo 1 con 170 aminoácidos (del residuo 65 al 234) y un índice de protrusión (PI) de 0.817, el epítopo 2 con 54 aminoácidos (del residuo 240 al 293) y un PI de 0.764, el epítopo 3 con 27 aminoácidos (del residuo 30 al 54) y un PI de 0.716, y finalmente, el epítopo 4 con 11 aminoácidos (del residuo 1 al 11) y un PI de 0.710. El epítopo 1 presentó el mayor PI (0.817), lo que sugiere que podría ser el mejor candidato debido a su mayor accesibilidad en la estructura tridimensional de la proteína, permitiendo una mejor interacción con los receptores de linfocitos B y una mayor capacidad inmunogénica. Sin embargo, esta predicción fue posteriormente descartada mediante ensayos de antigenicidad.

Se obtuvieron cuatro imágenes tridimensionales de los epítopos predichos, donde se observa la distribución de los residuos de aminoácidos en la estructura de la proteína ROP35 **(Figura 1)**. En el caso de los epítopos 2, 3 y 4, su accesibilidad es menor debido a su ubicación en la estructura proteica, lo cual se correlaciona con los menores valores de PI. Asimismo, se realizó la predicción de cuatro epítopos conformacionales o discontinuos. El epítopo 1 obtuvo el mayor valor de PI (0.814) con 172 residuos de aminoácidos, posicionándose como el mejor candidato. Por otro lado, los epítopos 2, 3 y 4 también fueron considerados como potenciales candidatos: el epítopo 2 presentó un PI de 0.764 con 54 residuos de aminoácidos, el epítopo 3 un PI de 0.707 con 29 residuos, y el epítopo 4 un PI de 0.700 con 12 residuos **(Figura 1).**

Aunque fue posible la predicción de epítopos tanto lineales como discontinuos, en este estudio solo se seleccionaron los epítopos lineales para linfocitos B **(Tabla 1)**. Esto se debe a que, en la síntesis recombinante *in vitro*, los epítopos lineales pueden obtenerse utilizando sistemas de expresión procariontes, mientras que los epítopos discontinuos requieren de conjugaciones con proteínas acarreadoras y el uso de organismos eucariontes capaces de realizar el plegamiento tridimensional a través de procesos postraduccionales, un ejemplo de esto es la vacuna pUCP24-OmpH contra *Pasteurella multocida* desarrollada por Yassein y colaboradores en el año 2021, la cual fue expresada en un sistema procarionte (*Escherichia coli*), obteniendo un 90 % de supervivencia en modelos múridos y 3 veces más anticuerpos en comparación con vacunas inactivadas (Yassein et al., 2021).

Los epítopos discontinuos no fueron descartados, ya que en futuras investigaciones podrían sintetizarse en sistemas de expresión eucarionte como en *Drosophila* o en células de mamífero para obtener epítopos conformacionales dentro de proteínas acarreadoras, reconocibles por linfocitos B. Por otro lado, los valores obtenidos para los epítopos predichos en función de la accesibilidad al solvente y la flexibilidad indicaron que el epítopo 1 es el mejor candidato. Sin embargo, tras los análisis de antigenicidad, el epítopo más adecuado para la construcción genética vacunal fue el epítopo 4, lo cual se detalla en los resultados posteriores.

EPÍTOPO $R35T_{226-240}$

Para la predicción de epítopos de linfocitos T $CD4^+$, se identificaron 626 péptidos, de los cuales solo dos presentaron una alta afinidad de unión, todos predichos para el alelo $H2\text{-}IA^d$. La afinidad de unión se considera fuerte cuando el porcentaje de clasificación del péptido se aproxima a 1, y débil cuando se acerca a 0. El péptido predicho 1 (EPPPASIVPVSSEAP) presentó una afinidad de unión fuerte, con un valor de 0.7651, abarcando la posición 155-169 de la secuencia. Por otro lado, el péptido 2 (WDDAHLVQVSTSHPD) tuvo un valor de afinidad de 0.7545 y se ubicó entre los residuos 226 y 240, ambos con una longitud de 15 aminoácidos **(Tabla 2)**. Posteriormente, los epítopos de linfocitos T $CD4^+$ fueron evaluados mediante ensayos de antigenicidad. Aunque los resultados de la predicción inicial indicaban que ambos péptidos eran candidatos a ser

Tabla 1. Predicción de epítopos para linfocitos B derivados de ROP35 de *T. gondii*.

N° de Epítopo (Secuencia)	Umbral de Antigenicidad
Epítopo 1: (TVEAGATVAAPQVETGPLLSVRAPRSPLHLRDVDAPEVTHASSEGSPQFESSLSQQRLRRPADRGEAHNGEEPRKDAAT QTVRGYGGQSTEPPPASIVPVSSEAPQDGAEQRQASSAAESLAGLDPDAGDTGLRSQEMDEEGSGAAQDMERAHAAQPT VSTWDDAHLVQV)	0.6369
Epítopo 2: (DMFPVDGSFSKKQEGRRERRLAVRGDDSFARGHNRDRDASNGRSILRRAPGWAK)	0.6790
Epítopo 4: (MPEQDLASGFL)	**0.8360**

Umbral de antigenicidad de epitopos para linfocitos B determinado utilizado el software *ElliPro.* Predicción de epítopos para linfocitos B, empleando el software *ElliPro.* La secuencia seleccionada fue MPEQDLASGFL designada como Epítopo R35B$_{1\text{-}11}$.

epítopos restringidos para MHC-II, los análisis de antigenicidad revelaron que el epítopo 2 presentó una mayor capacidad inmunogénica, aspecto que se analiza con mayor detalle en los resultados posteriores.

ANTIGENICIDAD DE R35B$_{1\text{-}11}$ Y R35T$_{226\text{-}240}$

La antigenicidad de los epítopos de linfocitos B y T fue evaluada mediante las herramientas bioinformáticas *VaxiJen 2.0* y *MHCpred* (Doytchinova & Flower, 2008b; Guan et al., 2003). Para la evaluación de los epítopos de linfocitos B, se utilizó la herramienta bioinformática *VaxiJen 2.0* con un umbral de 0.6. Los péptidos con valores superiores fueron catalogados como antígenos probables. El péptido lineal 1, con 170 residuos de aminoácidos, presentó un valor de 0.6369; el péptido lineal 2, con 54 residuos, obtuvo un valor de 0.6790; y finalmente, el péptido lineal 4, con 11 residuos, mostró el mayor valor con 0.8360, indicando su alta probabilidad de ser un antígeno.

En cuanto a los epítopos discontinuos, el péptido 1 (172 residuos) obtuvo un valor de 0.6354, el péptido 2 (54 residuos) presentó un valor de 0.6790, y el péptido 4 (MPEQDLASGFLL), con 12 residuos, alcanzó un valor de 0.7735, confirmando su clasificación como antígeno probable.

Para los linfocitos T CD4$^+$, la herramienta *MHCpred* se utilizó para analizar los péptidos predichos. El péptido 1 predicho para linfocitos T CD4$^+$ (EPPPASIVPVSSEAP) fue analizado en dos secciones. La primera sección, compuesta por 9 aminoácidos (EPPPASIVP), obtuvo un valor de IC_{50} de 877.0 y un valor de confianza de predicción de 1, el más alto posible. La segunda sección (IVPVSSEAP), con la misma longitud, presentó un IC_{50} de 1710.02 y un valor de confianza de 1. De manera similar, el péptido 2 (WDDAHLVQVSTSHPD) fue analizado en dos partes: la primera (WDDAHLVQV) obtuvo un IC_{50} de 111.94 con un valor de confianza de 1, mientras que la segunda (VQVSTSHPD) presentó un IC_{50} de 1073.99 con un valor de confianza de 1. Estos resultados indican que los epítopos predichos para linfocitos T CD4$^+$ son candidatos para la construcción de una vacuna ya que en el análisis de antigenicidad obtuvieron los valores en el rango de 0.01 a 5000 los cual indica una alta antigenicidad y por lo tanto son en general, buenos candidatos vacunales (Guan et al., 2003).

Tabla 2. Predicción de epítopos para linfocitos T CD4$^+$ derivados de ROP35 de *T. gondii*.

N° de Epítopo	Afinidad	IC50 MHC-II (nM)
EPPPASIVPVSSEAP	0.7651	877.0
WDDAHLVQVSTSHPD	0.7545	111.94

Nota. Afinidad e IC_{50} de epítopos para linfocitos T CD4$^+$y MH-II, empleando el *software MHC-II Binding Predictions*. La secuencia seleccionada fue WDDAHLVQVSTSHPD designada como Epítopo R35T$_{226\text{-}240}$

Con base en nuestros resultados, se determinó que el péptido lineal 4 de linfocitos B (R35B$_{1\text{-}11}$) y el péptido lineal 2 restringido para H2-IA^d específico para linfocitos T CD4$^+$ (R35T$_{226\text{-}240}$) son los mejores candidatos para la construcción génica vacunal, con base en los elevados valores de antigenicidad obtenidos en el umbral de predicción,

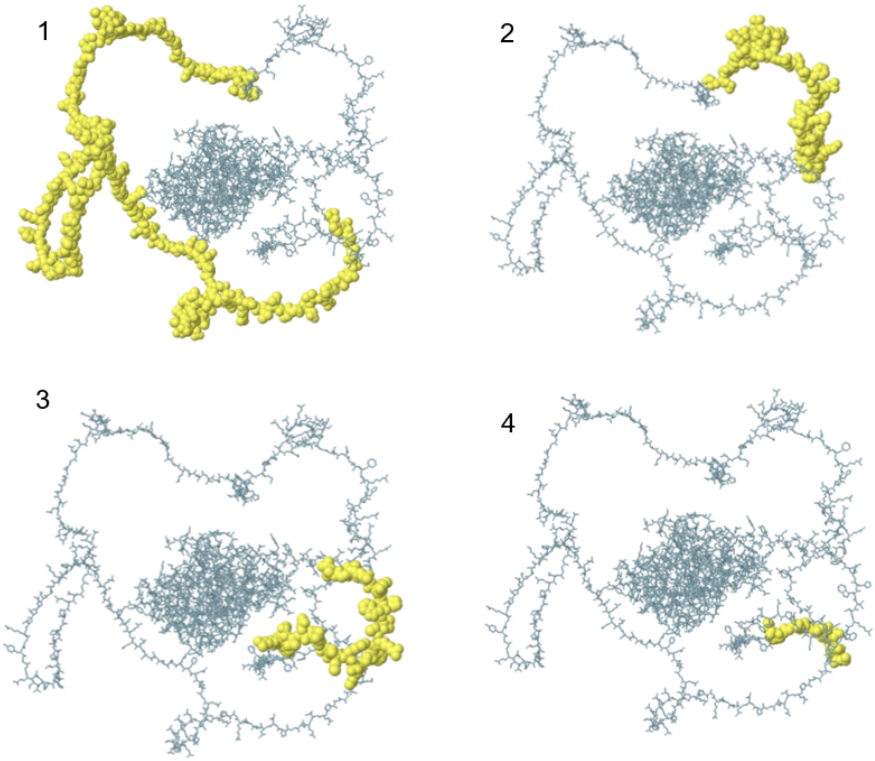

Figura 1. Predicción de epítopos lineales para linfocitos B derivados de ROP35. Cada epítopo se señala en color amarillo, y fueron predichos en *ElliPro* y su antigenicidad analizada en *Vaxigen 2.0*. Epítopo 1: de 1- 170 aa; PI 0.817; Epítopo 2: de 2- 54 aa; PI 0.764; Epítopo 3: de 3- 27 aa; PI 0.716; Epítopo 4: de 4- 11 aa; PI 0.710.

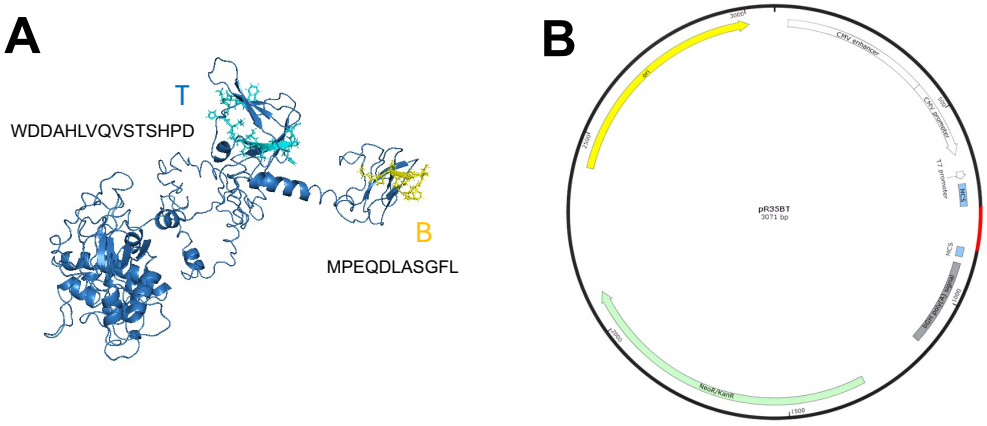

Figura 2. Epítopos B y T CD4⁺ de ROP35 y construcción genética vacunal pR35BT. (A) Estructura 3D de ROP35 donde se señalan las regiones donde se localiza el epítopo B (amarillo) y el epítopo T CD4⁺ (azul). El modelado se realizó con el *software* I-TASSER y selección de los residuos de aminoácidos de los epítopos B y T CD4⁺ con *PyMol*. (B) Construcción genética vacunal pR35BT, diseñada en *SnapGene*. La secuencia genética correspondiente a R35BT: GAATTCATGATGCCGGAACAGGATCTGGCGAGCGGCTTTCTGGGCAGCGGCGGCAGCGGCTGGGATGATGCGCATCTGGTGCAGGTGAGCACCAGCCATCCGGATCTCGAG, se muestra en color rojo.

lo que indica una mayor afinidad de unión y una mayor probabilidad de inducir una respuesta inmune contra la infección preclínica por *T. gondii*

CONSTRUCCIÓN GENÉTICA VACUNAL PR35BT

En el caso de los epítopos lineales de linfocitos B, se seleccionó el epítopo 4, compuesto por 11 residuos de aminoácidos ($R35B_{1-11}$), que presentó el mayor valor de antigenicidad, lo que lo convirtió en el mejor candidato. Su secuencia de aminoácidos fue igualmente convertida a nucleótidos, obteniendo un fragmento de 33 pares de bases (pb). El epítopo 2 de linfocitos T $CD4^+$, con 15 residuos de aminoácidos ($R35T_{226-240}$), fue elegido debido a su mayor valor en los ensayos de antigenicidad en comparación con el epítopo 1, lo que sugiere una mejor capacidad para inducir una respuesta inmune contra *T. gondii*.

Para la construcción del vector de expresión, la secuencia de aminoácidos fue convertida a nucleótidos, obteniendo un fragmento de 45 pb. Una vez seleccionados los epítopos 4 y 2 de linfocitos B y T $CD4^+$ respectivamente, se unieron mediante la secuencia genética del espaciador universal GSGGSG (Wan et al., 2019). Se añadió un codón de inicio ATG, seguido del espaciador, el epítopo $R35B_{1-11}$, y posteriormente el epítopo $R35T_{226-240}$. Finalmente, se incluyeron en los flancos 5' y 3' las secuencias específicas para las enzimas de restricción EcoRI y XhoI respectivamente, con esta la secuencia completa, se procedió a su inserción en el vector de vacunal pVAX1 dando lugar a la construcción genética vacunal denominada aquí como pR35BT, con un tamaño de 3,071 pb **(Figura 2)** listo para su síntesis y evaluación *in vitro*. Estos resultados son consistentes con estudios previos sobre vacunas de ADN y diseño de vacunas *in silico* basados también en la predicción de epítopos B y T (Da'dara & Harn, 2005; Ojha et al., 2020; Zhu et al., 2021). En 2020, Ojha y colaboradores realizaron la predicción de epítopos específicos para linfocitos B y T derivados de antígenos de *Leishmania*, empleando herramientas bioinformáticas como *RANKPEP, NetCTL 1.2* y *ABCpred* (Ojha et al., 2020). A pesar de utilizar metodologías diferentes a las del presente estudio, en ambos casos el análisis *in silico* permitió la predicción de epítopos específicos a partir de proteínas antigénicas derivadas del parásito (Ojha et al., 2020). Por otro lado, en 2021, Zhu y colaboradores diseñaron una vacuna de ADN contra *T. gondii*, basada en la predicción de epítopos lineales específicos de linfocitos B derivados del antígeno GRA39 (Zhu et al., 2021). Evaluaron la antigenicidad y sintetizaron la construcción genética para su evaluación en modelos murinos, observando una reducción aproximada del 33% en la carga quística en los ratones (Zhu et al., 2021).

En comparación con el presente estudio, estos hallazgos soportan la validez de nuestros datos y que la estrategia empleada en el diseño de la construcción genética vacunal pR35BT, cumple con las especificaciones de antigenicidad y restricción para utilizarla primero como inmunógeno al inmunizar ratones BALB/c, analizando sus títulos de anticuerpos, así como el perfil de citocinas Th, y posteriormente, emplearla en ensayos de protección contra *T. gondii* en dicho modelo múrido, que establezca las bases celulares y moleculares para el diseño de una vacuna que prevenga la toxoplasmosis humana.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio presenta como única limitante, que se trata de una investigación *in silico*, sin embargo, el resto cumple con todos los criterios científicos, uso de softwares y plataformas inmunoinformáticas para trasladarlo al contexto *in vitro* e *in vivo*, tal como lo sustenta la bibliografía citada aquí.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados proporcionan la evidencia de que los epítopos específicos $R35B_{1-11}$ (MPEQDLASGFL) y $R35T_{226-240}$ (WDDAHLVQVSTSHPD), predichos a partir de la proteína ROP35 sirvieron de base para la obtención de la construcción genética vacunal pR35BT, específica para linfocitos B y T $CD4^+$. Además, se demostró que cumple con los parámetros de antigenicidad y restricción al MHC-II ($H2\text{-}IA^d$), para su síntesis y evaluación *in vitro* como nueva vacuna para prevenir la Toxoplasmosis preclínica en el modelo múrido de ratones BALB/c. Hecho que contribuirá al establecimiento de las bases celulares y moleculares para el posterior diseño de una vacuna genética contra la toxoplasmosis humana, enfermedad que afecta al 30 % de la población mundial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la MC. Priscilla González por su revisión crítica a este manuscrito.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés financiero o relaciones personales que pudieran haber influido en el trabajo aquí reportado.

APROBACIÓN DE COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA

No Aplica dado que el estudio se desarrolló *in silico*.

REFERENCIAS

Boletín Epidemiológico. (s.f.). *Índice de vigilancia epidemiológica, semana 52, 2024*. Secretaría de Salud. http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-

Castillo-Morales, V. J., Acosta Viana, K. Y., Guzmán-Marín, E. D. S., Jiménez-Coello, M., Segura-Correa, J. C., Aguilar-Caballero, A. J., & Ortega-Pacheco, A. (2012). Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from the tropics of Mexico using serological and molecular tests. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2012*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2012/529108

Da'dara, A. A., & Harn, D. A. (2005). DNA vaccines against tropical parasitic diseases. *Expert Review of Vaccines, 4*(4), 575–589. https://doi.org/10.1586/14760584.4.4.575

Dey, A., Chozhavel Rajanathan, T. M., Chandra, H., Pericherla, H. P. R., Kumar, S., Choonia, H. S., Bajpai, M., Singh, A. K., Sinha, A., Saini, G., Dalal, P., Vandriwala, S., Raheem, M. A., Divate, R. D., Navlani, N. L., Sharma, V., Parikh, A., Prasath, S., Sankar Rao, M., & Maithal, K. (2021). Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. *Vaccine, 39*(30), 4108–4116. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.05.098

Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2008). Bioinformatic approach for identifying parasite and fungal candidate subunit vaccines. *The Open Vaccine Journal, 1*, 22–26. https://doi.org/10.2174/1875035400801010022

Espinoza Rojas, J., López Mora, E., Dabanch Peña, J., & Cruz Choappa, R. (2022). Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la infección por *Toxoplasma gondii* [Recommendations for the diagnosis and treatment of infection by *Toxoplasma gondii*]. *Revista Chilena de Infectología, 39*(2), 175–184. https://doi.org/10.4067/S0716-10182022000200132

Fox, B. A., Rommereim, L. M., Guevara, R. B., Falla, A., Hortua Triana, M. A., Sun, Y., & Bzik, D. J. (2016). The *Toxoplasma gondii* rhoptry kinome is essential for chronic infection. *mBio, 7*(3), e00193-16. https://doi.org/10.1128/mBio.00193-16

Gaji, R. Y., Sharp, A. K., & Brown, A. M. (2021). Protein kinases in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology, 51*(6), 415–429. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.006

Guan, P., Doytchinova, I. A., Zygouri, C., & Flower, D. R. (2003). MHCPred: A server for quantitative prediction of peptide-MHC binding. *Nucleic Acids Research, 31*(13), 3621–3624. https://doi.org/10.1093/nar/gkg510

Khobragade, A., Bhate, S., Ramaiah, V., Deshpande, S., Giri, K., Phophle, H., Supe, P., Godara, I., Revanna, R., Nagarkar, R., Sanmukhani, J., Dey, A., Rajanathan, T. M. C., Kansagra, K., & Koradia, P. (2022). Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): The interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. *The Lancet, 399*(10332), 1313–1321. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00151-9

Lagos, M., Díaz, C., & Hernández, P. (2020). Immune response and allergies to vaccines. *Revista Médica Clínica Las Condes, 31*(3), 256–269. https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2020.04.003

Mani, R., Abdelaziz, M. H., Ochiai, E., Sa, Q., Fox, B. A., Bzik, D. J., & Suzuki, Y. (2023). Dense granule protein 3 of *Toxoplasma gondii* plays a crucial role in the capability of the tissue cysts of the parasite to persist in the presence of anti-cyst CD8+ T cells during the chronic stage of infection. *Frontiers in Immunology, 14*, 1272221. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1272221

Molan, A., Nosaka, K., Hunter, M., & Wang, W. (2019). Global status of *Toxoplasma gondii* infection: Systematic review and prevalence snapshots. *Tropical Biomedicine, 36*(4), 898–908. *(Nota: Página estimada agregada si es necesaria; verificar si deseas precisión exacta)*

Ojha, R., Pandey, R. K., & Prajapati, V. K. (2020). Vaccinomics strategy to concoct a promising subunit vaccine for visceral leishmaniasis targeting sandfly and leishmania antigens. *International Journal of Biological Macromolecules, 156*, 548–557. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.097

Pollard, A. J., & Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology: From basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology, 21*(2), 83–100. https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7

Ponomarenko, J., Bui, H. H., Li, W., Fusseder, N., Bourne, P. E., Sette, A., & Peters, B. (2008). ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics, 9*, 514. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514

Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B., & Nielsen, M. (2021). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif

deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research, 48*(W1), W449–W454. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa379

Al-Malki, E. (2021). Toxoplasmosis: Stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. *Saudi Journal of Biological Sciences, 28*(1), 962–969. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.007

Smith, N. C., Goulart, C., Hayward, J. A., Kupz, A., Miller, C. M., & van Dooren, G. G. (2021). Control of human toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology, 51*(2–3), 95–121. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001

Wan, C., Zhang, J., Zhao, L., Cheng, X., Gao, C., Wang, Y., Xu, W., Zou, Q., & Gu, J. (2019). Rational design of a chimeric derivative of PcrV as a subunit vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Immunology, 10*, 781. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00781

World Health Organization (WHO). (2022). *Recomendaciones provisionales sobre el uso de la vacuna BNT162b2 de Pfizer y BioNTech contra la COVID-19 en el marco de la Lista OMS de Uso en Emergencias*. https://www.who.int/groups/strategic-advisory-group-of-experts-on-immunization/covid-19-materials

Yassein, A. A. M., Teleb, A. A., Hassan, G. M., & El Fiky, Z. A. (2021). The immune response and protective efficacy of a potential DNA vaccine against virulent *Pasteurella multocida*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s43141-021-00180-9

Yurina, V., & Adianingsih, O. R. (2022). Predicting epitopes for vaccine development using bioinformatics tools. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy, 10*, 25151355221100218. https://doi.org/10.1177/25151355221100218

Zhou, X., Zheng, W., Li, Y., Pearce, R., Zhang, C., Bell, E. W., Zhang, G., & Zhang, Y. (2022). I-TASSER-MTD: A deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols, 17*(10), 2326–2353. https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0

Zhu, Y., Xu, Y., Hong, L., Zhou, C., & Chen, J. (2021). Immunization with a DNA vaccine encoding the *Toxoplasma gondii*'s GRA39 prolongs survival and reduces brain cyst formation in a murine model. *Frontiers in Microbiology, 12*, 630682. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630682