



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Investigación *in silico* de proteínas superficiales de
Sarcocystis spp. (*Apicomplexa: Sarcocystidae*) que
podrían causar reacción cruzada en el diagnóstico
serológico de *Toxoplasma gondii* (*Apicomplexa:
Sarcocystidae*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

FERNANDO AARÓN ROSAS BRUNO

DIRECTOR: Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana

**CODIRECTOR: M.V.Z. Gabriela Fuentes
Cervantes**



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de
México, 2022.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Each living creature must be looked as a microcosm a little universe, formed of a host of self-propagating organisms, inconceivably minute and as numerous as the stars in heaven.”

“Cada criatura viviente debe verse como un microcosmos, un pequeño universo, formado por una multitud de organismos que se propagan a sí mismos, inconcebiblemente diminutos y tan numerosos como las estrellas del cielo”.

Charles Darwin, 1868.



DEDICATORIA

A mis abuelitos, Petra y Jorge.

A mi hermano, Iván.

A mis padres, Alba y Jorge.

A mis tíos, Moni, Rubén y Lupita

A Fany.

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelitos, Petra y Jorge. Gracias por todo el amor, la sabiduría y por hacerme la persona que soy, sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible.

A mi hermano Iván. Gracias por todas las enseñanzas, los regaños, por estar en todos los momentos importantes en mi vida y por hacer que no perdiera el suelo.

A mis padres, Alba y Jorge. Gracias por darme todo el apoyo y confianza que me ayudaron a concluir esta etapa tan importante de mi vida.

A mis tíos, Moni, Rubén y Lupita. Gracias por creer en mí, por sus cuidados y apoyo incondicional.

A Fany. Gracias por ser mi compañera, por el apoyo y por darme los ánimos necesarios para concluir la licenciatura.

Al Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana. Gracias por compartir conmigo algo de su vasto conocimiento de la rama de la Inmunoparasitología, por su entusiasmo y por permitirme formar parte de su laboratorio.

A la Dra. Gabriela Fuentes Cervantes. Gracias por brindarme su apoyo, conocimiento y por confiar en mis habilidades para realizar este trabajo.

A todo el personal del Laboratorio de Inmunoparasitología del InDRE, Secretaría de Salud y al Área de Microbiología en Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Gracias por brindarme las herramientas necesarias para concluir este trabajo.

A mis amigas, Dany, Paty y Monse. Gracias por su amistad, por creer en mí cuando ni yo mismo lo hacía, por estar y por apoyarme en los momentos que más lo necesitaba.

A Alexis, Daniel, Javier y Jossael. Gracias por ser mis compañeros de aventuras durante la carrera y por compartir momentos de conocimiento, alegrías, tristezas y estrés.

A todos esos amigos de la primaria, secundaria, preparatoria, universidad y laboratorio que formaron parte de este camino y que, en algunos casos, fueron importantes en mi vida. Los recuerdo con mucho cariño.

A ti lector. Gracias por tomarte unos minutos de tu tiempo en leer este trabajo tan importante para mí.

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas	3
1. Introducción	4
1.1 Toxoplasma gondii	4
1.1.1 Formas infectantes de <i>Toxoplasma gondii</i>	4
1.1.2 Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
1.1.3 Diagnóstico de la toxoplasmosis	8
1.1.4 Epidemiología.....	11
1.2 Sarcocystis spp.	16
1.2.1 Formas infectantes de <i>Sarcocystis spp.</i>	17
1.2.2 Ciclo biológico de <i>Sarcocystis spp.</i>	19
1.2.3 Diagnóstico de la sarcocistosis	20
1.2.4 Epidemiología.....	22
1.3 Hospedadores compartidos del Phylum Apicomplexa	24
1.4 Moléculas compartidas	24
1.5 Modelamiento de proteínas y docking molecular	25
1.5.1 Modelamiento de proteínas	25
1.5.2 Docking molecular	25
1.6 Antecedentes	26
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares.....	29
5. Materiales y métodos	29
5.1 Búsqueda de proteínas superficiales y de organelos secretorios.....	29
5.2 Estructura del anticuerpo de <i>Toxoplasma gondii</i> por difracción de rayos X.....	29
5.3 Modelado tridimensional	30
5.3.1 Por homología a través de SWISS-MODEL	30
5.3.2 Por AlphaFold2	30
5.4 Acoplamiento molecular proteína-proteína (Docking molecular).....	31
6. Resultados	32
6.1 Búsqueda de proteínas superficiales y de organelos secretorios.....	32
6.2 Estructura del anticuerpo de <i>Toxoplasma gondii</i> por difracción de rayos X.....	37
6.3 Modelado tridimensional	38
6.3.1 Por homología	38
6.3.2 Por AlphaFold2	38
6.4 Acoplamiento molecular proteína-proteína (Docking molecular).....	41

7. <i>Discusión</i>	45
8. <i>Conclusión</i>	50
9. <i>Referencias</i>	51
<i>Anexo 1: Determinación de las relaciones de las secuencias aminoacídicas de Toxoplasma gondii y Sarcocystis spp.</i>	61
<i>Anexo 2: Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas superficiales y de organelos secretorios de Sarcocystis spp.</i>	62
<i>Anexo 3: Predicción de las estructuras secundarias de las proteínas de Sarcocystis spp. a través del servidor web SOPMA</i>	63
<i>Anexo 4: Validación de las proteínas modeladas</i>	64
<i>Anexo 5: Docking molecular proteína-proteína con otro tipo de interacciones entre las moléculas interectuanes</i>	67

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Taquizoíto de Toxoplasma gondii.</i>	5
<i>Figura 2. Colonia tisular y bradizoíto de Toxoplasma gondii.</i>	6
<i>Figura 3. Ooquistes de Toxoplasma gondii.</i>	7
<i>Figura 4. Ciclo biológico de Toxoplasma gondii.</i>	10
<i>Figura 5. Informes de seropositividad de la toxoplasmosis en Europa, América y Asia.</i>	13
<i>Figura 6. Informes de seroprevalencia de toxoplasmosis en México.</i>	15
<i>Figura 7. Colonia tisular y bradizoíto de Sarcocystis spp.</i>	18
<i>Figura 8. Diagnóstico diferencial de especies coinfectantes.</i>	18
<i>Figura 9. Microfotografía de ooquistes de Sarcocystis muris.</i>	19
<i>Figura 10. Ciclo biológico de Sarcocystis spp.</i>	21
<i>Figura 11. Informes de humanos con sarcocistosis extraintestinal.</i>	23
<i>Figura 12. Informes de humanos con sarcistosis intestinal adquirida de forma natural.</i>	23
<i>Figura 13. Diseño experimental.</i>	32
<i>Figura 14. Estructura de la forma monomérica del antígeno superficial 1 (SAG1) de Toxoplasma gondii unido a un fragmento de unión a antígeno (Fab) murino.</i>	37
<i>Figura 15. Tratamiento de la estructura de la forma monomérica del antígeno superficial 1 (SAG1) de Toxoplasma gondii unido a un fragmento de unión a antígeno (Fab) murino.</i>	38
<i>Figura 16. Predicción de las estructuras terciarias por homología hechas por la herramienta SWISS-MODEL para los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona.</i>	39
<i>Figura 17. Predicción de las estructuras terciarias por AlphaFold2 para los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona.</i>	40
<i>Figura 18. Interacciones intermoleculares (puentes de hidrógeno) del fragmento de unión a antígeno (Fab) y el antígeno superficial 1 (SAG1) de Toxoplasma gondii.</i>	41
<i>Figura 19. Comparación estructural del fragmento de unión a antígeno (Fab) y el antígeno superficial 1 (SAG1) de Toxoplasma gondii.</i>	42
<i>Figura 20. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona a través del servidor web ClusPro modelados por homología (puentes de hidrógeno).</i>	42
<i>Figura 21. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona a través del servidor web ClusPro modelados por AlphaFold2 (puentes de hidrógeno).</i>	43
<i>Figura 22. Validación de las proteínas modeladas por homología a través de PROCHECK de los antígenos superficiales SAG 1-6 de Sarcocystis neurona.</i>	65
<i>Figura 23. Validación de las proteínas modeladas por AlphaFold2 a través de PROCHECK de los antígenos superficiales SAG 1-6 de Sarcocystis neurona.</i>	66
<i>Figura 24. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona a través del servidor web ClusPro modelados por homología (cargas interpoladas).</i>	67
<i>Figura 25. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona a través del servidor web ClusPro modelados por homología (hidrofobicidad).</i>	68
<i>Figura 26. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona a través del servidor web ClusPro modelados por AlphaFold 2 (cargas interpoladas).</i>	69
<i>Figura 27. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de Sarcocystis neurona a través del servidor web ClusPro modelados por AlphaFold2 (hidrofobicidad).</i>	70

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resumen de los métodos serológicos para la detección de la infección por T. gondii.</i>	11
<i>Tabla 2. Rangos de seropositividad en Europa, América y Asia.</i>	12
<i>Tabla 3. Seroprevalencia de Toxoplasma gondii en humanos adultos de México.</i>	14
<i>Tabla 4. Reactividad cruzada probada con diferentes técnicas y organismos Apicomplexos.</i>	26
<i>Tabla 5. Proteínas superficiales encontradas en las bases de datos de Sarcocystis spp. .</i> 32	
<i>Tabla 6. Puntuación generada por el servidor web ClusPro para el acoplamiento molecular del antígeno superficial de Toxoplasma gondii y el fragmento de unión a antígeno.</i>	44
<i>Tabla 7. Puntuaciones generadas por el servidor web ClusPro para el acoplamiento molecular de los antígenos superficiales de Sarcocystis neurona (generados por homología) y el fragmento de unión a antígeno.</i>	44
<i>Tabla 8. Puntuaciones generadas por el servidor web ClusPro para el acoplamiento molecular de los antígenos superficiales de Sarcocystis neurona (generados por AlphaFold2) y el fragmento de unión a antígeno.</i>	44
<i>Tabla 9. Comparación de secuencias aminoacídicas de Sarcocystis spp. y Toxoplasma gondii por medio de BLAST.</i>	61
<i>Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas superficiales de Sarcocystis spp.</i> 62	
<i>Tabla 11. Predicción de las estructuras secundarias de las proteínas de Sarcocystis spp a través de SOPMA.</i>	63
<i>Tabla 12. Validación de las proteínas modeladas a través de QMEAN de los antígenos superficiales SAG 1-6 de Sarcocystis neurona.</i>	64

Resumen

Datos epidemiológicos estiman que un tercio de la población humana tiene anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* (*Apicomplexa: Sarcocystidae*); sin embargo, existe la posibilidad de que la frecuencia de seropositividad se encuentre sobreestimada como resultado de la presencia de anticuerpos de reactividad cruzada originados por organismos cercanos filogenéticamente, como *Sarcocystis*, que es un parásito zoonótico insuficientemente estudiado. En este trabajo se investigaron *in-silico* proteínas superficiales de *Sarcocystis spp.* que pudieran causar reacción cruzada en el diagnóstico serológico de *Toxoplasma gondii*. Se buscaron secuencias primarias de proteínas superficiales de *Sarcocystis spp.* en bases de datos especializadas, las cuales se modelaron tridimensionalmente por dos métodos, homología y AlphaFold2 y, luego se llevó a cabo un docking molecular usando ClusPro con un anticuerpo cristalizado contra el antígeno superficial 1 (SAG1) de *T. gondii*. Se encontraron 227 secuencias primarias de *Sarcocystis spp.*, de las cuales, 23 fueron completas y correspondían a antígenos superficiales. De estas últimas, sólo 6 secuencias cumplían mejor con los requerimientos para el estudio. Cada secuencia se utilizó para generar un modelo por homología y un modelo por AlphaFold2, produciendo un total de 12 modelos tridimensionales. Luego de llevar a cabo el docking molecular con cada modelo de proteína de *Sarcocystis* y el modelo de anticuerpo contra *Toxoplasma*, se elaboraron tablas de aminoácidos interactuantes y se encontró que dos proteínas de *Sarcocystis spp.* interactuaron con 70 y 68 aminoácidos del anticuerpo cristalizado contra *Toxoplasma*; las otras 10 secuencias de *Sarcocystis* interactuaron con 39 a 59 aminoácidos del anticuerpo mencionado. El antígeno superficial 3 (SAG3) y el antígeno superficial 2 (SAG2) de *Sarcocystis neurona* modelado por homología y por AlphaFold2 respectivamente tienen probabilidad de generar reactividad cruzada debido a la mayor cantidad de aminoácidos interactuantes. Nuevos estudios deben llevarse a cabo para constatar los datos por métodos experimentales.

Palabras clave: *Reactividad cruzada; Toxoplasma gondii, Sarcocystis spp.; in-silico; docking molecular.*

Abstract

Epidemiological data estimate that one third of the human population has antibodies against *Toxoplasma gondii* (*Apicomplexa: Sarcocystidae*); however, there is a possibility that the frequency of seropositivity is overestimated because of the presence of cross-reactive antibodies originating from phylogenetically close organisms, such as *Sarcocystis*, which is an insufficiently studied zoonotic parasite. In this work, *Sarcocystis spp.* surface proteins were investigated *in-silico* that could cause cross reaction in the serological diagnosis of *Toxoplasma gondii*. Primary sequences of *Sarcocystis spp.* surface proteins were searched in specialized databases, which were three-dimensionally modeled by two methods, homology and AlphaFold2, and then molecular docking was carried out using ClusPro with a crystallized antibody against the surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*.

A total of 227 *Sarcocystis spp.* primary sequences were found; of which 23 were complete and corresponded to surface antigens. Of the latter, but only 6 sequences better met the requirements for this study. Each sequence was used to generate a homology model and an AlphaFold2 model, yielding a total of 12 three-dimensional models. After performing molecular docking with each *Sarcocystis* protein model and the *Toxoplasma* antibody model, interacting amino acid tables were constructed and it was found that two *Sarcocystis spp.* they interacted with 70 and 68 amino acids of the crystallized antibody against *Toxoplasma*; the other 10 *Sarcocystis* sequences interacted with 39 to 59 amino acids of the aforementioned antibody. *Sarcocystis neurona* surface antigen 3 (SAG3) and surface antigen 2 (SAG2) modeled by homology and by AlphaFold2, respectively, are likely to generate cross-reactivity due to the greater amount of interacting amino acids. New studies should be carried out to verify the data by experimental methods.

Key words: *Cross-reaction; Toxoplasma gondii, Sarcocystis spp.; in-silico; molecular docking.*

Abreviaturas

<i>DT</i>	<i>Dye test o prueba de tinte</i>
<i>ELISA</i>	<i>Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas</i>
<i>Epítopo</i>	<i>Porción de una molécula que es reconocida por el sistema inmunitario</i>
<i>Fab</i>	<i>Fragmento de unión a antígeno</i>
<i>IFAT</i>	<i>Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes</i>
<i>IgA</i>	<i>Inmunoglobulina tipo A</i>
<i>IgG</i>	<i>Inmunoglobulina tipo G</i>
<i>IgM</i>	<i>Inmunoglobulina tipo M</i>
<i>IHA</i>	<i>Ensayo de hemaglutinación indirecta</i>
<i>ISAGA</i>	<i>Ensayo de aglutinación inmunoabsorbente</i>
<i>LAT</i>	<i>Pruebas de aglutinación de látex</i>
<i>MAT</i>	<i>Prueba de aglutinación modificada</i>
<i>MIC</i>	<i>Micronema</i>
<i>N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>
<i>Parátopo</i>	<i>Sitio específico complementario al epítopo encontrado en el anticuerpo.</i>
<i>S. heydorni</i>	<i>Sarcocystis heydorni</i>
<i>S. hominis</i>	<i>Sarcocystis hominis</i>
<i>S. neurona</i>	<i>Sarcocystis neurona</i>
<i>S. suihominis</i>	<i>Sarcocystis suihominis</i>
<i>SAG1</i>	<i>Antígeno superficial 1</i>
<i>SRS</i>	<i>Antígenos relacionados con SAG1</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

1. Introducción

1.1 Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii es un protozooario parásito intracelular obligado perteneciente al *Phylum Apicomplexa*, clase Esporozoa, subclase *Coccidia*, orden *Eucoccidida* y Familia *Sarcocystidae* (Dubey et al., 1998; Petersen & Dubey, 2001; Gómez y Mondragón, 2014). Los organismos pertenecientes a dicho *Phylum* se caracterizan por presentar un complejo apical conformado por una serie de organelos secretorios y un organelo endosimbiótico denominado apicoplasto (Dubey et al., 1998).

Este organismo es el causante de la toxoplasmosis, una enfermedad zoonótica de alta prevalencia en el mundo que parasita a un gran número de hospedadores vertebrados en los cuales el padecimiento ocasiona abortos, muertes neonatales y mortinatos, especialmente en ovejas, cabras y cerdos, causando pérdidas económicas (Deshmukh et al., 2021).

En el ser humano, la toxoplasmosis suele ser asintomática; sin embargo, infecciones severas pueden llegar a ser mortales causando padecimientos congénitos y complicaciones en personas inmunocomprometidas (Blader & Saeij, 2009; Macêdo et al., 2013; Weiss & Dubey, 2009). En mujeres embarazadas, las parasitosis por *T. gondii* pueden provocar abortos, si la infección ocurre en los primeros meses de gestación. Si la parasitosis ocurre en el tercer trimestre del embarazo, en el neonato se observan malformaciones, hidrocefalia y microcefalia (Montoya & Liesenfeld, 2004). La reactivación de una parasitosis latente en individuos inmunocomprometidos puede causar encefalitis toxoplasmática mortal, miocarditis y neumonitis (Eza & Lucas, 2006; Liu et al., 2015; Saadatinia & Golkar, 2012).

1.1.1 Formas infectantes de Toxoplasma gondii

T. gondii cuenta con 3 etapas infectivas, taquizoítos (estado de desarrollo de replicación rápida que infecta de manera individual o en grupos), bradizoíto (estado de desarrollo de replicación lenta contenidos en colonias tisulares) y esporozoítos (estado de desarrollo ubicado en esporoquistes dentro de los ooquistes esporulados) (Montoya & Liesenfeld, 2004). Estas etapas son importantes para todos los hospedadores y cuentan con características particulares (bioquímicas y morfológicas) que les permiten continuar con el desarrollo biológico del parásito, así como en la evasión del sistema inmunológico de los organismos infectados (Gómez y Mondragón, 2014).

Los taquizoítos son estructuras con forma de medialuna de 2 por 6 μm , con un extremo anterior conoidal puntiagudo y un extremo posterior redondeado (**Fig. 1**). Estas estructuras son metabólicamente activas y son susceptibles a agentes usados para tratar infecciones ocasionadas por coccidios (Lindsay & Dubey, 2020). Los taquizoítos se desplazan por ondulación, difusión o rotación (Dubey et al., 1998) y pueden infectar de forma activa cualquier célula nucleada del organismo hospedador. La multiplicación de los taquizoítos se lleva a cabo de manera asexual mediante de un proceso denominado endodiogenia, en donde se forman dos células hijas en el citoplasma de una célula madre, la cual acaba desapareciendo (Dubey et al., 1998). El taquizoíto ocasiona una fuerte respuesta inflamatoria y destrucción tisular lo que conlleva a las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Montoya & Liesenfeld, 2004)

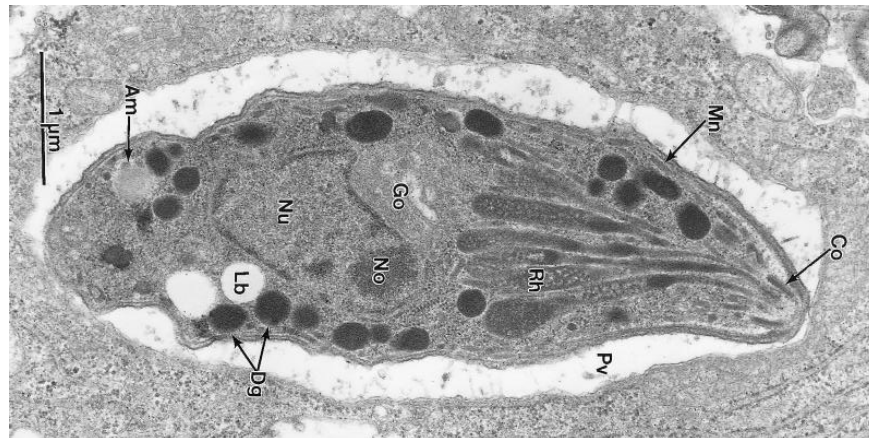


Figura 1. Taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. Microscopía electrónica de transmisión de la cepa VEG en célula peritoneal de ratón. Conoide (Co);, micronema (Mn); vacuola parasitófora (Pv); roptria (Rh); aparato de golgi (Go); nucleolo (No); núcleo (Nu); gránulos densos (Dg); gránulos de amilopectina (Am). Fotografía tomada de Dubey et al., 1998.

Los bradizoítos son formas sumamente parecidas a los taquizoítos, sin embargo, las principales características que permiten diferenciarlos son, (1) la disposición del núcleo dentro de la estructura parasitaria, (2) el grosor y, (3) la manera en la que estos se encuentran en el hospedador. En los bradizoítos, el núcleo celular se encuentra en la parte posterior de la estructura, mientras que en los taquizoítos el núcleo se encuentra en la zona media. A pesar de ser una característica clave, solo se puede observar a través de microscopías que permitan distinguir los organelos celulares. Por otro lado, los bradizoítos son estructuras más delgadas que los taquizoítos y se encuentran contenidos dentro de las colonias tisulares (Lindsay & Dubey, 2020).

Las colonias tisulares varían en tamaño desde 5 a más de 70 μm de diámetro y contienen de unos pocos a varios cientos de bradizoíto, cada uno, de 7.0 por 1.5 μm (**Fig. 2**) (Dubey *et al.*, 1998). Estas estructuras se pueden desarrollar en órganos viscerales, incluidos los pulmones, el hígado y los riñones, aunque son más prevalentes en tejidos musculares y neuronales como el cerebro, los ojos, los músculos esqueléticos y los cardiacos (Montoya & Liesenfeld, 2004). La colonia tisular puede persistir durante toda la vida del hospedador y no causar alguna complicación grave. Se cree que las colonias tisulares liberan periódicamente bradizoíto, mismos que son destruidos rápidamente por el sistema inmunológico de los hospedadores, lo que contribuye a la exposición de por vida y a la inmunidad continua al parásito (Lindsay & Dubey, 2020).

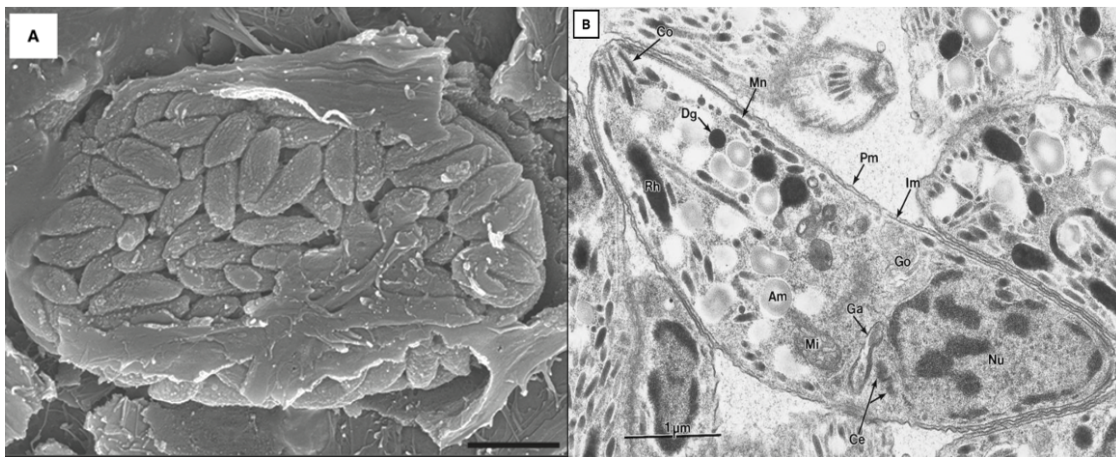


Figura 2. Colonia tisular y bradizoíto de *Toxoplasma gondii*. A) Microscopía electrónica de barrido. Quiste en células CRFK 13 dpi (días posteriores a la infección). Se observan bradizoíto dentro de la estructura antes señalada. 5 μm Fotografía tomada de (de Muno *et al.*, 2014) B) Microscopía electrónica de transmisión. Bradizoíto. Se observan algunas estructuras del estadio. Conoide (Co); centriolos (Ce); micronema (Mn); mitocondria (Mi); plasmalema (Pm); complejo de membrana interna (Im) roptría (Rh); aparato de golgi (Go); apicoplasto o golgi adjunto (Ga); núcleo (Nu); gránulos densos (Dg); gránulos de amilopectina (Am). 1 μm . Fotografía tomada de Dubey *et al.*, 1998.

Al igual que los bradizoíto, los esporozoíto son estructuras similares a los taquizoíto ya que cuentan con un núcleo subterminal, sin embargo, lo que permite diferenciarlos es que los esporozoíto cuentan con un mayor número de micronemas, roptrías y gránulos de amilopectina, miden de 6 a 8.2 μm y están contenidos dentro de ooquistes. Estas últimas estructuras son de forma esférica o subsférica de 10 a 12 μm de diámetro. Los ooquistes, al completar un proceso denominado esporulación, contienen en su interior 2

estructuras de forma elipsoidal denominadas esporoquistes, las cuales, envuelven a 4 esporozoítos cada una (**Fig. 3**) (Montoya & Liesenfeld, 2004; Gómez y Mondragón, 2014).

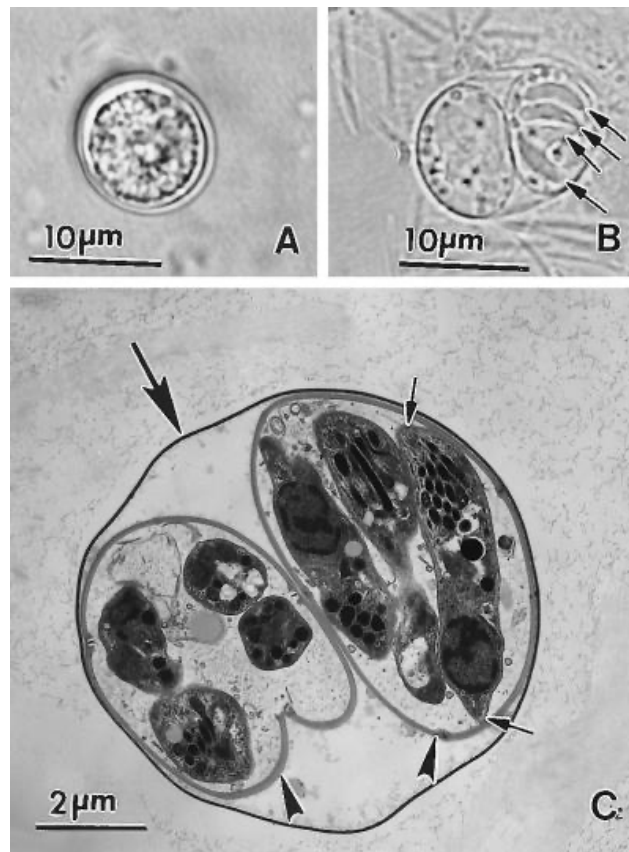


Figura 3. Ooquistes de *Toxoplasma gondii*. A) Ooquiste sin esporular. Se observa el esporonte en su interior. B) Ooquiste esporulado con dos esporoquistes que en su interior tienen 4 esporozoitos (flechas). C) Microscopía electrónica de transmisión. Ooquiste esporulado. Se observa la pared del ooquiste (flecha grande), dos esporoquistes (cabezas de flecha) y dentro de ellas se observan los esporozoitos (flechas). Fotografía tomada de Dubey et al., 1998.

1.1.2 Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

El ciclo inicia cuando algún miembro de la familia *Felidae*, el cual funge como hospedador definitivo, consume algún tejido infectado por colonias tisulares. Tras la ingesta, se digiere la pared de la colonia con ayuda de enzimas proteolíticas, liberando a los bradizoítos. Las estructuras antes mencionadas penetran en la lámina propia del intestino delgado en donde algunas de ellas se diferencian en taquizoítos que se diseminan en tejidos extraintestinales, mientras que otros bradizoítos realizan un proceso de reproducción asexual, el cual consta de 5 ciclos de esquizontes (del tipo A al E), para que en algún momento se

produzcan las formas sexuales. Dichas diferenciaciones están mediadas por factores microambientales que les permiten convertirse en una u otra estructura de la etapa de desarrollo (Augusto et al., 2020). Cierta número de esquizontes se transforman en microgametocitos (células masculinas) que producen microgametos, pero la gran mayoría se diferencia en estructuras femeninas (macrogametocitos) que serán fertilizadas por los microgametos y formarán un cigoto. El cigoto forma la pared del ooquiste alrededor de las células esporantes y cuando los ooquistes maduran, son arrojados al lumen intestinal del hospedador definitivo por la ruptura de las células epiteliales que anteriormente fueron infectadas (**Fig. 4**) (Lindsay & Dubey, 2020; Speer & Dubey, 2005).

Los ooquistes sin esporular son expelidos junto con las heces fecales del hospedador definitivo y esporulan, dependiendo de las condiciones ambientales como humedad, oxígeno y temperatura. Los ooquistes esporulados son las estructuras infectivas. La esporulación puede tardar entre 1 a 21 días; sin embargo, se sabe que los ooquistes sin esporular pueden persistir en el ambiente durante un periodo prolongado (de 2 a 3 meses) (Jackson & Hutchison, 1989; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Los hospedadores intermediarios se pueden infectar de dos formas; la primera de ellas es a través del consumo de alimentos contaminados con ooquistes esporulados o bien por la ingesta de alimentos crudos o poco cocidos que contengan quistes tisulares, mientras que la segunda es por transmisión transplacentaria de la madre al feto (Dubey et al., 1998; Lindsay & Dubey, 2020).

Una vez dentro de su hospedador intermediario, la pared de los ooquistes es degradada y se liberan los esporozoítos. Estos últimos, al igual que los bradizoítos, penetran las células epiteliales del intestino, se multiplican como taquizoítos de manera local y posteriormente se diseminan en el cuerpo del organismo hospedador a través de la sangre o la linfa infectando de esta manera a órganos distales y prácticamente a cualquier célula del individuo (Lindsay & Dubey, 2020). Después de unos cuantos ciclos de multiplicación los taquizoítos dan lugar a bradizoítos que experimentan una etapa de transformación para producir colonias tisulares (**Fig. 4**).

1.1.3 Diagnóstico de la toxoplasmosis

En la actualidad el diagnóstico de la toxoplasmosis se hace mediante métodos biológicos (detección de estructuras infectivas en alimentos o materia fecal), serológicos (detección de

anticuerpos en fluidos), moleculares (identificación de material genético del parásito), histológicos (detección de antígenos del parásito en tejidos), o bien, por la combinación de estos (Liu et al., 2015). Por otro lado, estas pruebas son determinantes para realizar un diagnóstico correcto ya que los signos clínicos que se presentan durante la parasitosis severa no son específicos y se comparten con algunas otras enfermedades infecciosas (Boothroyd & Grigg, 2002; Liu et al., 2015; Tenter et al., 2000).

Las pruebas serológicas son las más utilizadas para la detección de la toxoplasmosis. Ensayos como la prueba de tinte (DT), la prueba de aglutinación modificada (MAT), los ensayos de hemaglutinación indirecta (IHA), la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT), las pruebas de aglutinación directa, las pruebas de aglutinación de látex (LAT), el ensayo de aglutinación inmunoabsorbente (ISAGA) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son ejemplo de ello (**Tabla 1**). Actualmente el ELISA es el método más utilizado debido a que permite identificar anticuerpos específicos de las clases IgM, IgG e IgA, principalmente contra un antígeno lisado de taquizoíto de *T. gondii*. La técnica utiliza como muestra biológica sueros o algún otro fluido (Deshmukh et al., 2021; Montoya & Rosso, 2005). No obstante, pese a ser una prueba ampliamente utilizada, diversas investigaciones han demostrado que el ELISA tiene una sensibilidad diagnóstica limitada en el serodiagnóstico de la toxoplasmosis debido a la presencia de múltiples moléculas con relaciones homólogas de parásitos cercanos filogenéticamente y podrían ser la causa de la reactividad cruzada tanto en esta como en otras pruebas diagnósticas serológicas (Deshmukh et al., 2021; Macêdo et al., 2013).

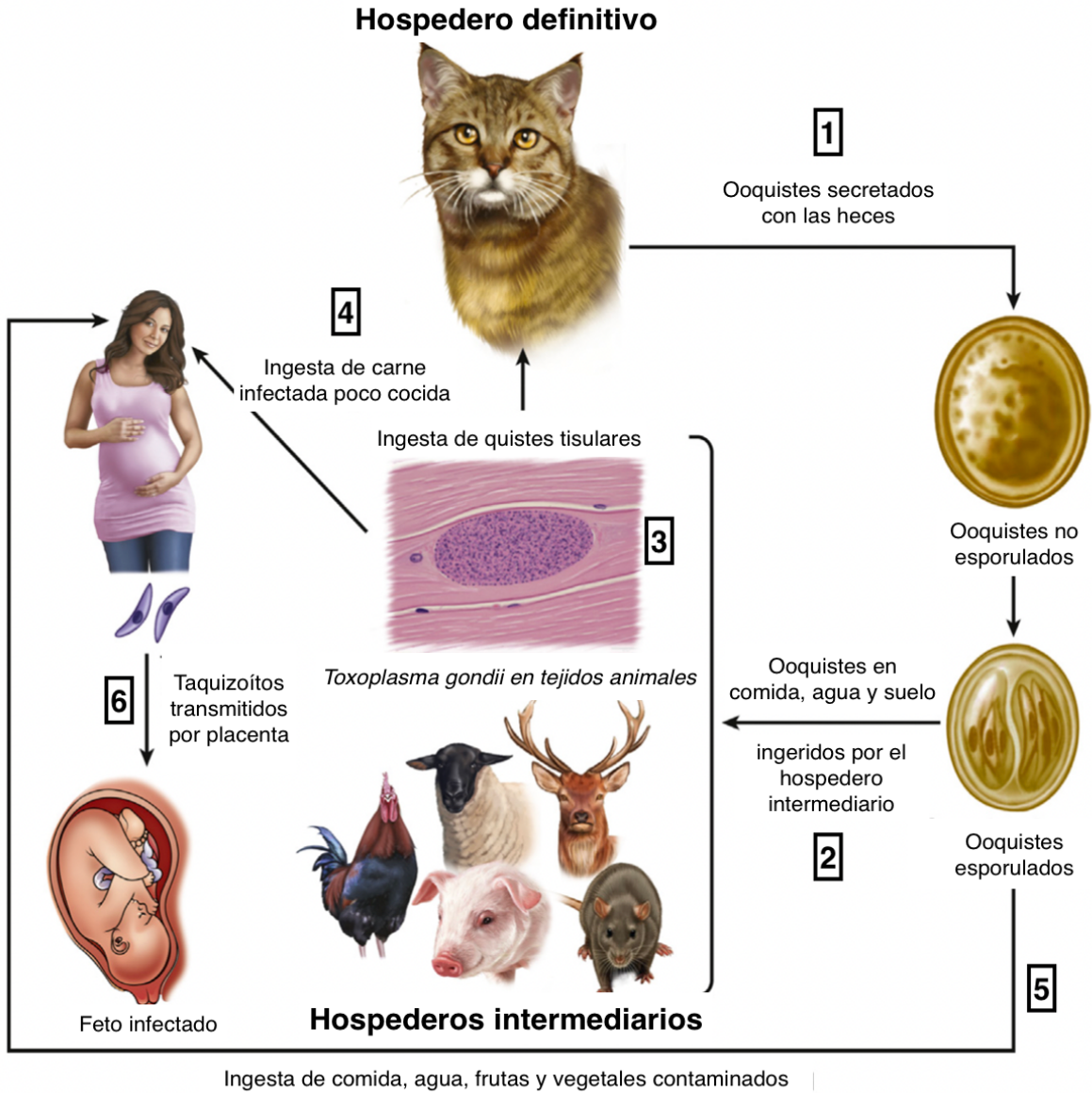


Figura 4. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. 1) Los felinos eliminan los ooquistes al ambiente. 2) Los ooquistes esporulados son consumidos en los alimentos por los hospedadores intermediarios. 3) Formación de quistes tisulares en tejidos de los hospedadores intermediarios. 4) Infección por ingesta de tejidos que contienen quistes tisulares. 5) Infección por ingesta de alimentos contaminados por ooquistes esporulados. 6) Infección vertical (vía transplacentaria) madre-feto. Modificado de Lindsay & Dubey, 2020.

Tabla 1. Resumen de los métodos serológicos para la detección de la infección por *T. gondii*.

<i>Métodos serológicos</i>	<i>Antígenos o anticuerpos utilizados</i>	<i>Tipo de antígeno/anticuerpo probado</i>
DT	Taquizoíto vivo	IgG, IgM, IgA
MAT	Taquizoíto fijado con formalina	IgG
IFAT	Taquizoíto entero inactivado	IgG, IgM
IHA	Glóbulos rojos curtidos sensibilizados con antígenos solubles	IgG
ELISA	Antígeno de taquizoíto lisado, antígenos recombinantes, anticuerpos específicos	IgG, IgM, IgA y antígenos
ISAGA	Anticuerpos IgM anti-humanos	IgM
LAT	Partículas de látex recubiertas de antígenos solubles	IgG, IgM
PIA	Nanopartículas de oro recubiertas de antígeno	IgG
WB	Antígeno de taquizoíto lisado, antígenos recombinantes	IgG, IgM
TIC	Antígenos o anticuerpos etiquetados con oro coloidal	IgG, ESA
Prueba de avidéz	Antígeno de taquizoíto lisado, antígenos recombinantes	IgG, IgA, IgE

Cuadro modificado de Liu et al., 2015.

1.1.4 Epidemiología

Datos seroepidemiológicos mencionan que aproximadamente un tercio de la población mundial está parasitada con *T. gondii* de manera crónica o al menos tuvo contacto con el organismo, dichos estudios refieren que la prevalencia de la toxoplasmosis varía entre un 10% a un 80% dependiendo del estatus económico, cultural y de salud de las personas (Macêdo et al., 2013; Montoya & Rosso, 2005; Tenter et al., 2000). De igual forma, se conoce que las seroprevalencias también varían dentro de un país entre comunidades de una misma región (Pappas et al., 2009).

En general, se han observado bajas seroprevalencias (10 al 30 %) en América del Norte, en el sudeste asiático, en el norte de Europa y en los países sahelianos de África. Seroprevalencias moderadas (30 al 50 %) han sido registradas en países de Europa Central y meridional, mientras que las seroprevalencias más altas se han registrado en América Latina y en países de África Tropical (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). En el cuadro 2, se muestra un resumen de los rangos de seroprevalencias de diferentes países del mundo.

Tabla 2. Rangos de seropositividad en Europa, América y Asia.

Continente	País	Año	Seropositividad (%)
<i>Europa (oeste)</i>	Austria	1998	43
	Belgica	1997	50
	Francia	2001	>75
	Alemania	2004	26-54
	Italia	2001	18-60
	Países Bajos	2004	40.5
	España	2004	28.6
	Suiza	1995	46
<i>Europa (escandinavia)</i>	Dinamarca	1999	27.8
	Finlandia	1995	20.3
	Noruega	1998	10.9
	Suecia	2001	14-29.4
<i>Europa (centro y este)</i>	Croacia	2000	38.1
	Polonia	2001	46.4-58.5
	Eslovenia	2002	34
	Reino Unido	1998	57-93
	Yugoslavia	1992	23-33
<i>América (norte)</i>	Estados Unidos	2004	16-40
<i>América (centro)</i>	Costa Rica	1996	76
	Cuba	1993	60
	México	2001	35
	Panamá	1988	90*
<i>América (sur)</i>	Argentina	2001	72
	Brasil	2001	59
	Antillas y Bahamas	1991	29.7
<i>Asia (sudeste)</i>	Indonesia	2000	58
	Malasia	2004	44.8
	Tailandia	1992, 1997, 2000, 2001	2.3-21.9

*Mayores de 60 años.

Modificada de Sukthana, 2006.

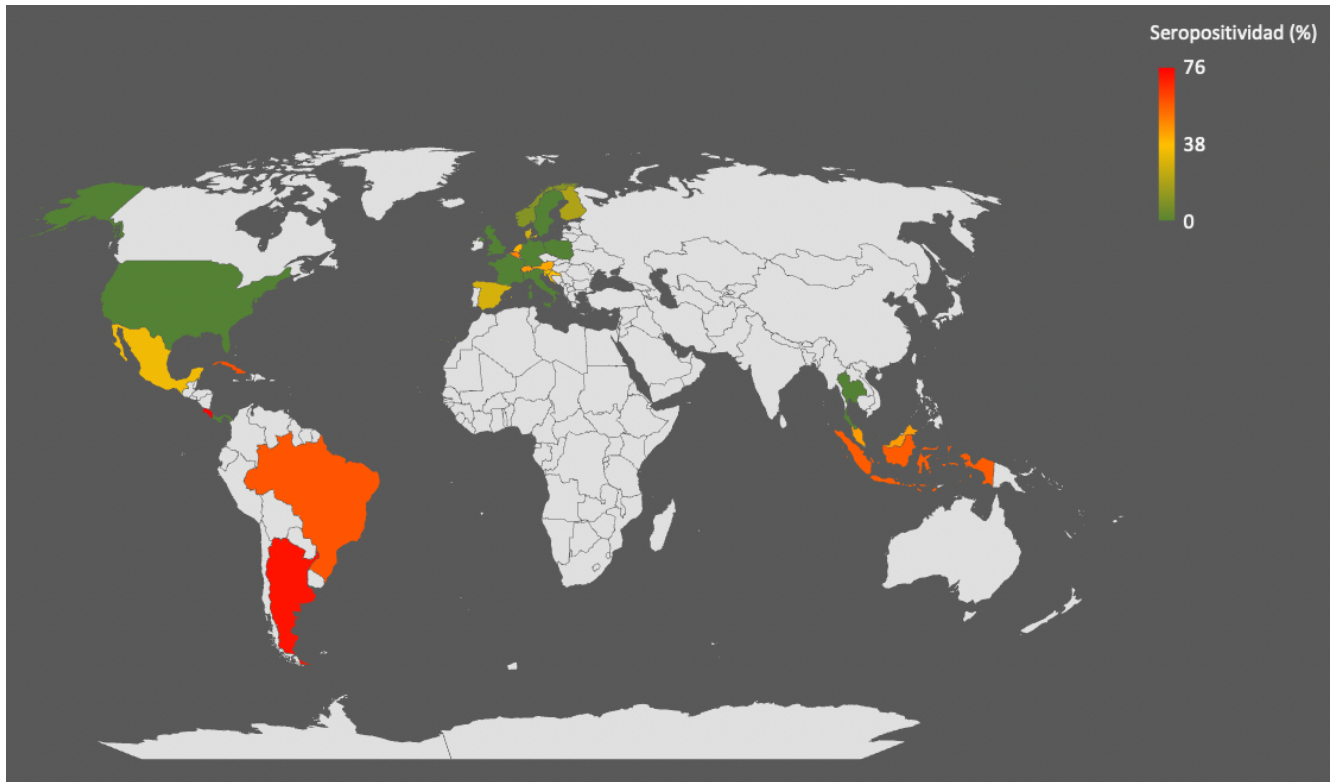


Figura 5. Informes de seropositividad de la toxoplasmosis en Europa, América y Asia. Se muestran los porcentajes de seropositividad de la toxoplasmosis reportados por Sukthana, 2006.

En México, la seroprevalencia de la toxoplasmosis humana varía de acuerdo con las condiciones climatológicas que predominan en la región, siendo las zonas costeras las que cuentan con un porcentaje mayor al del resto del país (Hernández-Cortazar et al., 2015). Asimismo, el incremento de la seroprevalencia de la enfermedad está relacionado a la presencia de gatos como mascota, al consumo de agua no tratada, a la ingesta de carne de ganado o de animales exóticos poco cocida y a las actividades relacionadas con el contacto de aguas residuales y suelo (**Tabla 3**) (Hernández-Cortazar et al., 2015; Montoya & Liesenfeld, 2004).

Tabla 3. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en humanos adultos de México.

<i>Estado</i>	Categoría	Año	Seropositividad (%)
<i>Durango</i>	Mujeres embarazadas	2006	6.1 IgG
	Pacientes con enfermedades mentales		18.2 IgG 4.4 IgM
	Donadores de sangre		8.9 IgG 2.2 IgM
	Donadores de sangre	2007	7.4 IgG 1.8 IgM
	Recicladores	2008	21.1 IgG 2.2 IgM
	Recolectores de residuos		8.4 IgG
	Población rural		23.8 IgG 2.2 IgM
	Mujeres embarazadas	2009	8.2 IgG 2.3 IgM
	Población rural (menonitas)	2010	30.3 IgG 3.3 IgM
	Plomeros		6.6 IgG
	Trabajadores de construcción		8.4 IgG 1.4 IgM
	Jardineros		6 IgG 2.4 IgM
	Pacientes con enfermedades mentales		20 IgG
	Población general	2011	5.3 IgG
	Población general		6.1 IgG 2.1 IgM
	Carniceros		7 IgG 4 IgM
	Población general		9 IgG 2 IgM
Pacientes con enfermedad hepática	13.3 IgG 2.7 IgM		
Población general	10.7 IgG 3.3 IgM		
Recolectores de frutas y verduras	7.5 IgG 1 IgM		
Población general	7.8 IgG 2.8 IgM		
Población rural	2012	22.4 IgG 9.6 IgM	
Pacientes con accidentes de trabajo		8.3 IgG 0.8 IgM	
Población general		5.3 IgG 2.3 IgM	
Personas de edad avanzada		12 IgG 2.9 IgM	
<i>Yucatán</i>	Mujeres con abortos espontaneos	1999	47
	Población general sin contacto con gatos	2011	25 IgG 37 IgM

	Mujeres con abortos espontaneos	2012	55 IgG 20 IgM
<i>Oaxaca</i>	Población general	1991	5.1
<i>Tabasco</i>	Población general	1992	67.5
<i>Estado de México</i>	Población general		32.1
<i>Baja California Sur</i>	Población general		17.4
<i>Ciudad de México</i>	Mujeres embarazadas Mujeres con abortos espontaneos	1995	34.9 IgG 20.7 IgM 44.9 IgG 33.3 IgM
<i>Chiapas</i>	Población general Mujeres embarazadas	1998	5 18
<i>Jalisco</i>	Población general propietarios gatos	1999	64 IgG

Modificado de (Hernández-Cortazar et al., 2015).

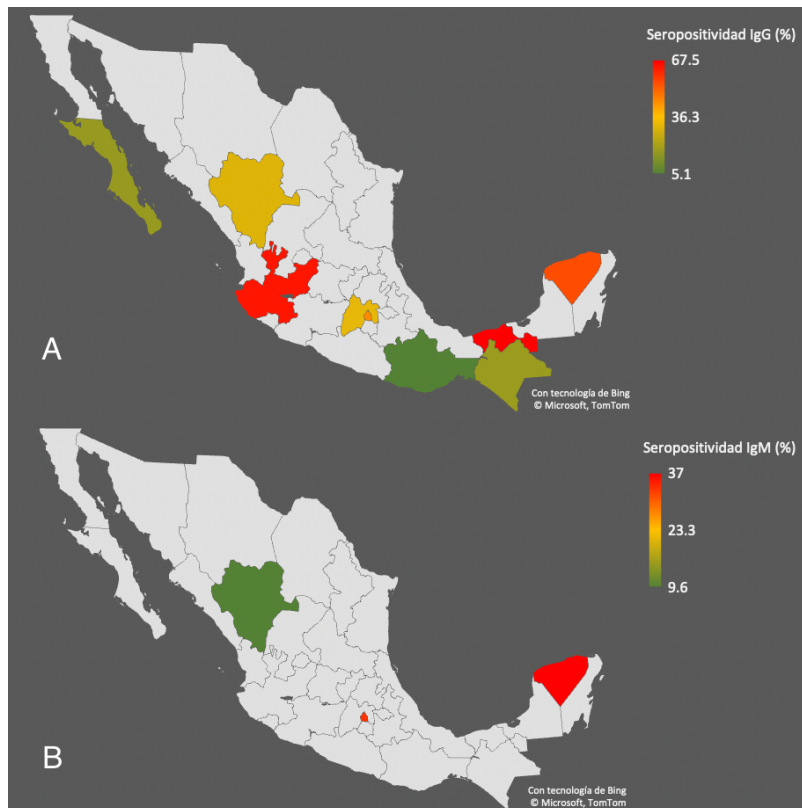


Figura 6. Informes de seroprevalencia de toxoplasmosis en México. Se muestran los porcentajes de seroprevalencia de la toxoplasmosis más altos reportados por Hernández-Cortazar et al., 2015.

1.2 *Sarcocystis spp.*

Sarcocystis es un género que pertenece al mismo *Phylum*, clase, orden y familia que *T. gondii*; no obstante, a diferencia de *Toxoplasma*, *Sarcocystis* es mucho más diverso en los tipos de animales que fungen como hospedadores intermediarios (que continen sarcoquistes) o como hospedadores definitivos (que pueden excretar ooquistes) (Lindsay & Dubey, 2020). Las especies pertenecientes al género *Sarcocystis* son cosmopolitas y pueden infectar a organismos cordados, entre los que se encuentran aves, reptiles, marsupiales y mamíferos (Fayer et al., 2015).

En la actualidad, a pesar de que se conocen más de 200 especies de *Sarcocystis*, sólo se tiene registro de 3 que pueden infectar al ser humano como hospedador intermediario, *Sarcocystis sui hominis*, *Sarcocystis hominis* y *Sarcocystis heydorni* (Dubey et al., 2016). Pese a ello, debido a que muchas de las especies hospedadoras, principalmente ganado, tienen contacto con el ser humano, es posible que puedan infectarlo de manera accidental y de esta manera incrementar la incidencia de casos.

La sarcocistosis suele ser asintomática y no tiene manifestaciones clínicas para los hospedadores intermediarios (Lindsay & Dubey, 2020). Sin embargo, cuando los síntomas se presentan, en animales destinados al consumo humano, como bovinos, ovejas y caballos, la industria ganadera tiene pérdidas económicas, ya que los animales presentan letargo, crecimiento deficiente, reducción de la producción de leche, cojera, pérdida de lana y cabello, condena de la canal en la inspección de la carne, así como la muerte (Fayer, 2004). Signos como fiebre, anorexia, anemia y demacración generalmente se observan durante fase aguda de la enfermedad (Lindsay & Dubey, 2020).

Asimismo, en animales preñados, la sarcocistosis, al igual que la toxoplasmosis, puede provocar abortos y realimentación o detenimiento en el desarrollo de las crías (Fayer, 2004). Otros signos que se pueden observar son lesiones macroscópicas, edemas, hemorragias y atrofia muscular.

En el ser humano, la sarcocistosis es asintomática; sin embargo, el estado inmunológico del hospedador es clave para el desarrollo de la enfermedad. Los signos clínicos pueden variar de acuerdo con la manera en la que fue adquirida la infección, al igual que por el papel que cumple la persona en el ciclo biológico del parásito. Los síntomas que se presentan cuando la sarcocistosis intestinal es inducida experimentalmente, incluyen náuseas, malestar

abdominal y diarrea autolimitante; la severidad de estos últimos signos está relacionada con la cantidad de carne infestada que fue ingerida (Arness et al., 1999).

En la sarcocistosis extraintestinal, los principales síntomas incluyen tumefacción muscular de un diámetro de 1 a 3 cm de diámetro acompañada de dolor con eritema de la piel alrededor de la inflamación. Asimismo, las lesiones pueden estar acompañadas de fiebre, mialgia difusa, sensibilidad muscular, debilidad, eosinofilia y broncoespasmo (Mehrotra et al., 1996).

1.2.1 Formas infectantes de *Sarcocystis* spp.

Se conocen dos formas infectantes, (1) las colonias tisulares, también conocidos como sarcoquistes y se encuentran relacionados con las infecciones crónicas y con hospedadores intermediarios y (2) los ooquistes, relacionados con los hospedadores intermediarios. Las colonias tisulares y los ooquistes de *Sarcocystis* son muy parecidas a las colonias tisulares y los ooquistes de *T. gondii* difiriendo los ooquistes por algunos micrometros y, en las paredes que presentan las colonias tisulares. Asimismo, existe otra estructura generada a partir de la diferenciación de los esporozoítos denominada merozoíto. Esta etapa del desarrollo asexual se relaciona con los taquizoítos de *T. gondii* tanto morfológicamente como metabólicamente y se presenta 15 a 16 días posteriores a la infección de esporozoítos (Fayer, 2004).

Las colonias tisulares son estructuras que llegan a medir hasta 100 μm de diámetro y 325 μm de longitud, pero con mayor frecuencia están en el rango de 20 a 60 μm y generalmente no inducen reacciones inflamatorias en el tejido circundante debido al aislamiento generado por la pared del quiste (Mehrotra et al., 1996). Las colonias tisulares maduras en su interior contienen únicamente bradizoítos con forma de medialuna, mientras que los inmaduros tienen células redondeadas denominadas metrocitos así como bradizoítos (**Fig. 5**) (Fayer et al., 2015). La estructura de la pared de las colonias tisulares es importante para distinguir especies pertenecientes al género. Dichas estructuras pueden presentar protuberancias vilares gruesas o delgadas (**Fig 6**) (Rosenthal, 2021).

Los ooquistes son morfológicamente iguales a los de *T. gondii* siendo estructuras redondeadas que contienen en su interior 2 esporoquistes elipsoidales con 4 esporozoítos cada uno. En cuanto al tamaño, los ooquistes de *Sarcocystis* son ligeramente más grandes midiendo 15 por 20 μm , mientras que los esporoquistes llegan a medir 12 por 6 μm (**Fig. 7**) (Rosenthal, 2021).

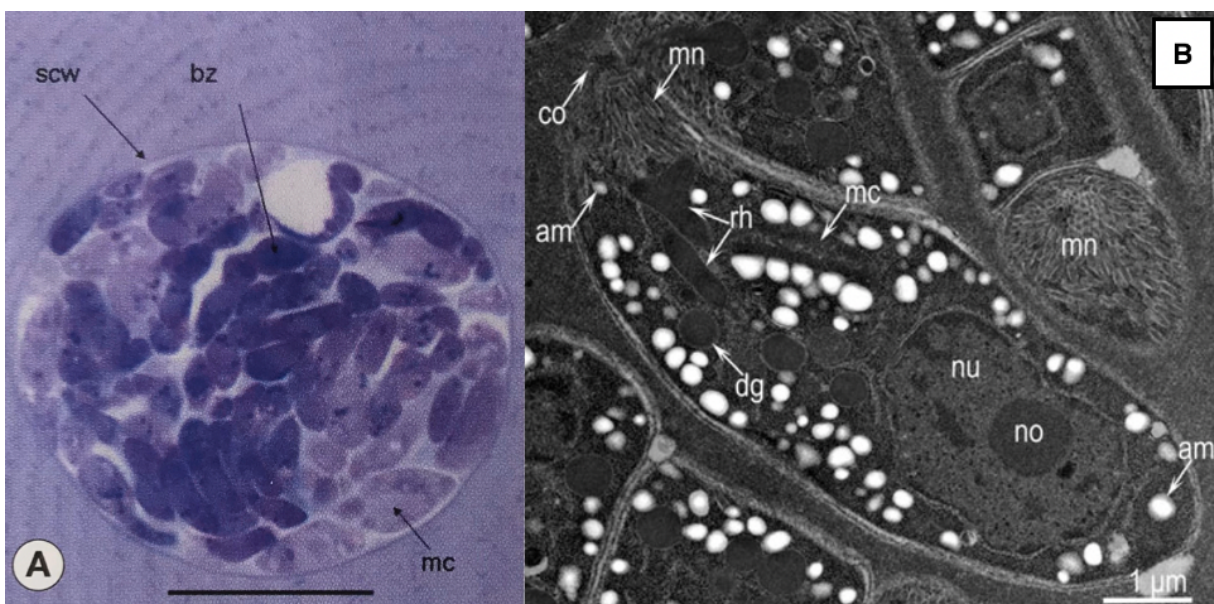


Figura 7. Colonia tisular y bradizoito de *Sarcocystis* spp. A) Microfotografía de *Sarcocystis muris*. Sarcoquiste inmaduro en tejido muscular. Pared del sarcoquiste (SCW); bradizoito (bz); metrocito (mc) 20 μ m. Tomada de Rosenthal, 2021. B) Microscopía electrónica de transmisión de un corte longitudinal de bradizoito de *Sarcocystis speeri*. Conoide (co); micronemas (mn); gránulos de amilopectina (am); 2 roptrías (rh), una mitocondria (mc), gránulos densos (dg) y un núcleo (nu) con un nucléolo prominente (no). Tomada de Dubey et al., 2015.

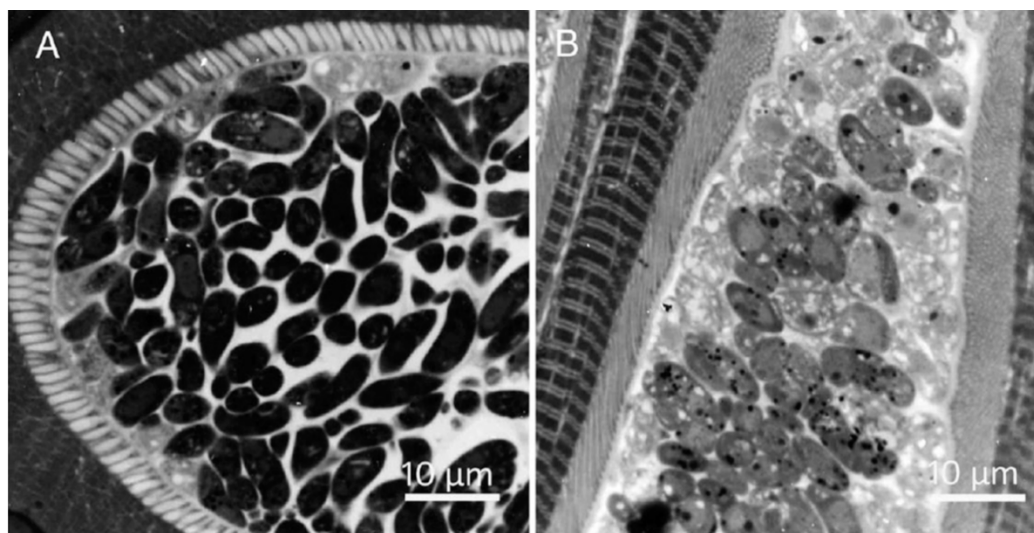


Figura 8. Diagnóstico diferencial de especies coinfectantes. Se representan dos sarcoquistes en los músculos del cerdo. A la izquierda, *S. miescheriana* para la que los perros sirven como anfitrión definitivo. A la derecha, *S. suis hominis* para el que la gente sirve como anfitrión definitivo. Tenga en cuenta que las protuberancias vilares en la pared del sarcoquiste son más delgadas y largas para *S. suis hominis*. Microscopía electrónica de transmisión. Tomada de Dubey et al., 2016.

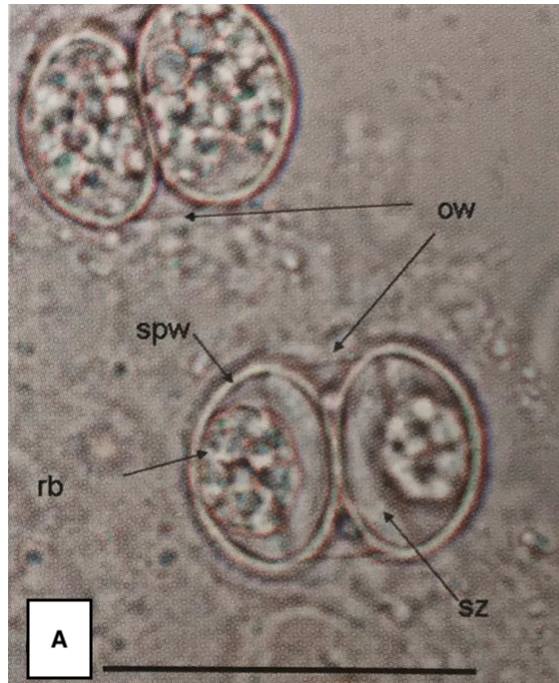


Figura 9. Microfotografía de ooquistes de *Sarcocystis muris*. A) Se muestran dos ooquistes no esporulados (arriba a la izquierda) y dos ooquistes esporulados (abajo a la derecha). En los ooquistes esporulados, los esporozoitos (sz) y los cuerpos de residuo (rb) están encerrados por la prominente pared de los esporoquistes (spw), que, a su vez, se emparejan dentro de la pared del ooquiste (ow). 20 μ m. Microscopía de campo claro. Tomada de Rosenthal, 2021.

1.2.2 Ciclo biológico de *Sarcocystis* spp.

El ciclo biológico de *Sarcocystis* spp. es indirecto, aunque también es conocido como presa-depredador obligatorio, por lo que requiere de 2 hospedadores. El hospedador definitivo (carnívoro u omnívoro), expele junto con las heces, cientos de ooquistes que pueden contaminar alimentos y agua. Posteriormente, el hospedador intermediario (herbívoro principalmente) adquiere la infección al consumir alimentos con esporoquistes esporulados o esporoquistes libres (fase infectiva), los cuales al llegar al intestino de su hospedador y por la exposición a tripsina y bilis, liberan esporozoitos motiles que pasan entre o por las paredes del intestino y se alojan en las células endoteliales de casi todos los órganos. Esta etapa es la primera de aproximadamente cuatro del desarrollo asexual del parásito, también llamada merogonía o esquizogonía, en donde el núcleo se lobula y se divide en varios núcleos (endopoligenia), generando así un gran número de merozoítos entre los 15 a 16 días posteriores a la ingesta de los esporozoítos (en el caso de *Sarcocystis cruzi*) (Fig. 8) (Fayer, 2004; Lindsay & Dubey, 2020).

Las subsecuentes generaciones de merozoítos, se desarrollan en la dirección del flujo sanguíneo hacia las arteriolas, los capilares, las vénulas y las venas, hasta la última etapa del desarrollo asexual, la cual se localiza en células musculares (Fayer, 2004).

Los merozoítos de segunda generación, se encuentran de manera individual o en pares dentro de las células mononucleares en sangre periférica a los 27 días posteriores a la ingesta de los esporozoítos. Asimismo, la tercera generación se encuentra en células endoteliales o capilares de cualquier parte del cuerpo, sin embargo, predominan en glomérulos renales. Los merozoítos de esta última generación se alojan en células musculares lisas, esqueléticas o cardíacas (algunas veces en tejido neural) de la que finalmente comienza la formación de los sarcoquistes (Fayer et al., 2015; CDC, 2017).

La colonia tisular se forma a partir de la diferenciación de los merozoítos en una sola célula redonda llamada metrocito o célula madre. Después de una serie de numerosas divisiones (endiodogenia), aumenta el número de metrocitos a medida que la colonia tisular crece mientras que, al mismo tiempo, se desarrolla una pared que aísla la colonia tisular del músculo circundante. Los metrocitos se convierten en bradizoítos infectantes y en ese punto es cuando se considera que la colonia tisular es infectiva (**Fig. 8**) (Fayer, 2004).

El hospedador definitivo se infecta al consumir colonias tisulares, que al ser digeridas liberan bradizoítos, los cuales se producen a los dos meses y medio post infección. Los bradizoítos se invaden la lámina propia del epitelio intestinal (intestino delgado) en donde se lleva a cabo la gametogonia diferenciándose en microgametos y macrogametos (Poulsen y Stensvold, 2014; CDC, 2017). Los gametos se fusionan y se convierten en ooquistes, los cuales esporulan en el epitelio intestinal y se eliminan del hospedador en las heces, completándose así el ciclo vital del parásito (Poulsen y Stensvold, 2014; CDC, 2017).

1.2.3 Diagnóstico de la sarcocistosis

La sarcocistosis puede diagnosticarse de dos formas. La primera de ellas es a través de métodos biológicos por la detección y tinción de estructuras infectivas mediante biopsias o, identificando ooquistes y esporoquistes en deposiciones mediante exámenes coprológicos (e.j. técnica de Faust) (Poulsen & Stensvold, 2014). No obstante, los exámenes antes mencionados, no permiten discriminar entre las especies de apicomplexos debido al parecido de las estructuras observadas.

El segundo método es por medio de pruebas moleculares que al igual que en la toxoplasmosis, permiten encontrar material genético del parásito. Estas pruebas son las que tiene mayor precisión ya que permiten la diferenciación entre algunas especies de apicomplexos (Rosenthal, 2021).

Las pruebas serológicas no son recomendadas para la detección de esta enfermedad ya que por la naturaleza crónica de las infecciones por las colonias tisulares y por la hipotética reactividad cruzada entre antígenos conservados de especies relacionadas, hacen que la serología tenga un valor diagnóstico incierto (García-Lunar et al., 2015; Gondim et al., 2017)

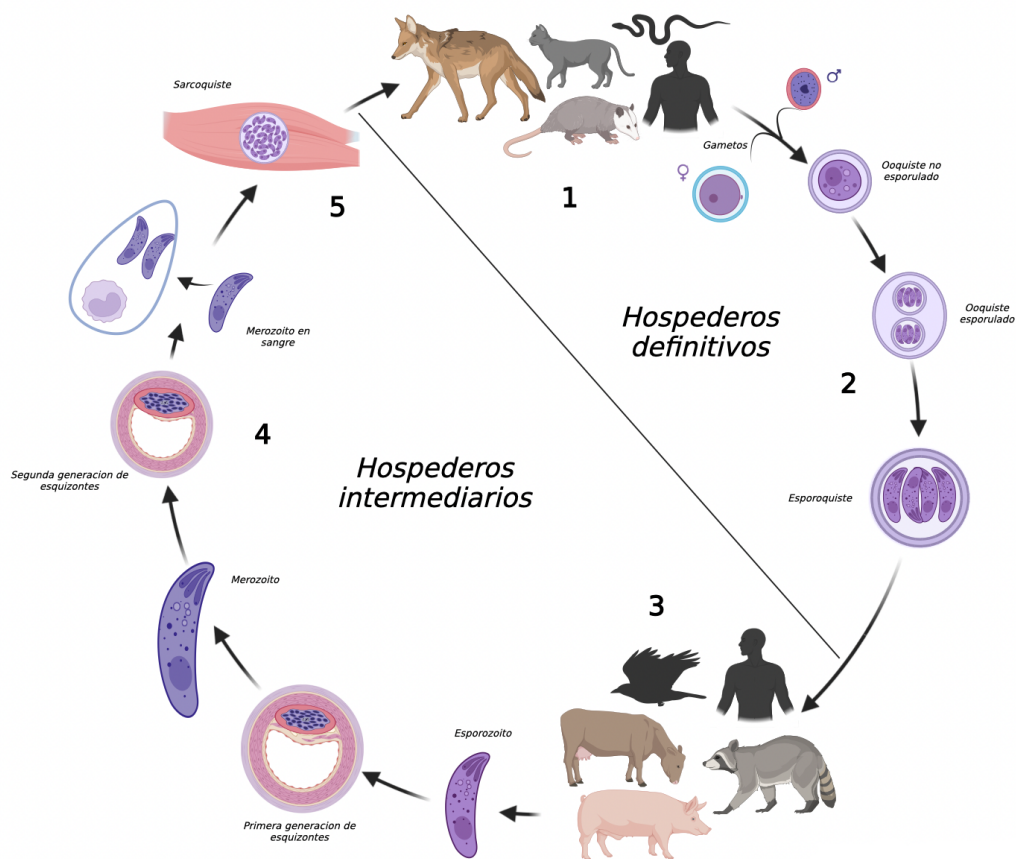


Figura 10. Ciclo biológico de *Sarcocystis* spp. 1) El hospedador definitivo se infecta al consumir sarcocistes infectantes. 2) Dentro del intestino delgado del organismo definitivo se produce la fase sexual o gametogonia terminando en la producción de ooquistes esporulados. 3) El organismo intermedio consume ooquistes esporulados y se infecta. 4) Fase de reproducción asexual o esquizogonia en células endoteliales y en células mononucleares. 5) Maduración de los sarcocistes en músculos esqueléticos, lisos o cardíacos.

1.2.4 Epidemiología

Las especies de *Sarcocystis* tienen una distribución mundial, pese a ello, el conocimiento epidemiológico que se tiene al respecto de la sarcocistosis humana se basa en informes de casos y brotes ocasionales provenientes primordialmente del sudeste de Asia (Rosenthal, 2021). Los registros que se tienen de la sarcocistosis intestinal refieren a personas que habitan países europeos como Países Bajos, Alemania, Polonia, Eslovenia, Francia y España. Los países asiáticos que cuentan con este registro de infecciones son China, el Tíbet, Laos y Tailandia, mientras que en América los países con reportes son Argentina y Estados Unidos. En Oceanía sólo se cuenta con el registro de casos en Australia (Fayer et al., 2015; Poulsen & Stensvold, 2014). Sin embargo, se cree que muchos de los tejidos de animales domésticos, mamíferos silvestres, aves y reptiles de los cuales se consume la carne contienen sarcoquistes capaces de infectar hospedadores finales no identificados y causar complicaciones desconocidas.

La sarcocistosis extraintestinal, ha sido identificada en más de 100 personas alrededor del mundo. Dichos casos fueron identificados por medio de muestras de biopsias incidentales, sin que las personas presentaran signos clínicos o, el hallazgo se hizo accidentalmente durante necropsia, como se ha registrado en Malasia (Fayer, 2004; Fayer et al., 2015). Asimismo, el estudio realizado por Beaver y colaboradores en 1979, menciona que las infecciones causadas por sarcocistosis muscular pudieron haber sido adquiridas en el sudeste asiático (13), la India (8), América Central o del Sur (5), África (4), Europa (4), los Estados Unidos (3) y China (1), registrando un total de 40 casos. Pese a ello, los informes de África, Oriente Medio y América Central y del Sur siguen siendo raros o faltantes debido a la carencia de una prueba diagnóstica con una alta especificidad o por la baja sensibilidad diagnóstica en la detección directa (Fayer et al., 2015; Poulsen & Stensvold, 2014). También, la falta de estudios post-mortem en personas con sospechas de infección puede ser causa de una prevalencia menor a la existente.

La domesticación de animales para el consumo humano, así como el contacto con la fauna silvestre, son factores claves en las infecciones extraintestinales, ya que aumentan la posibilidad de contraer infecciones causadas por esporoquistes convirtiendo al ser humano en hospedador intermediario accidental (Fayer et al., 2015; Rosenthal, 2021). Se desconoce el número de especies en las que el ser humano funge como hospedador intermediario, pero

se especula que puede haber alrededor de 7 debido a las diferencias morfológicas encontradas en las paredes de las colonias tisulares observadas en muestras de tejido humano (Beaver et al., 1979; Fayer et al., 2015).

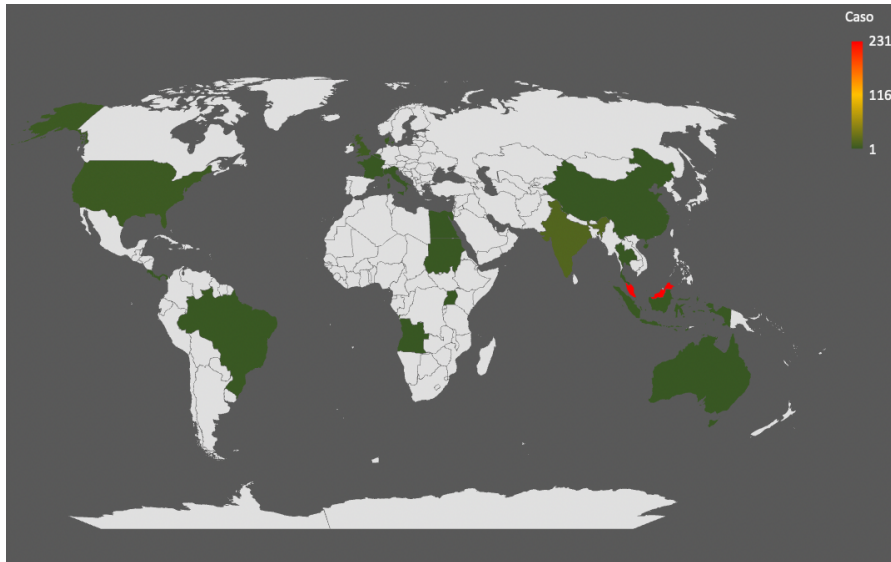


Figura 11. Informes de humanos con sarcocistosis extraintestinal reportados por Beaver et al., 1979 y Fayer et al., 2015. El mayor número de reportes se encuentra en países del sudeste asiático como es el caso de Malasia. En el continente americano sólo existen reportes en Estados Unidos, Brasil, Costa Rica y Panamá.

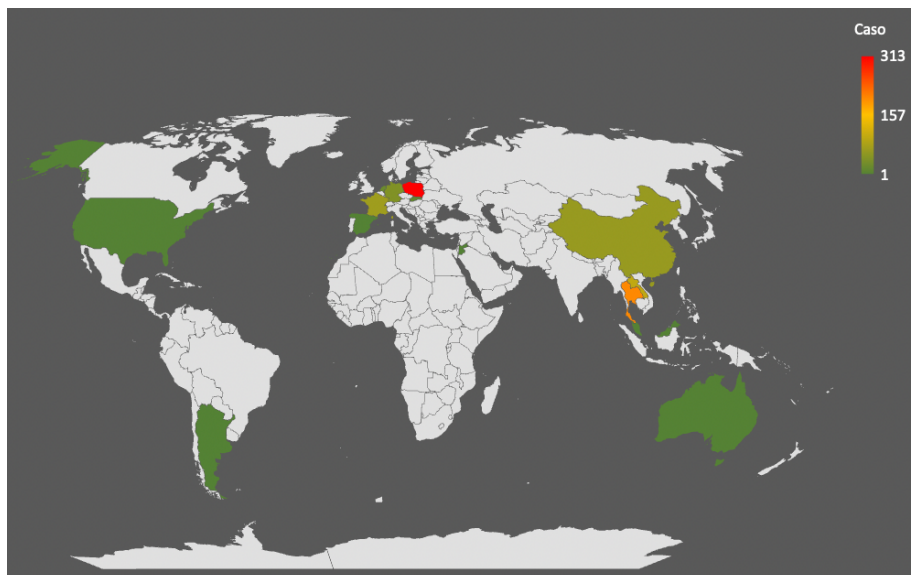


Figura 12. Informes de humanos con sarcocistosis intestinal adquirida de forma natural reportados por Fayer et al., 2015. Al igual que el mapa anterior, el mayor número de reportes se encuentra en países del sudeste asiático, sin embargo, Polonia es el país que más casos ha registrado con un total de 313. En el continente americano sólo existen reportes en Estados Unidos y Argentina.

1.3 Hospedadores compartidos del Phylum Apicomplexa

La diversidad de especies de vertebrados que son infectadas por protozoarios parásitos es enorme, por lo que en ocasiones los organismos del *phylum Apicomplexa* pueden compartir hospedadores, tanto intermediarios como definitivos o, en su defecto, podrían infectar organismos de manera accidental, como en el caso del ser humano (Fayer et al., 2015; Lindsay & Dubey, 2020), aumentando así la posibilidad de obtener muestras falso positivas en el inmunodiagnóstico de la toxoplasmosis humana derivado de reacción cruzada por la presencia de epítomos similares entre las especies de los *Apicomplexa*.

Especies como *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum*, comparten hospedadores intermediarios (ganado bovino) como hospedadores definitivos (cánidos), de igual forma, *Sarcocystis hirsuta*, *Toxoplasma gondii* y *Hammondia hammondi* comparten hospedadores definitivos (felinos), mientras que *Sarcocystis suihominis* y *Toxoplasma gondii* comparten al cerdo como hospedador intermediario (Frenkel & Dubey, 1975; Lindsay & Dubey, 2020; Sokol-Borrelli et al., 2020).

1.4 Moléculas compartidas

En la actualidad, la genómica y la proteómica de moléculas compartidas por los parásitos apicomplexos es estudiada debido a la importancia que estas proteínas tienen en la invasión celular, ciclo celular y en la evasión inmunológica del organismo infectado (Blazejewski et al., 2015). Entre las principales moléculas investigadas se encuentran proteínas superficiales del parásito (antígenos superficiales (SAG), antígenos relacionados con SAG-1 o secuencias relacionadas con la glicoproteína del antígeno superficial (SRS) y antígenos no relacionados con SAG (SUSA)) y proteínas de órganos secretores del mismo (micronemas, roptrías y gránulos densos).

Las moléculas más estudiadas en *Toxoplasma* son los antígenos superficiales debido a que su presencia va del 3 al 5% del total de proteínas encontradas, sin embargo, a pesar de ser un porcentaje bajo, la mayoría de los anticuerpos son reactivos a SAG (Wang y Ying; 2014), lo que las ha convertido en blancos de diversas investigaciones. Aunado a eso, se ha descrito una familia de proteínas que exhiben similitud, con secuencias proteicas de parásitos relacionados filogenéticamente. En específico, se ha demostrado la existencia de parálogos en los merozoítos de *Sarcocystis neurona*, mismos que se clasificaron como SnSAG1, SnSAG2, SnSAG3 y SnSAG4 que, aunque todavía no se conoce su función específica en el

ciclo infeccioso, se cree que estos pueden actuar de manera similar a los de *T. gondii* (adhesión, modulación inmunológica y la atenuación de la virulencia) (Howe et al., 2005). De igual manera, en *Neospora caninum* se han descrito antígenos con estructuras y funciones análogas a las de *T. gondii*, como SAG1 (NcSRS29B), SRS2 (NcSRS29C) y SAG3 (SRS57), encontrados en la etapa de taquizoíto (SRS29, SRS57) y bradizoíto (SRS57) (Burg et al., 1988; Jacquet et al., 2001; Cong et al., 2013), siendo las primeras, moléculas altamente inmunógenas que estimulan la producción de anticuerpos en la fase aguda de la infección (Lekutis et al., 2001; Reid et al., 2012; Wasmuth et al., 2012).

1.5 Modelamiento de proteínas y docking molecular

1.5.1 Modelamiento de proteínas

Para el estudio de la proteómica, el modelamiento de proteínas es un instrumento que permite descubrir la organización espacial de una proteína mediante diferentes enfoques como la predicción de interacciones atómicas basándose en la estructura cristalina (plantilla o template), de secuencias de aminoácidos relativamente similares (modelamiento comparativo, por homología o enhebrado), mediante enfoques que no se basan en una plantilla conocida (*ab initio*) o por enfoques que se basan en el aprendizaje profundo (características derivadas de plantillas homólogas + alineación de secuencias múltiples) (Jisna & Jayaraj, 2021). Todas estas perspectivas pueden proporcionar datos relevantes sobre la estructura, función y sitios activos de las proteínas los cuales son determinantes para comprender su función biológica (Macêdo et al., 2013; Jisna & Jayaraj, 2021). Un ejemplo de la aplicación de estas técnicas es el conocimiento generado sobre la caracterización estructural de la unión móvil (MJ), una estructura compleja producida por los parásitos apicomplexos que es esencial para la invasión de la célula hospedera (Crawford et al., 2010; Macêdo et al., 2013; Tonkin et al., 2011).

1.5.2 Docking molecular

El docking molecular, también conocido como acoplamiento molecular, es un método empleado para prever modos de unión de pequeños compuestos o macromoléculas en contacto con un receptor que permite predecir sus interacciones moleculares (Santos et al., 2019). Estos análisis se basan en diferentes funciones de puntuación y se pueden clasificar como métodos directos y los basados en plantillas.

Los métodos directos se fundamentan en propiedades termodinámicas ya que intentan encontrar la estructura del complejo objetivo ubicada al mínimo de energía libre de Gibbs en el espacio conformacional, mientras que los basados en plantillas, se sustentan en la observación de que los pares que interactúan y que comparten una identidad de secuencia mayor al 30% a menudo interaccionan de la misma forma y por lo tanto, la estructura del complejo objetivo se puede obtener mediante herramientas de modelado por homología si hay disponible un complejo de plantillas apropiado de estructura conocida (Kozakov et al., 2017). Si bien los dos métodos están fundamentados ampliamente, el directo es el más empleado en la actualidad.

Dentro de las uniones macromoleculares se encuentran las interacciones proteína-proteína, mismas que pueden incluir a las reacciones de los complejos antígeno-anticuerpo. El acoplamiento de estos complejos es una alternativa valiosa y rápida a la caracterización estructural experimental, por lo que son una herramienta importante para el conocimiento de blancos terapéuticos y diagnósticos (Ambrosetti et al., 2020).

1.6 Antecedentes

Ante la problemática de la reactividad cruzada, investigadores de diferentes partes del mundo han realizado estudios en diferentes organismos *Apicomplexa* enfocándose en determinar si existe reactividad cruzada en pruebas serológicas. Estas pruebas muestran discordancia, ya que cuando se utilizan antígenos de los organismos lisados puede encontrarse reactividad cruzada, mientras que si se ocupan antígenos específicos dicha reactividad es nula (**Tabla 4**).

Tabla 4. Reactividad cruzada probada con diferentes técnicas y organismos *Apicomplexos*.

<i>Parásito causante de la infección</i>	<i>Fuente de anticuerpos</i>	<i>Parásito en el que se probó la reactividad</i>	<i>Prueba diagnóstica</i>	<i>Tipo de antígeno</i>	<i>Reactividad</i>	<i>Referencia</i>
- <i>T. gondii</i> - <i>S. hirsuta</i>	Suero de ganado (infectado)	<i>Neospora caninum</i>	WB (Reductoras)	Taquizoíto lisado	-Sí (14, 31, 37, 42, 55, 80 kDa) -Sí (11, 25, 34, 37 kDa)	(Baszler et al., 1996)

- <i>T. gondii</i> - <i>S. cruzi</i> - <i>H. hammondi</i>	• Suero de conejo (inmunizado) • Suero de ganado, perro, oveja, cabra y cerdo (infectados)	<i>Neospora caninum</i>	WB (No reductoras)	Taquizoíto lisado	- Sí (30, 46, 88, 97 kDa) - No - No	(Bjerkas et al., 1994)
- <i>T. gondii</i> - <i>S. cruzi</i>	Suero de conejo (inmunizado) Suero de perro y conejo (infectados)	<i>Neospora caninum</i>	WB (No reductoras)	Taquizoíto lisado Antígeno incorporado a ISCOM*	- Sí (40 kDa) - No	(Bjorkman et al., 1994)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Suero de cerdo (infectado)	<i>Sarcocystis suicanis</i>	ELISA IFA	Bradizoíto lisado	- Sí - Sí	(Moo-Hong, 1987)
<i>Neospora caninum</i>	Suero de bovinos	<i>Sarcocystis spp.</i>	ELISA	Taquizoíto (antígeno crudo)	Sí	(Dubey et al., 1996)
- <i>T. gondii</i> - <i>S. cruzi</i>	Suero de bovinos	<i>Neospora caninum</i>	ELISA	Antígeno recombinante	- No - No	(Howe et al., 2002)

* ISCOM: Complejos inmunoestimulantes.

En las condiciones reductoras o desnaturizantes, se rompen los enlaces disulfuro de las proteínas y por lo tanto pierden su forma tridimensional.

2. Justificación

La toxoplasmosis es una parasitosis con registros a nivel mundial de hasta 80% de seroprevalencia, demostrando que las infecciones ocasionadas por *T. gondii* son muy comunes. En México, la toxoplasmosis es una infección frecuente debido a la exposición ambiental que tienen las personas con las distintas fases del ciclo biológico del parásito y a variaciones climáticas que aumentan la viabilidad de estructuras infecciosas. Asimismo, se estima que en el país el rango de seroprevalencia oscila entre un 15% a un 50% en la población general, siendo las zonas costeras del Golfo de México y el Pacífico las más afectadas, con 64% de seroprevalencia, mientras que las regiones con menor seroprevalencia son las zonas áridas, con 13% (Hernández-Cortazar et al., 2015).

En la mayoría de los estudios de seroprevalencia, se utiliza como prueba diagnóstica el ELISA, empleando como antígeno, taquizoítos lisados de *T. gondii*. En este caso, los valores de sensibilidad diagnóstica son desde 92.5% al 95%, lo cual indica que puede ser

despreciable la probabilidad de detectar muestras falso-positivas o incluso alguna reacción cruzada ocasionada por antígenos de otros agentes infecciosos pertenecientes a otros taxa; sin embargo, son escasos y en ocasiones contradictorios, los estudios donde se ponen en evidencia las reacciones cruzadas entre los miembros de la familia *Sarcoscytidae*, como *Toxoplasma*, *Sarcocystis* y *Neospora*. En el caso de las infecciones humanas, la falta de una prueba serológica específica que permita identificar a las especies que conforman el género *Sarcocystis* dificultan la certeza en el diagnóstico de *Toxoplasma* y, por lo tanto, aumentan la posibilidad de un subregistro de infecciones ocasionadas por ambos parásitos.

Debido a las relaciones filogenéticas que tienen las especies de los géneros que conforman la familia de los apicomplexos, los experimentos realizados para determinar pruebas diagnósticas específicas no se hicieron esperar. Ensayos como el WB, ELISA e IFA en diferentes especies animales (domésticos principalmente) fueron ocupados para cumplir este propósito. Pese a ello, los resultados de estos análisis no fueron concluyentes para determinar diferencias en pruebas diagnósticas entre las especies de *Toxoplasma* y *Sarcocystis* (**Tabla 4**).

Para dar una posible solución a esta problemática, el uso de herramientas bioinformáticas puede ser clave, ya que permite conocer las moléculas desde distintos enfoques, identificar posibles sitios de interacción con otras moléculas y predecir mediante simulaciones, las posibles interacciones atómicas intermoleculares. Además, no se han realizado estudios para determinar reactividad cruzada entre moléculas de *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis spp.* empleando herramientas computacionales como lo son el modelamiento de proteínas y el docking molecular.

Por lo que en el presente trabajo abordó el estudio *in-silico* de proteínas superficiales de *Sarcocystis spp.* que tienen la posibilidad ser fuente de la reactividad cruzada en el diagnóstico serológico de *Toxoplasma gondii* y de esta manera ser la causa de sobreestimar la prevalencia de la toxoplasmosis humana.

3. Hipótesis

En los *Apicomplexa* se conoce que existen proteínas esenciales para invadir las células del hospedador, las cuales podrían conservar subunidades proteicas en los organismos cercanos filogenéticamente; varias de esas proteínas se han empleado en el diagnóstico de la toxoplasmosis. Si *Sarcocystis* y *Toxoplasma* son apicomplejos de

cercanía filogenética, que incluso comparten hospedadores, entonces existe la posibilidad de que ambos géneros posean regiones proteicas conservadas en el transcurso de la evolución, las cuales podrían ser identificadas mediante el análisis *in-silico*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar la presencia de proteínas superficiales de *Sarcocystis spp.* (*Apicomplexa*) analizadas *in-silico* que podrían causar reacción cruzada en el diagnóstico serológico de *Toxoplasma gondii* (*Apicomplexa*).

4.2 Objetivos particulares

1. Buscar en bases de datos y literatura especializada proteínas superficiales de *Sarcocystis spp.*
2. Buscar en bases de datos estructuras cristalizadas de anticuerpos de *Toxoplasma gondii*.
3. Realizar el modelado tridimensional por homología y por AlphaFold2 de proteínas superficiales de *Sarcocystis spp.*
4. Realizar un acoplamiento molecular (docking molecular) para predecir y calcular computacionalmente la interacción antígeno-anticuerpo entre proteínas superficiales de *Sarcocystis spp.* y anticuerpos de *Toxoplasma gondii*.

5. Materiales y métodos

5.1 Búsqueda de proteínas superficiales y de organelos secretorios

Se realizó una búsqueda sistemática de las principales secuencias de aminoácidos (o secuencias primarias) de proteínas superficiales de los parásitos del género *Sarcocystis* en bases de datos de proteínas como el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), The *Toxoplasma* Genome Resource (ToxoDB) (<https://toxodb.org/toxo/app>), Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) y en bases de datos de literatura especializada. De la información obtenida se tomaron en cuenta el nombre de la proteína, la especie, la base de datos y el ID de la secuencia conseguida.

5.2 Estructura del anticuerpo de *Toxoplasma gondii* por difracción de rayos X

La búsqueda de los anticuerpos de *Toxoplasma gondii* se llevó a cabo en el Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) ya que en esta base de datos está depositada la estructura

tridimensional de proteínas obtenidas por métodos experimentales. Asimismo, se consideraron todas aquellas estructuras de anticuerpos unidas a proteínas superficiales. Posteriormente, dichas proteínas fueron descargadas en formato pdb (.pdb) y sometidas a un tratamiento, el cual consistió en eliminar las estructuras que no formaban parte del anticuerpo (como moléculas de agua) con ayuda la herramienta bioinformática UCSF chimera. En seguida, con ayuda el programa bioinformático AutoDockTools 1.5.7 se les añadieron hidrógenos, cargas Gasteiger y cargas Kollman con la finalidad de prepararlas para el acoplamiento molecular.

5.3 Modelado tridimensional

5.3.1 Por homología a través de SWISS-MODEL

Para los modelamientos de proteínas, se consideró solo una secuencia primaria de los grupos representantes de los antígenos superficiales 1-6.

El modelado tridimensional por homología se realizó a través del programa bioinformático SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>), en donde se ingresaron las secuencias primarias de las proteínas superficiales en formato FASTA (Waterhouse et al., 2018). Posteriormente, se realizó la construcción de los modelos de manera automática y se tomaron aquellos que cumplían con las siguientes características: porcentaje de identidad < al 20%, cobertura por encima del 0.60, Estimación Global de Calidad del Modelo (GMQE) < al 0.40 y el puntaje de la función QMEANDisCo < al 0.55.

La validación de las estructuras obtenidas por homología se llevó a cabo en la misma plataforma de SWISS-MODEL con ayuda de la herramienta QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) (Benkert et al., 2011) y por el servidor de la Universidad de California (UNCLA) SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu>) como se muestra en el anexo 4.

Al igual que los anticuerpos de *T. gondii*, estos modelos fueron descargados en formato pdb, se les eliminaron moléculas ajenas a las proteínas y fueron sometidos al mismo tratamiento de adición de cargas e hidrógenos para prepararlos para el docking molecular.

5.3.2 Por AlphaFold2

AlphaFold2 es un programa bioinformático para predecir estructuras tridimensionales de proteínas a partir de sus secuencias primarias de aminoácidos basado en el aprendizaje profundo. La realización de los modelos tridimensionales por dicho programa se llevó a cabo

a través de AlphaFold v2.1.0 Colab (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=33g51legij5R>), en la cual se ingresaron las secuencias primarias de los antígenos superficiales 1-6 en formato FASTA (Mirdita et al., 2021). Los modelos construidos se realizaron con los parámetros que página arroja predeterminadamente.

Al igual que las proteínas generadas por homología, estos modelos fueron sometidos al proceso de validación con ayuda de la herramienta QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) (Benkert et al., 2011) y por el servidor de la Universidad de California (UNCLA) SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu>). También, fueron sometidas al mismo tratamiento que los modelos generados por homología para prepararlos para el docking molecular.

5.4 Acoplamiento molecular proteína-proteína (Docking molecular)

Con la intención de tener un punto de comparación entre las interacciones que se generaban computacionalmente, las reportadas en la base de datos PDB y las que se iban a generar con los antígenos de *Sarcocystis*, se realizó un docking molecular entre el antígeno superficial 1 de *T. gondii* y el Fab encontrados en la base de datos a través del servidor web ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013). En el cual, se utilizó al anticuerpo como molécula receptora y al antígeno como ligando. De la misma forma, las interacciones proteína-proteína se llevaron a cabo a través del modo anticuerpo (Brenke et al., 2012), esto con la finalidad de dirigir de mejor manera el estudio.

El procedimiento mencionado anteriormente fue realizado de la misma manera para las proteínas 3D generadas por los dos métodos de modelamiento, y el mismo anticuerpo de *T. gondii*. Se utilizó al anticuerpo como molécula receptora y a cada uno de los antígenos superficiales como ligando.

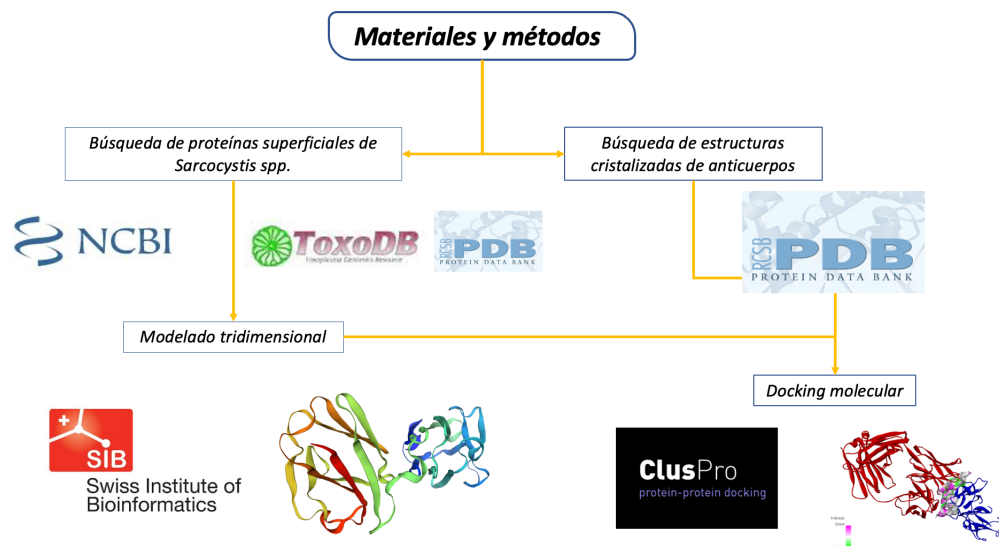


Figura 13. Diseño experimental. Se realizó una búsqueda en bases de datos bioinformáticas y en literatura especializada en donde se obtuvieron las principales secuencias primarias de los antígenos superficiales de *Sarcocystis* spp. y anticuerpos contra antígenos superficiales de *Toxoplasma gondii*. Posteriormente, se modelaron tridimensionalmente 6 proteínas superficiales mediante dos métodos y finalmente, se realizó un docking molecular con los modelados antes mencionados y los anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*.

6. Resultados

6.1 Búsqueda de proteínas superficiales y de organelos secretorios

Se obtuvieron un total de 227 secuencias primarias de proteínas pertenecientes al género *Sarcocystis* en las diferentes bases de datos y literatura especializada (PubMed, ELSEVIER y Spriger), de las cuales 180 fueron proteínas parciales, 23 completas y 24 hipotéticas (**Tabla 5**). No obstante, para los fines de este trabajo, sólo se tomaron en consideración las secuencias primarias de las proteínas superficiales completas, las cuales se dividen en 6 grupos.

Tabla 5. Proteínas superficiales encontradas en las bases de datos de *Sarcocystis* spp.

Proteína	Especie	Base de datos	ID
Antígeno superficial 1*	<i>Sarcocystis neurona</i>	GenBank	ADG26774.1
			AAK40366.1
			ABW82530.1
			AAO85714.1
			AAP72017.1
			AAP72018.1
			AAO91776.1
			AAK94921.1
			AAO41732.1
AAK77909.1			
Antígeno superficial 2*	<i>Sarcocystis neurona</i>	GenBank	AAO38736.1
			ADG26775.1

			ACU82377.1
	<i>Sarcocystis falcatula</i>	GenBank	ADG26776.1
<i>Antígeno superficial 3*</i>	<i>Sarcocystis neurona</i>	GenBank	AAO38737.1
	<i>Sarcocystis falcatula</i>	GenBank	ADG26779.1
<i>Antígeno superficial 4*</i>	<i>Sarcocystis neurona</i>	GenBank	ADG26780.1
			ADG26781.1
			AAO38738.1
	<i>Sarcocystis falcatula</i>	GenBank	ADG26782.1
<i>Antígeno superficial 5*</i>	<i>Sarcocystis neurona</i>	GenBank	ABD47681.1
			AAO85713.1
<i>Antígeno superficial 6*</i>			ADG26773.1
<i>Proteína hipotética</i>	<i>Sarcocystis aucheniae</i>	GenBank	QFV20531.1
			QFV20537.1
			QFV20536.1
			QFV20535.1
			QFV20534.1
			QFV20533.1
			QFV20532.1
			QFV20530.1
			QFV20529.1
			QFV20528.1
			QFV20527.1
			QFV20526.1
			QFV20525.1
			QFV20524.1
			QFV20523.1
			QFV20522.1
			QFV20521.1
			QFV20520.1
			QFV20519.1
			QFV20518.1
QFV20517.1			
QFV20516.1			
QFV20515.1			
QFV20514.1			
<i>Antígeno superficial 4 (parcial)</i>	<i>Sarcocystis falcatula</i>	GenBank	AUR26594.1
			AUR26593.1
			AUR26592.1
			AUR26591.1
			AUR26590.1
			AUR26607.1
			AUR26606.1
			AUR26605.1
			AUR26604.1
			AUR26603.1
			AUR26602.1
			AUR26601.1
			AUR26600.1
			AUR26599.1
			AUR26598.1
			AUR26597.1
AUR26596.1			
AUR26595.1			
ANJ04966.1			

	<i>Sarcocystis neurona</i>	GenBank	ALJ92660.1
			QHN60672.1
			ALJ92654.1
			ATU47063.1
			ACU82383.1
	<i>Sarcocystis sp.</i>	GenBank	ACU82382.1
			QES86635.1
			AXY98040.1
			ALJ92659.1
			ALJ92658.1
			ALJ92657.1
			ALJ92656.1
			ALJ92655.1
			AFK82473.1
			AFK82472.1
			AFK82471.1
			AFK82470.1
			AFK82469.1
			AFK82468.1
			AFK82467.1
			AFK82466.1
			AFK82465.1
			AFK82464.1
			AFK82463.1
			AFK82462.1
			AFK82461.1
			AFK82460.1
AFK82459.1			
AFK82458.1			
AFK82457.1			
AFK82456.1			
AFK82455.1			
AFK82454.1			
AFK82453.1			
AFK82452.1			
AFK82451.1			
AFK82450.1			
AFK82449.1			
<i>Antígeno superficial 3 (parcial)</i>	<i>Sarcocystis falcatula</i>	GenBank	AUR26577.1
			AUR26576.1
			AUR26575.1
			AUR26574.1
			AUR26573.1
			AUR26572.1
			AUR26589.1
			AUR26588.1
			AUR26587.1
			AUR26586.1
			AUR26585.1
			AUR26584.1
			AUR26583.1
			AUR26582.1
AUR26581.1			
AUR26580.1			

	<i>Sarcocystis neurona</i>	GenBank	AUR26579.1
			AUR26578.1
			ANJ04967.1
			ALJ92653.1
			QHN60671.1
			ALJ92640.1
			ADG26778.1
			ADG26777.1
			ATU47062.1
			ACU82381.1
			ACU82380.1
			ACU82379.1
	ACU82378.1		
	<i>Sarcocystis sp.</i>	GenBank	OES86637.1
			AXY98039.1
			ALJ92652.1
			ALJ92651.1
			ALJ92650.1
			ALJ92649.1
			ALJ92648.1
			ALJ92647.1
			ALJ92646.1
			ALJ92645.1
			ALJ92644.1
			ALJ92643.1
			ALJ92642.1
			ALJ92641.1
			AFK82448.1
			AFK82447.1
			AFK82446.1
			AFK82445.1
			AFK82444.1
			AFK82443.1
AFK82442.1			
AFK82441.1			
AFK82440.1			
AFK82439.1			
AFK82438.1			
AFK82437.1			
AFK82436.1			
AFK82435.1			
AFK82434.1			
AFK82433.1			
AFK82432.1			
AFK82431.1			
AFK82430.1			
AFK82429.1			
AFK82428.1			
AMD10031.1			
<i>Antígeno superficial 2 (parcial)</i>	<i>Sarcocystis falcatula</i>	GenBank	AUR26559.1
			AUR26558.1
			AUR26557.1
			AUR26556.1
			AUR26555.1

			<i>AUR26554.1</i>
			<i>AUR26571.1</i>
			<i>AUR26570.1</i>
			<i>AUR26569.1</i>
			<i>AUR26568.1</i>
			<i>AUR26567.1</i>
			<i>AUR26566.1</i>
			<i>AUR26565.1</i>
			<i>AUR26564.1</i>
			<i>AUR26563.1</i>
			<i>AUR26562.1</i>
			<i>AUR26561.1</i>
			<i>AUR26560.1</i>
			<i>ANJ04968.1</i>
			<i>ALJ92638.1</i>
	<i>Sarcocystis neurona</i>	<i>GenBank</i>	<i>QHN60670.1</i>
			<i>ALJ92630.1</i>
			<i>OES86634.1</i>
			<i>AXY98038.1</i>
			<i>ALJ92639.1</i>
			<i>ALJ92637.1</i>
			<i>ALJ92636.1</i>
			<i>ALJ92635.1</i>
			<i>ALJ92634.1</i>
			<i>ALJ92633.1</i>
			<i>ALJ92632.1</i>
			<i>ALJ92631.1</i>
			<i>AFK82427.1</i>
			<i>AFK82426.1</i>
			<i>AFK82425.1</i>
			<i>AFK82424.1</i>
			<i>AFK82423.1</i>
			<i>AFK82422.1</i>
			<i>AFK82421.1</i>
			<i>AFK82420.1</i>
			<i>AFK82419.1</i>
			<i>AFK82418.1</i>
			<i>AFK82417.1</i>
			<i>AFK82416.1</i>
			<i>AFK82415.1</i>
			<i>AFK82414.1</i>
			<i>AFK82413.1</i>
			<i>AFK82412.1</i>
			<i>AFK82411.1</i>
			<i>AFK82410.1</i>
			<i>AFK82409.1</i>
			<i>AFK82408.1</i>
			<i>AFK82407.1</i>
			<i>AFK82406.1</i>
			<i>AFK82405.1</i>
			<i>AFK82404.1</i>
			<i>AFK82403.1</i>
			<i>AFK82402.1</i>
	<i>Sarcocystis sp.</i>	<i>GenBank</i>	

*Grupos de proteínas representantes.

6.2 Estructura del anticuerpo de *Toxoplasma gondii* por difracción de rayos X

Sólo se encontró una estructura que cumplía con los requerimientos mencionados en el apartado de materiales y métodos. Dicha estructura fue la forma monomérica del fragmento de unión a antígeno (Fab) del anticuerpo murino dirigido hacia el antígeno superficial 1 (SAG1) de *Toxoplasma gondii* obtenida por difracción de rayos X (PDB: 1YNT) (Graille et al., 2005) (**Figura 14**). Posteriormente, se eliminaron las cadenas C, D, E, F y G con ayuda del programa bioinformático UCSF chimera dejando únicamente la región Fab de la cadena ligera variable (cadena A) y la región Fab de la cadena pesada variable (cadena B) (**Figura 15**).

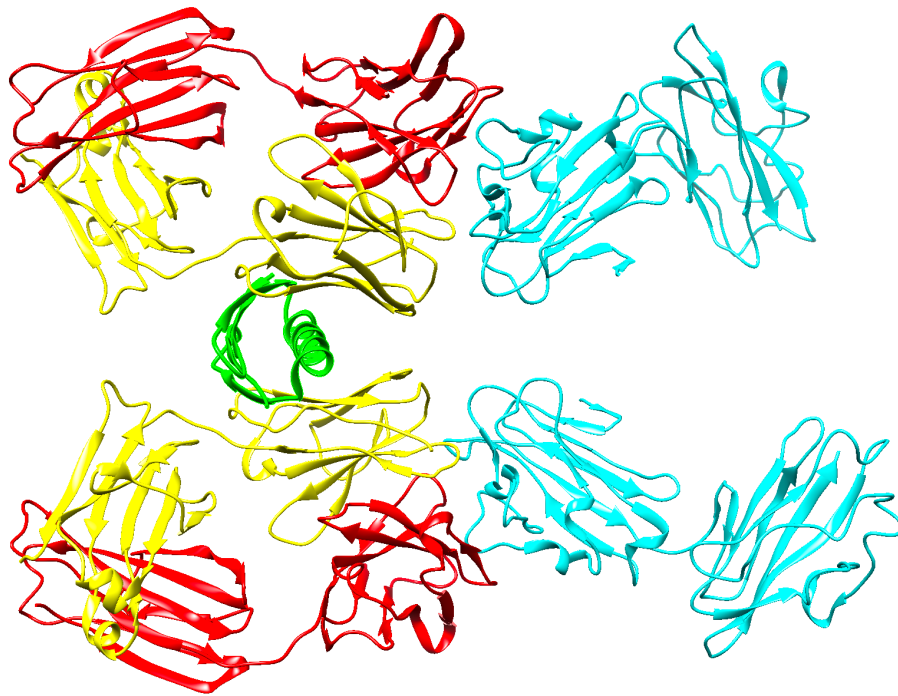


Figura 14 . Estructura de la forma monomérica del antígeno superficial 1 (SAG1) de *Toxoplasma gondii* unido a un fragmento de unión a antígeno (Fab) murino. Obtenida por difracción de rayos X (PDB: 1YNT)(Graille et al., 2005). Región Fab de la cadena ligera variable (amarillo); Región Fab de la cadena pesada variable (rojo); Proteína L (verde); Antígeno superficial 1 (SAG1) de *Toxoplasma gondii* (cian).

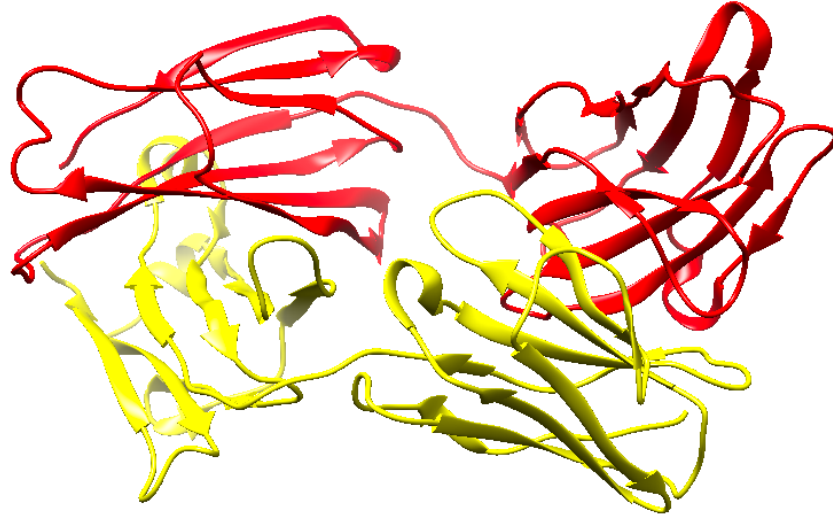


Figura 15. Tratamiento de la estructura de la forma monomérica del antígeno superficial 1 (SAG1) de *Toxoplasma gondii* unido a un fragmento de unión a antígeno (Fab) murino. Obtenida por difracción de rayos X (PDB: 1YNT) (Graille et al., 2005). Región Fab de la cadena ligera variable (amarillo); Región Fab de la cadena pesada variable (rojo).

6.3 Modelado tridimensional

6.3.1 Por homología

Se generaron 6 predicciones de modelos tridimensionales por homología a partir de una secuencia representante de los antígenos superficiales 1-6 de *Sarcocystis neurona* (**Figura 16**). Los modelos seleccionados fueron los que mejor cumplían con las características mencionadas en la sección de materiales y métodos.

Los plantados utilizados durante el modelamiento fueron las proteínas cristalizadas esporozoíto-específica SAG (PDB: 2wnk.1.A) para los antígenos superficiales 1, 3, 4, 5 y 6. El antígeno superficial de bradizoíto BSR4 de *Toxoplasma gondii* (PDB: 2jks.1.A) fue utilizado como plantado para el antígeno superficial 2. Para la elección de los plantados, se tomó en cuenta que el motivo característico de la familia proteica estuviera presente y se encontrara íntegramente conservado.

6.3.2 Por AlphaFold2

Mediante este método también se generaron 6 predicciones de modelos tridimensionales con las mismas secuencias primarias con las que se realizó el modelado por homología

(Figura 17). Sin embargo, estos modelos mostraron grandes diferencias en los extremos terminales en comparación con los mencionados en el punto anterior.

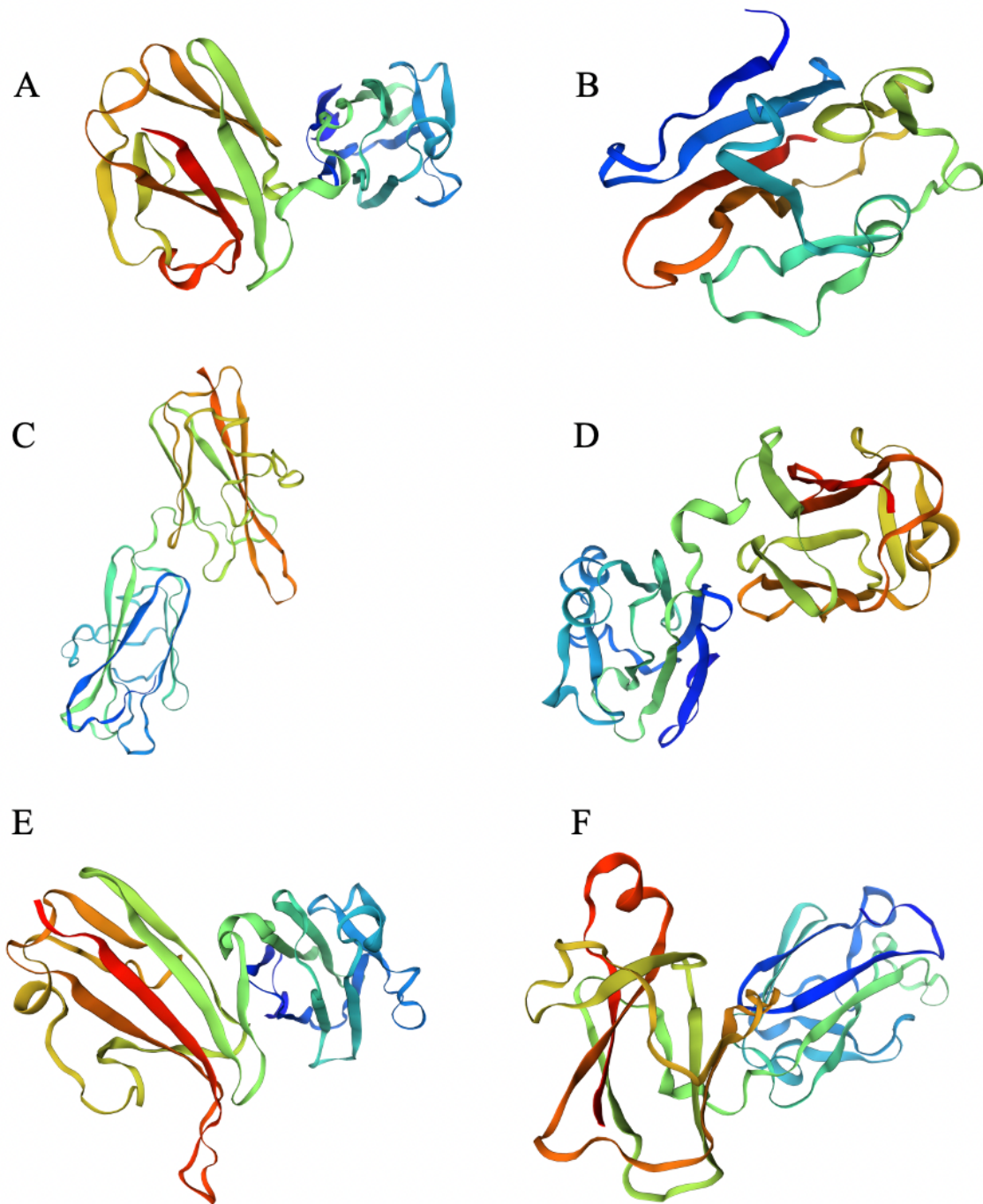


Figura 16. Predicción de las estructuras terciarias por homología hechas por la herramienta SWISS-MODEL para los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona*. A) Antígeno superficial 1 (SAG1); B) Antígeno superficial 2 (SAG2); C) Antígeno superficial 3 (SAG3); D) Antígeno superficial 4 (SAG4); E) Antígeno superficial 5 (SAG5); F) Antígeno superficial 6 (SAG6). (Waterhouse et al., 2018)

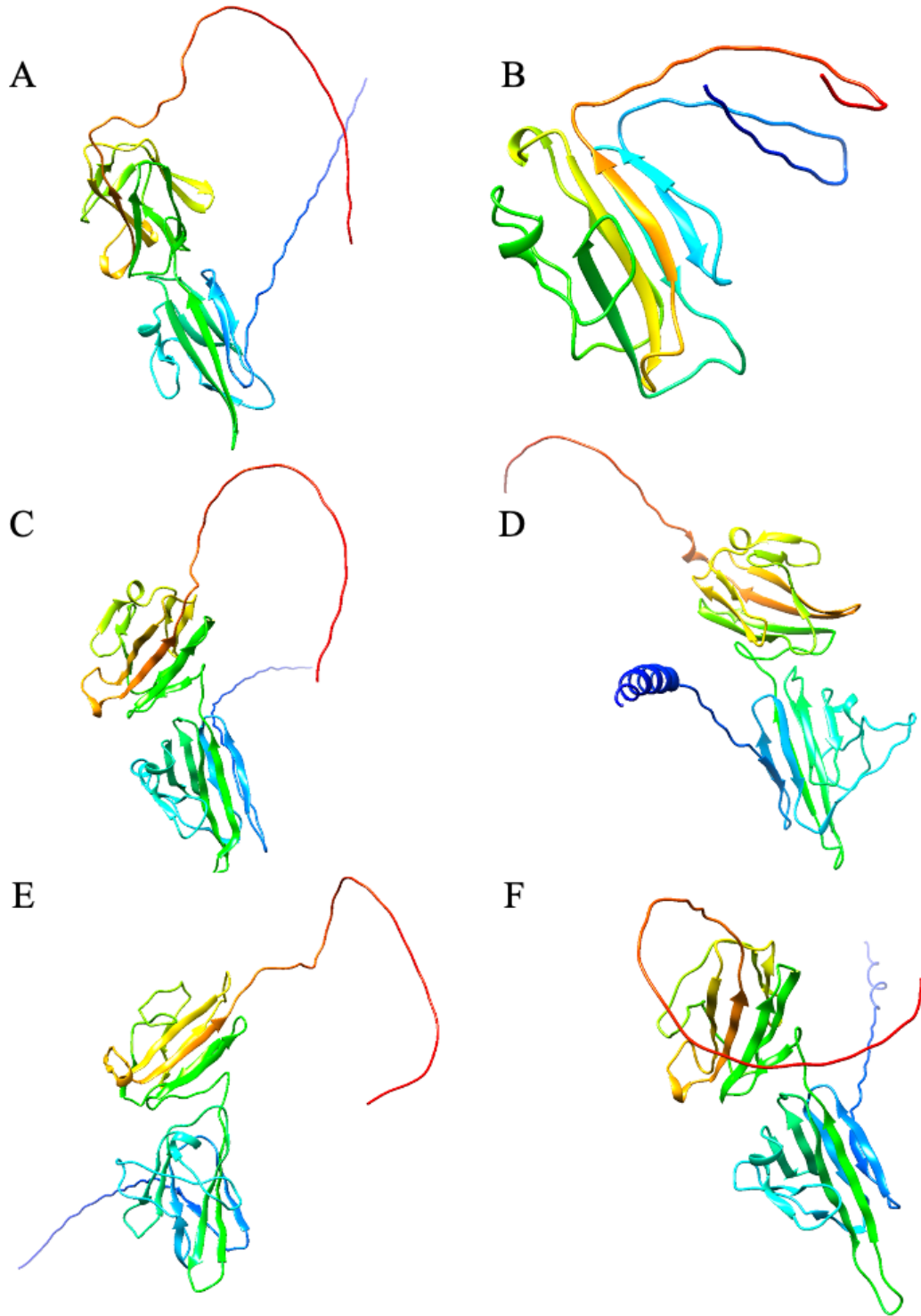


Figura 17. Predicción de las estructuras terciarias por AlphaFold2 para los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona* (Mirdita et al., 2021). A) Antígeno superficial 1 (SAG1); B) Antígeno superficial 2 (SAG2); C) Antígeno superficial 3 (SAG3); D) Antígeno superficial 4 (SAG4); E) Antígeno superficial 5 (SAG5); F) Antígeno superficial 6 (SAG6).

6.4 Acoplamiento molecular proteína-proteína (*Docking molecular*)

Se generaron 30 modelos para cada una de las interacciones que se ingresaron al servidor web ClusPro, de los cuales sólo se consideró al modelo que más se pareciera a la molécula nativa encontrada en el PDB (1YNT).

Para la selección antes mencionada, se compararon las interacciones por puentes de hidrógeno entre la proteína nativa y los modelos del ClusPro con ayuda del visualizador BIOVIA Discovery Studio (**Figura 18, 20, 21**). De igual forma, se hizo una superposición de los modelos y la proteína de PDB a través del mismo visualizador (**Figura 19**). De esta manera se determinaron zonas de interacción del anticuerpo y dominio.

Asimismo, se reportaron las puntuaciones generadas por ClusPro para cada uno de los modelos seleccionados del docking molecular (**Tabla 6-8**). Los resultados muestran que para el acoplamiento del antígeno superficial 1 de *T.gonii* y el Fab murino hay 88 aminoácidos interactuantes con una energía de interacción de -402.4, mientras que para de la misma fracción del anticuerpo murino y la estructura 3D para el antígeno superficial 3 de *Sarcocystis neurona* generada por homología, fue de 70 aminoácidos interactuantes con una energía de -364.5 (interacción mejor puntuada). Por último, el acoplamiento molecular con más moléculas interactuantes (68) y menor energía (-350.7) del modelamiento por AlphaFold2 fue el modelo para el antígeno superficial 2 de *Sarcocystis neurona* y la fracción del mismo anticuerpo murino.

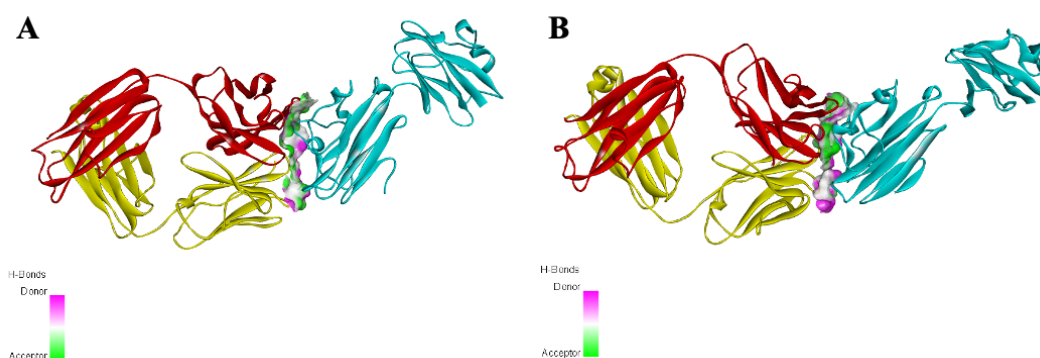


Figura 18. Interacciones intermoleculares (puentes de hidrógeno) del fragmento de unión a antígeno (Fab) y el antígeno superficial 1 (SAG1) de *Toxoplasma gondii*. A) Modelo obtenido por difracción de rayos (PDB: 1YNT) (Graille et al., 2005). B) Modelo obtenido del docking molecular del servidor web ClusPro (modelo 1) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012). Región Fab de la cadena ligera variable (amarillo); Región Fab de la cadena pesada variable (rojo); Antígeno superficial 1 (SAG1) de *Toxoplasma gondii* (cian).

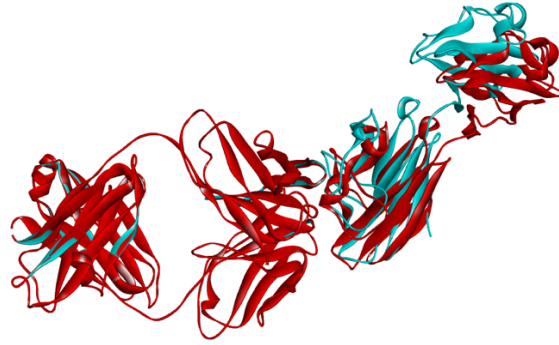


Figura 19. Comparación estructural del fragmento de unión a antígeno (Fab) y el antígeno superficial 1 (SAG1) de *Toxoplasma gondii*. Modelo obtenido por difracción de rayos X (PDB: 1YNT) (Graille et al., 2005) (Azul). Modelo del docking molecular obtenido del servidor web ClusPro (modelo 1) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012) (Rojo).

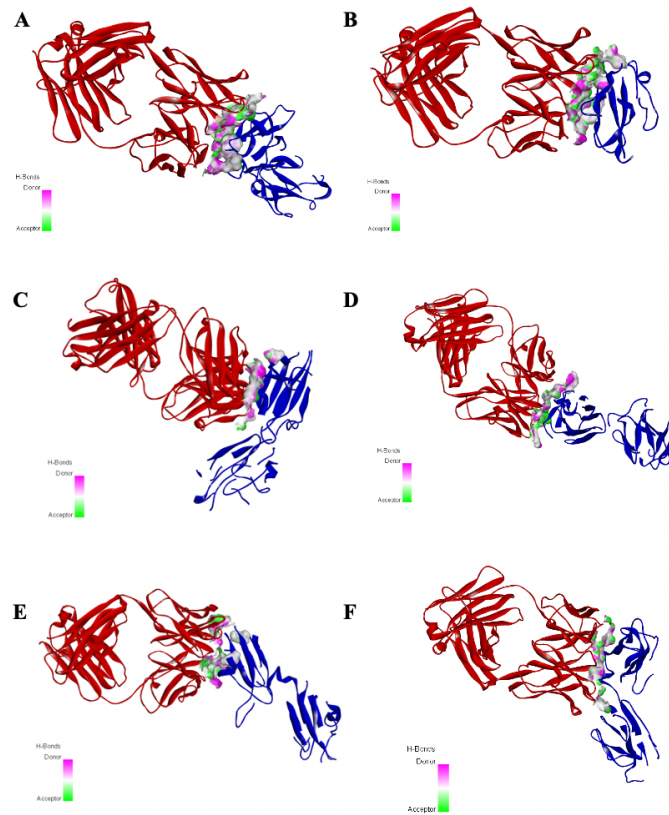


Figura 20. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona* a través del servidor web ClusPro modelados por homología (puentes de hidrógeno) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012). Se muestran los puentes de hidrógeno (H-bonds) entre las moléculas interactuantes. A) Interacción Fab-SAG1. B) Interacción Fab-SAG2. C) Interacción Fab-SAG3. D) Interacción Fab-SAG4. E) Interacción Fab-SAG5. F) Interacción Fab-SAG6. Fragmento de unión a antígeno (Fab)(rojo); Antígenos superficiales modelados por homología (azul).

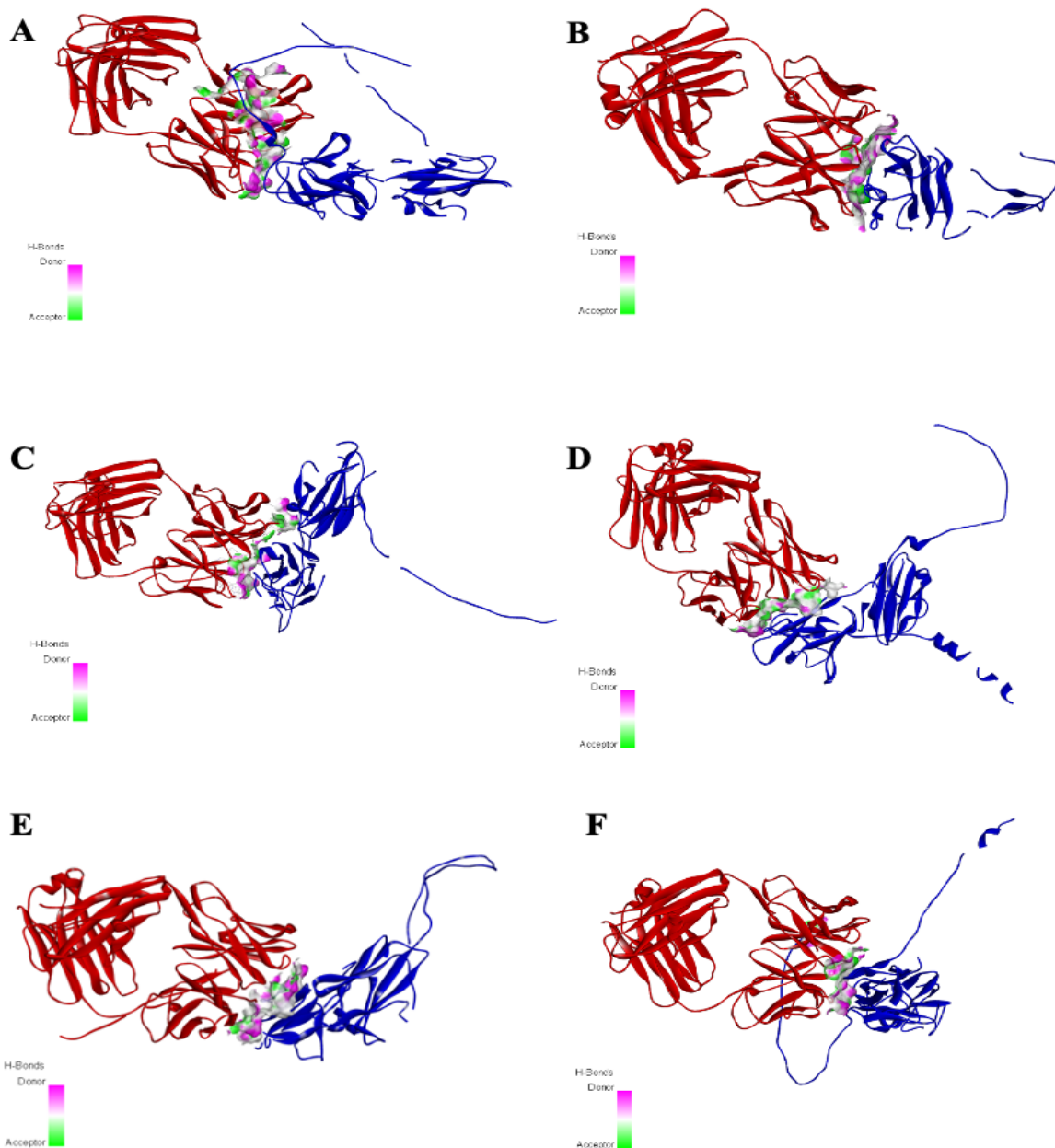


Figura 21. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona* a través del servidor web ClusPro modelados por AlphaFold2 (puentes de hidrógeno) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012). Se muestran los puentes de hidrógeno (H-bonds) entre las moléculas interactuantes. A) Interacción Fab-SAG1. B) Interacción Fab-SAG2. C) Interacción Fab-SAG3. D) Interacción Fab-SAG4. E) Interacción Fab-SAG5. F) Interacción Fab-SAG6. Fragmento de unión a antígeno (Fab)(rojo); Antígenos superficiales modelados por AlphaFold2 (azul).

Tabla 6. Puntuación generada por el servidor web ClusPro (modificada)(Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012) para el acoplamiento molecular del antígeno superficial de *Toxoplasma gondii* y el fragmento de unión a antígeno.

Modelo in vitro	Aminoácidos interreactantes	Representante	Puntuación ponderada
<i>TgSAG-1</i>	88	<i>Menor energía</i>	-402.4

Tabla 7. Puntuaciones generadas por el servidor web ClusPro (modificadas)(Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012) para el acoplamiento molecular de los antígenos superficiales de *Sarcocystis neurona* (generados por homología) y el fragmento de unión a antígeno.

Modelo Homología	Aminoácidos interreactantes	Representante	Puntuación ponderada
<i>SnSAG-1</i>	47	<i>Menor energía</i>	-340.8
<i>SnSAG-2</i>	59		-346.9
<i>SnSAG-3</i>	70		-364.5
<i>SnSAG-4</i>	55		-338.1
<i>SnSAG-5</i>	49		-313.7
<i>SnSAG-6</i>	60		-333.3

Tabla 8. Puntuaciones generadas por el servidor web ClusPro (modificadas)(Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012) para el acoplamiento molecular de los antígenos superficiales de *Sarcocystis neurona* (generados por AlphaFold2) y el fragmento de unión a antígeno.

Modelo AlphaFold2	Aminoácidos interreactantes	Representante	Puntuación ponderada
<i>SnSAG-1</i>	39	<i>Menor energía</i>	-373.6
<i>SnSAG-2</i>	68		-350.7
<i>SnSAG-3</i>	42		-350.5
<i>SnSAG-4</i>	36		-330.1
<i>SnSAG-5</i>	32		-381.6
<i>SnSAG-6</i>	45		-354.7

7. Discusión

Como se ha explicado a lo largo de este trabajo, existen diversas proteínas compartidas en los organismos apicomplexos que podrían tener funciones determinantes para la sobrevivencia de los parásitos y que por dicha cualidad se hayan conservado a lo largo de su historia evolutiva. Si bien, dichas moléculas no están conservadas al 100%, pequeñas porciones aminoacídicas de estas sí lo están, demostrando de esta manera que una proteína no requiere de su molécula intacta para generar efectos antígenicos o funcionales, más bien, la molécula produce estos efectos a través de regiones individuales (Wang y Yin; 2014).

En la mayoría de los protozoarios apicomplexos, se ha identificado una extensa variedad de proteínas como las de organelos secretorios (GRA, ROP, RON y MIC) y antígenos superficiales (SAG/SRS) mismas que poseen homologías con porcentajes de identidad variada dentro de las especies que pertenecen a la familia *Sarcocystidae* (Zhang et al., 2011; García-Lunar et al., 2015). Aunado a esto, se ha demostrado que estas moléculas poseen similitudes estructurales en los dominios que presentan (Reid et al., 2012; Bezerra et al., 2019), siendo estos factores vitales en los procesos que estas moléculas desempeñan.

Asimismo, los SAG por su importancia en el ciclo biológico de estos organismos, han sido blanco de diversas investigaciones enfocadas en el diseño de vacunas y pruebas diagnósticas como el ELISA (Yan et al., 2012; Macêdo et al., 2013). En 2021, Liyanage y colaboradores, se encargaron de describir los tipos de antígenos ocupados para la detección de la toxoplasmosis en distintos ELISA, destacando el uso de SAG, principalmente de SAG1 y SAG2 como antígenos nativos, recombinantes y quiméricos, tanto en animales como en seres humanos. De igual forma, los SAG son ocupados para pruebas diagnósticas dirigidas a *Neospora caninum* (Bezerra et al., 2019) y *Sarcocystis spp.* (Decker et al., 2019), lo que demuestra su versatilidad para ser usados en distintas pruebas y su importancia en la función biológica de los organismos de este grupo.

Debido a las funciones equivalentes y a la similitud estructural previamente descrita de las proteínas SAG, así como la presencia de anticuerpos de reactividad cruzada, se permite hipotetizar que, en las pruebas serológicas, existan falsos positivos, que sobre estimen la presencia de algún parásito más relevante, como *Toxoplasma gondii*, en comparación de otros menos estudiados, como *Sarcocystis*.

La reactividad cruzada es definida como la capacidad de elementos estructuralmente diferentes para realizar la misma función (Edelman y Gally, 2001). A pesar de que los anticuerpos son moléculas altamente específicas, se ha descubierto que exhiben reactividad cruzada. Estos anticuerpos interactúan con epítomos comunes en diferentes antígenos y se ha demostrado que en antígenos químicamente similares existen subunidades comunes de reacción, aunque también, dos epítomos químicamente diferentes pueden compartir formas complementarias sin que las subunidades sean idénticas (Jain y Salunke, 2019), mostrando que se puede lograr un epítomo común entre los conjuntos de péptidos que se encuentran en los antígenos (Hoffmüller et al., 2000). Por lo que para los análisis de reactividad cruzada hay que tener en cuenta dos puntos esenciales. El primero de ellos son la identificación de sitios similares en las moléculas, mientras que el segundo es la estructura de las mismas en donde se puedan identificar epítomos conformacionales.

Para dilucidar la posible reacción cruzada, en este trabajo se obtuvieron un total de 227 secuencias primarias de *Sarcocystis spp.* mismas que están descritas para la etapa de merozoíto y que tienen una longitud que va de los 168 a los 287 aminoácidos (Anexo 1) predominando los reportes de las especies *Sarcocystis neurona* y *Sarcocystis falcatula*. Sin embargo, muchas de estas eran idénticas en cuanto a amplitud y aminoácidos que tenían, por lo que sólo se consideraron 6 (una para cada proteína superficial) ya que eran las que mejor cumplían con los requerimientos establecidos en la sección de materiales y métodos. Asimismo, la mayoría de los antígenos elegidos cuenta con dos dominios estructurales, uno amino terminal (D1) y uno carboxilo terminal de anclaje a glicolípido (D2) (con excepción del SAG2).

Estos datos concuerdan con lo reportado por Howe et al., 2004 en el que se describen las propiedades moleculares de los SAG 1-4 obtenidos a partir de una base de datos de marcadores de secuencia expresados (EST) de la cepa SN3 de *S. neurona*. Estas proteínas, tienen una extensión de cadena primaria de 276, 168, 287 y 281 aminoácidos respectivamente, de igual forma, los datos concuerdan con la cantidad de dominios para cada antígeno, destacando el dominio único presentado en el SAG2 (Howe et al., 2004). Asimismo, distintos trabajos determinaron que SAG5 y SAG6 también contaban con dos dominios estructurales así como una extensión de 272 y 281 aminoácidos (Crowdus et al., 2008; Wendte et al., 2010). La búsqueda de estas moléculas en otras bases de datos

especializadas, así como la investigación de las mismas de distintas cepas o por nombres sinónimos podría enriquecer la cantidad de moléculas a analizar.

Por otro lado, sólo se encontró un anticuerpo murino cristalizado dirigido al antígeno superficial 1, por lo que se decidió ocupar dicha molécula en todas las proteínas superficiales de *Sarcocystis* utilizadas para el docking. Si bien, este anticuerpo fue desarrollado en ratones, mostró buena capacidad de competir contra sueros humanos específicos contra toxoplasma, lo que sugiere que puede ser representativo de la respuesta anti-toxoplasma humana (Graille et al., 2005). De igual forma, en el trabajo realizado por Graille y colaboradores en 2005 se acentúa que este anticuerpo está dirigido a un epítipo conformacional presente en la región amino terminal (D1) de la molécula SAG1, siendo determinante para la elección de sitio de interacción en las proteínas analizadas en este trabajo. De este mismo modo, la pérdida de epítopos lineales en extremos terminales de las proteínas ha demostrado ausencia en la reactividad cruzada entre especies relacionadas (Macêdo et al., 2013). Asimismo, estos datos podrían enriquecerse generando anticuerpos (*in vitro* o *in silico*) contra distintos epítopos reportados en bases de datos que pudieran encontrarse en los diferentes antígenos superficiales y no sólo para el dominio amino terminal (D1) sino que también para el dominio carboxilo terminal (D2), lugar donde se han reportado reacciones en algunos otros parásitos (Macêdo et al., 2013).

En relación con la configuración de las proteínas y como es bien sabido, las formas tridimensionales cumplen un papel determinante en las proteínas, ya que la pérdida de la estructura o cambios en la misma está íntimamente relacionada con la falta de funcionalidad. Ante esta situación, un buen plegamiento de las proteínas permite acercarnos de mejor manera a una representación fiable de como estas moléculas se encuentran en la naturaleza. Por esto mismo y en la búsqueda del mejor plegamiento, se probaron dos tipos de modelamientos computacionales de los cuales se generaron 6 estructuras tridimensionales por tipo de modelado. Si bien, las dos metodologías cumplieron con la generación de representaciones en 3 dimensiones, existieron diferencias marcadas en cada una de ellas. La principal y más notoria fueron los extremos terminales de las proteínas generadas por AlphaFold2 las cuales ocasionaron bajos puntajes en las validaciones hechas para cada una de las moléculas. Esto está reportado en artículos en los que describen los análisis hechos por el programa (Bouatta et al., 2021). Pese a ello, AlphaFold2 ha sido catalogado como el mejor

método para el modelamiento computacional de proteínas de acuerdo con la Evaluación Crítica de Técnicas para la Predicción de la Estructura de proteínas (CASP14) de 2020, teniendo una precisión competitiva con las estructuras obtenidas experimentalmente (en la mayoría de los casos) a la hora de generar proteínas a partir de su estructura primaria (Jumper et al., 2021). Sin embargo, un factor a tomar en consideración es que en este trabajo se utilizó una extensión de Google para este programa, el cual permitía utilizarlo de manera no local lo que se tradujo en una pérdida en la precisión del modelaje debido a la reducción de las bases de datos en las que se buscan las secuencias de referencia (Mirdita et al., 2022). Los resultados podrían mejorar si se ocupara AlphaFold2 de manera local; no obstante, la extensión ocupada tiene buenos resultados.

El modelaje por homología se hizo a través de SWISS-MODEL programa ampliamente utilizado en la generación de modelos a partir de una estructura que funje como plantilla, misma que ha sido registrada en la base de datos PDB y generada a partir de métodos de laboratorio (Biasini et al., 2014). Dicha plantilla debe tener características particulares y tener porcentajes de identidad (cantidad de aminoácidos similares) mayores o iguales al 20% en relación con la molécula objetivo (modelada). Existe una gran problemática en cuanto a la elección de las plantillas, ya que a pesar de tener bibliotecas con múltiples proteínas no existen las suficientes moléculas que se desempeñen como buenas plantillas o moléculas de referencia, lo que conlleva a un plegado deficiente (Biasini et al., 2014). En este trabajo, los porcentajes de identidad iban desde un 21.37% a un 31.76% siendo el SAG6 la molécula con un mejor puntaje y contaban con moléculas homólogas de *T. gondii*. Todo esto generó que los antígenos obtenidos por este método fueran los que contaran con cifras de validación altas. Pese a ello, los análisis realizados en BLAST mostraron que había moléculas de *T. gondii* más con más aminoácidos similares (Anexo 1), sin embargo, dichas moléculas no tenían modelos 3D con los cuales se pudieran generar modelos *in silico*. Esto último también es importante, debido a que estos antígenos podrían ser mejores candidatos en la generación de posibles reactividades cruzadas.

Por último, el docking molecular se realizó con ClusPro el cual funciona con un método de cuerpo rígido en el que una molécula que funje como receptor se mantiene estática mientras la otra (el ligando) va rotando generando de esta manera energía de interacción para cada una de las conformaciones descrita como una suma de algunas funciones (Katchalski-

Katzir et al., 1992). Este tipo de métodos tiene factores importantes que destacar. El primero de ellos, es la complementariedad de la forma en la función de puntuación, ya que algunas conformaciones cuentan con mejores puntuaciones (menor energía) alejadas de los sitios de interés. En otras palabras, las conformaciones acopladas que están cerca de la estructura nativa no necesariamente tienen las energías más bajas, mientras que las conformaciones de baja energía pueden ocurrir lejos de las estructuras de rayos X (Desta et al., 2020). El segundo punto a considerar es la expresión de energía, ya que esta debe estar descrita como la sumatoria de funciones de correlación. Estas funciones no sólo deben basarse en los puntajes obtenidos por complementariedad, sino que también se deben considerar aquellas que representen interacciones como las electrostáticas, importantes en los acoplamientos proteína-proteína (Brenke et al., 2012).

En este trabajo, se obtuvieron 180 modelos de interacción, de los cuales sólo se seleccionó uno por cada antígeno ingresado (de los dos tipos de modelamiento) y el Fab murino. Dicha selección fue hecha con base en la posición de las moléculas y el tipo de dominio interactuante de las mismas. De igual forma, se recopilaron las tablas de moléculas interactuantes para el modelo seleccionado destacando las puntuaciones de energía para ese modelo. Si bien estos datos generan hipótesis de los sitios de interacción y fragmentos interactuantes, hay que tener en cuenta que todo esto depende de la calidad de los modelos ingresados al servidor que es la principal causa de la variabilidad en los datos (Desta et al., 2020). De igual manera, hay que tener en cuenta que a pesar de que los métodos computacionales han aumentado su capacidad de predicción en las interacciones moleculares, es muy probable que en la naturaleza existan factores microambientales que influyan en la mayor o menor capacidad de funcionalidad entre moléculas. Asimismo, este trabajo buscó resaltar la cantidad de aminoácidos que reaccionaban entre las moléculas para que de esta manera se pudiera determinar las posibles reacciones cruzadas a través de epítomos.

La elección del servidor ClusPro en comparación con algunos servidores con métodos rígidos como ZDOCK y pyDock así como de acoplamientos flexibles como SwarmDock y HADDOCK fue porque ClusPro es un método completamente automatizado, rápido, que permite hacer los acoplamientos sin elegir regiones de interacción específica y ha sido catalogado por la Critical Assessment of PRedicted Interactions (CAPRI) y el Critical

Assessment of Structure Prediction (CASP) (pruebas de evaluación) como uno de los mejores servidores de acoplamiento molecular (Desta et al, 2020). Sin embargo, SwarmDock y HADDOCK son los métodos que generan modelos de mayor precisión (Desta et al, 2020) por lo que el uso de estos servidores podrían generar datos más cercanos a la realidad en comparación con los aquí mostrados.

8. Conclusión

El antígeno superficial 3 (SAG3) de *Sarcocystis neurona* modelado por homología y el antígeno superficial 2 (SAG2) modelado por AlphaFold2 tienen mayor probabilidad, por métodos computacionales, de generar reactividad cruzada con la fracción Fab del anticuerpo murino contra *Toxoplasma gondii*, debido a la mayor cantidad de aminoácidos interactuantes. No obstante, no deben descartarse posibles reactividades cruzadas con moléculas provenientes de algunos otros parásitos apicomplexos como *Neospora caninum*, así como de otras moléculas como las de organelos secretores (MIC, GRA y ROP). Asimismo, los datos aquí generados, deben constatararse por métodos experimentales, ya que, a pesar de que se trató de encontrar un tipo de modelamiento tridimensional que permitiera acercar a las moléculas lo mejor posible a la realidad y, debido a la falta de más anticuerpos en contra de estas proteínas, es posible que haya variabilidad en los datos aquí mostrados y las investigaciones *in vivo*.

9. Referencias

- Ambrosetti, F., Jiménez-García, B., Roel-Touris, J., & Bonvin, A. (2020). Modeling Antibody-Antigen Complexes by Information-Driven Docking. *Structure (London, England: 1993)*, 28(1), 119–129.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.10.011>
- Arness, M.K., Brown, J.D., Dubey, J.P., Neafie, R.C., Granstrom, D.E., (1999). An outbreak of acute eosinophilic myositis attributed to human *Sarcocystis* parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 61, 548–553.
- Augusto, L., Week, R., Sullivan, W. (2020). Host sensing and signal transduction during *Toxoplasma* stage conversion. *Molecular microbiology*. 115 (5). 839-848. <https://doi.org/10.1111/mmi.14634>
- Azzouz, N., Kamena, F., Laurino, P., Kikkeri, R., Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.F., Dubremetz, J.F., De Cola, L., Seeberger, P.H. (2013). *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures. *Glycobiology* 23, 106–120. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws134>.
- Baszler, T. V, Knowles, D. P., Dubey, J. P., Gay, J. M., Mathison, B. A., & McElwain, T. F. (1996). Serological Diagnosis of Bovine Neosporosis by *Neospora caninum* Monoclonal Antibody-Based Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 34, Issue 6).
- Beaver, P.C., Gadgil, R.K., Morera, P. (1979). *Sarcocystis* in man: a review and report of five cases. *Am J Trop Med Hyg* 28:819 – 844.
- Besteiro, S., Dubremetz, J.F., Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell. Microbiol.* 13, 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>.
- Bezerra, M.A., Pereira, L.M., Bononi, A., Biella, C.A., Baroni, L., Pollo-Oliveira, L., Yatsuda, A.P. (2017). Constitutive expression and characterization of a surface SRS (NcSRS67) protein of *Neospora caninum* with no orthologue in *Toxoplasma gondii* *Parasitol. Int.*, 66. 173-180.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary

- information. *Nucleic acids research*, 42(Web Server issue), W252–W258.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
- Bjerkas, I., Jenkins, M. C., & Dubey, J. P. (1994). Identification and Characterization of *Neospora caninum* Tachyzoite Antigens Useful for Diagnosis of Neosporosis. In *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY* (Vol. 1, Issue 2).
- Bjorkman, C., Lunden, A., Holmdahl, J., Barber, J., Trees, A. J., & Ugglaz, A. (1994). *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, 16, 643–648.
- Blader, I. J., & Saeij, J. P. (2009). Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: Impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. In *APMIS* (Vol. 117, Issues 5–6, pp. 458–476). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x>
- Blazejewski, T., Nursimulu, N., Pszeny, V., Dangoudoubiyam, S., Namasivayam, S., Chiasson, M. A., Chessman, K., Tonkin, M., Swapna, L. S., Hung, S. S., Bridgers, J., Ricklefs, S. M., Boulanger, M. J., Dubey, J. P., Porcella, S. F., Kissinger, J. C., Howe, D. K., Grigg, M. E., & Parkinsona, J. (2015). Systems-based analysis of the *sarcocystis neurona* genome identifies pathways that contribute to a heteroxenous life cycle. *MBio*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02445-14>
- Boothroyd, J., & Grigg, M. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 438–442.
- Boothroyd, J.C., Dubremetz, J.F., (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature reviews. Microbiology* 6, 79–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>.
- Bouatta, N., Sorger, P., AlQuraishi, M. (2021). Protein structure prediction by AlphaFold2: are attention and symmetries all you need?. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, 77(Pt 8), 982–991. <https://doi.org/10.1107/S2059798321007531>
- Brenke R, Hall DR, Chuang G-Y, Comeau SR, Bohnuud T, Beglov D, Schueler-Furman O, Vajda S, Kozakov D. (2012). Application of asymmetric statistical potentials to antibody-protein docking. *Bioinformatics*. 28(20):2608-2614
- Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L., Boothroyd, J.C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 141. 3584-3591.

- Butcher, B.A., Denkers E. Y. (2002). Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect Immun.* 70: 5216-5224.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). Sarcocystosis. Recuperado el 26/01/2021 de: <https://www.cdc.gov/dpdx/sarcocystosis/index.html>
- Crawford, J., Tonkin, M. L., Grujic, O., & Boulanger, M. J. (2010). Structural characterization of apical membrane antigen 1 (AMA1) from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15644–15652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092619>
- Crowdus, C. A., Marsh, A. E., Saville, W. J., Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Granstrom, D. E., & Howe, D. K. (2008). SnSAG5 is an alternative surface antigen of *Sarcocystis neurona* strains that is mutually exclusive to SnSAG1. *Veterinary parasitology*, 158(1-2), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.012>
- de Muno, R. M., Moura, M. A., de Carvalho, L. C., Seabra, S. H., & Barbosa, H. S. (2014). Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells in vitro. *Folia Parasitologica*, 61(2), 113–119. <https://doi.org/10.14411/fp.2014.017>
- Cong, H., Zhang, M., Xin, Q., Wang, Z., Li, Y., Zhao, Q., Zhou, H., He, S. (2013). Compound DNA vaccine encoding SAG1/SAG3 with A2/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasites Vectors*. 6. 63.
- Decker Franco, C., Wieser, S. N., Soria, M., de Alba, P., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2019). *In silico* identification of immunotherapeutic and diagnostic targets in the glycosylphosphatidylinositol metabolism of the coccidian *Sarcocystis aucheniae*. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi:10.1111/tbed.13438
- Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. (2020). Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*. 28 (9):1071-1081.
- Deshmukh, A. S., Gurupwar, R., Mitra, P., Aswale, K., Shinde, S., & Chaudhari, S. (2021). *Toxoplasma gondii* induces robust humoral immune response against cyst wall antigens in chronically infected animals and humans. *Microbial Pathogenesis*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104643>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Adams, D. S., Gay, J. M., Baszler, T. V., Blagburn, B. L. and Thulliez, P. (1996). Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research* 57, 329–336.

- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). *Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts* † (Vol. 11, Issue 2).
- Dubey, J. P., Verma, S. K., Dunams, D., Calero-Bernal, R., & Rosenthal, B. M. (2015). Molecular characterization and development of *Sarcocystis speeri* sarcocysts in gamma interferon gene knockout mice. *Parasitology*, *142*(13), 1555–1562. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001109>
- Dubey, J.P., Calero-Bernal, R., Rosenthal, B., Speer, C.A., Fayer, R., (2016). *Sarcocystosis of Animals and Humans*, 2 ed. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Edelman, G.M. y Gally, J.A. (2001) Degeneracy and complexity in biological systems. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 13763–8 <https://doi.org/10.1073/pnas.231499798>
- Eza, D., & Lucas, S. (2006). Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. *VIH Med.*, *7*, 415–420.
- Fayer, R., Esposito, D. H., & Dubey, J. P. (2015). Human infections with *Sarcocystis* species. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(2), 295–311. <https://doi.org/10.1128/CMR.00113-14>
- Frenkel, J. K., & Dubey, J. P. (1975). *Hammondia hammondi* gen. nov., sp.nov., from Domestic Cats, a New Coccidian Related to *Toxoplasma* and *Sarcocystis* *. In *Z. Parasitenk* (Vol. 46).
- García-Lunar, P., Moréb, G., Camperob, L., Ortega-Mora L.M., Álvarez-García, G. (2015). Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence the serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Veterinary Parasitology* *214*, 49–54.
- Gautam, A., Dubey, J.P., Saville, W. J., Howe, D.K. (2011). The SnSAG merozoite surface antigens of *Sarcocystis neurona* are expressed differentially during the bradyzoite and sporozoite life cycle stages. *Veterinary Parasitology* *183*, 37–42.
- Gómez, C., Mondragón, R. (2014). Morfología celular. en M. L. Galván-Ramírez (Ed). *Toxoplasmosis animal.*(25-50pp.) Universidad de Guadalajara
- Graille, M., Stura, E. A., Bossus, M., Muller, B. H., Letourneur, O., Battail-Poirot, N., Sibai, G., Gauthier, M., Rolland, D., Le Du, M. H., & Ducancel, F. (2005). Crystal structure of the complex between the monomeric form of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1

- (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. *Journal of molecular biology*, 354(2), 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.028>
- Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galéotti, N., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G. (2006). The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6, 5773–5784. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600187>.
- Hernández-Cortazar, I., Acosta-Viana, K. Y., Ortega-Pacheco, A., Guzman-Marin, E. del S., Aguilar-Caballero, A. J., & Jiménez-Coello, M. (2015). Toxoplasmosis en México: Situación epidemiológica en humanos y animales. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 57, Issue 2, pp. 93–103). Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000200001>
- Hoffmüller, U., Knaute, T., Hahn, M., Höhne, W., Schneider-Mergener, J. and Kramer, A. (2000) Evolutionary transition pathways for changing peptide ligand specificity and structure. *EMBO J.* 19, 4866–4874 <https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4866>
- Howe, D. K., Tang, K., Conrad, P. A., Sverlow, K., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (2002). Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(3), 611–615. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.611-615.2002>
- Howe, D. K., Gaji, R. Y., Mroz-Barrett, M., Gubbels, M. J., Striepen, B., & Stamper, S. (2005). *Sarcocystis neurona* merozoites express a family of immunogenic surface antigens that are orthologues of the *Toxoplasma gondii* surface antigens (SAGs) and SAG-related sequences. *Infection and immunity*, 73(2), 1023–1033. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.1023-1033.2005>
- Jackson, M. H., and W. M. Hutchison. (1989). The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 55-105.
- Jacquet, A., Coulon, L., Nève, J., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Bollen, A., Jurado, M., Biemans, R. (2001). The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans *Mol. Biochem. Parasitol.* 116 (1). 35-44.
- Jain, D. y Salunke D. M. (2019). Antibody specificity and promiscuity. *Biochemical Journal.* 476 433–447 <https://doi.org/10.1042/BCJ20180670>

- Jisna, V. A., & Jayaraj, P. B. (2021). Protein Structure Prediction: Conventional and Deep Learning Perspectives. *The protein journal*, 40(4), 522–544. <https://doi.org/10.1007/s10930-021-10003-y>
- Katchalski-Katzir E, Shariv I, Eisenstein M, Friesem AA, Aflalo C, and Vakser IA (1992). Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89, 2195–2199.
- Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*. 12(2):255-278.
- Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella S, Xia B, Hall DR, Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 81(12):2159-66.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). El servidor web ClusPro para el acoplamiento de proteínas. *Protocolos de naturaleza*, 12(2), 255-278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon- Guyot, J., Dubremetz, J.F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B.W. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* 7, e1001276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>.
- Larsen, J. E., Lund, O., & Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*, 2, 2. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>
- Lekutis, C., Ferguson, D.J., Grigg, M.E., Camps, M., Boothroyd J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme *Int. J. Parasitol.*, 31 (12). 1285-1292
- Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2020). Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 1, pp. 205–222). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>
- Liu, Q., Wang, Z. D., Huang, S. Y., & Zhu, X. Q. (2015). Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. In *Parasites and Vectors* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>

- Lourenço, E.V., Pereira, S.R., Faça, V.M., Coelho-Castelo, A.A., Mineo, J.R., Roque-Barreira, M.C., Greene, L.J., Panunto-Castelo, A. (2001). Toxoplasma gondii micro-nemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology* 11, 541–547.
- Macêdo, A. G., Cunha, J. P., Cardoso, T. H., Silva, M. V., Santiago, F. M., Silva, J. S., Pirovani, C. P., Silva, D. A., Mineo, J. R., & Mineo, T. W. (2013). SAG2A protein from Toxoplasma gondii interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. *Parasites and Vectors*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-163>
- Mehrotra, R., D. Bisht, P. A. Singh, S. C. Gupta, and R. K. Gupta. (1996). Diagnosis of human *Sarcocystis* infection from biopsies of the skeletal muscle. *Pathology* 28:281-282.
- Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V.B., Toursel, C., Tomavo, S., Ajioka, J.W., Soldati, D. (2002). A family of transmembrane microneme proteins of Toxoplasma gondii contain EGF-like domains and function as escorters. *J. Cell. Sci.* 115, 563–574.
- Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. (2021). ColabFold - Making protein folding accessible to all. *bioRxiv*
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 19, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Mondragón, R. (2014). Invasión celular. en M. L. Galván-Ramírez (Ed). *Toxoplasmosis animal*. (81-110 pp.) Universidad de Guadalajara.
- Montoya, J. G., & Rosso, F. (2005). Diagnosis and management of toxoplasmosis. In *Clinics in Perinatology* (Vol. 32, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.clp.2005.04.011>
- Montoya, J., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363, 1965–1976.
- Moo-Hong, M. (1987). Serological Cross-Reactivity between Sarcocystis and Toxoplasma in Pigs. *The Korean Journal of Parasitology*, 25(2), 188–194.
- Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385–1394. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>
- Petersen E, Dubey JP. (2001). Biology of toxoplasmosis. In: Joynson DHM, Wreghitt TG (eds). *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. United Kingdom: Cambridge University Press. p 1-42.

- Ponomarenko, J., Bui, H. H., Li, W., Fussedder, 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>
- Poulsen C. S. y Stensvold C.R. (2014). Current Status of Epidemiology and Diagnosis of Human Sarcocystosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 52 (10), 3524–3530.
- Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Könem-Waisman, S., Lathan, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., Sanders, M., Shanmugan, D., Sohal, A., Wasmuth, J.D., Brunk, B., Grigg, M.E., Howard, J.C., Parkinson, J., Roos, D.S., Trees, A.J., Berrimen, M., Pain, A., Wastling, J.M. (2012). Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: coccidia differing in host range and transmission strategy *PLoS Pathog.*, 8. Article e1002567
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 25, Issue 2, pp. 264–296). <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Rosenthal, B. M. (2021). Zoonotic sarcocystis. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 136, pp. 151–157). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.02.008>
- Saadatnia, G., & Golkar, M. (2012). A review on human toxoplasmosis. In *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* (Vol. 44, Issue 11, pp. 805–814). <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>
- Santos, L., Ferreira, R. S., & Caffarena, E. R. (2019). Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2053, 13–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2
- Sokol-Borrelli, S. L., Coombs, R. S., & Boyle, J. P. (2020). A Comparison of Stage Conversion in the Coccidian Apicomplexans *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, and *Neospora caninum*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608283>
- Straub, K.W., Peng, E.D., Hajagos, B.E., Tyler, J.S., Bradley, P.J. (2011). The moving junction protein RON8 facilitates firm attachment and host cell invasion in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 7, e1002007. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002007>.
- Sukthana, Y. (2006). Toxoplasmosis: Beyond animals to humans. In *Trends in Parasitology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 137–142). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.01.007>

- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii: from animals to humans*.
- Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., Pugnière, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., & Boulanger, M. J. (2011). Host cell invasion by apicomplexan parasites: Insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*, 333(6041), 463–467. <https://doi.org/10.1126/science.1204988>
- Valderrama, P.A. (1999). Relación de la sarcocystiosis macroscópica en carne de alpaca con la presencia de lesiones bucales. Puno-Perú. 45p. En: Goyen, A. S., Moreno, E. M., Santana, M. P. 2018. Presencia de sarcocystis spp. en ovinos (*Ovis aries*) de Uruguay. (Tesis Licenciatura). Universidad de la República. Facultad de veterinaria. Montevideo, Uruguay.
- Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Kozakov D. (2017). New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 85(3):435-444.
- Vojtek, I., Buchy, P., Doherty, T. M., & Hoet, B. (2019). Would immunization be the same without cross-reactivity?. *Vaccine*, 37(4), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.005>
- Wang, Y. y Yin, H. (2014). Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & vectors*, 7, 180. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-180>
- Wasmuth, J.D., Brunk, B., Grigg, M.E., Howard, J.C., Parkinson, J., Roos, D.S., Trees, A.J., Berrimen, M., Pain, A., Wastling, J.M. (2012). Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: coccidia differing in host range and transmission strategy PLoS Pathog., 8. Article e1002567
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296-W303
- Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. In *International Journal for Parasitology*. 39 (8): 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>

- Wendte, J. M., Miller, M. A., Nandra, A. K., Peat, S. M., Crosbie, P. R., Conrad, P. A., & Grigg, M. E. (2010). Limited genetic diversity among *Sarcocystis neurona* strains infecting southern sea otters precludes distinction between marine and terrestrial isolates. *Veterinary parasitology*, 169 (1-2), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.020>
- Yan H, Yan H, Tao Y, Chen H, Li G, Gong W, Jiao H, Tian F, Ji M. (2012). Application and expression of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) and rhoptry protein 2 (ROP2) from recombinant *Escherichia coli* strain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 106:356–362.
- Zhang, H., Lee, Eg., Yu, L., Kawano, S., Huang, P., Liao, M., Kawase, O., Zhang, G., Zhou, J., Fujisaki, K., Nishikawa, Y., Xuan X. (2011). Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. *Parasitol Res* 109, 899–911. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2332-5>
- Zhang, T.E., Yin, L.T., Li, R.H., Wang, H.L., Meng, X.L., Yin, G.R. (2015). Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. *Parasit. Vectors* 8, 15. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0636-5>.
- Zhang, Y., Lai, B., Juhas, M., Zhang, Y. (2019). *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. *Microbiological Research*. 227: 126293.

Anexo 1: Determinación de las relaciones de las secuencias aminoacídicas de *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis* spp.

A través de la página electrónica del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se realizó una comparación de secuencias por alineamiento múltiple de aminoácidos por medio de la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de las proteínas de *Sarcocystis* obtenidas con la finalidad de encontrar y seleccionar las proteínas de *Toxoplasma gondii* más relacionadas con *Sarcocystis* tomando en cuenta aquellas con un porcentaje de identidad mayor al 20 % y valores E inferiores a e.10-5.

Resultados

De los antígenos superficiales del 1-6, solamente se analizó 1 representante por grupo mediante la herramienta bioinformática BLAST (**Tabla 9**). Obteniendo porcentajes de cobertura de entre el 70% y el 87%, mientras que los porcentajes de identidad se encuentran entre el 27% y el 34%.

Tabla 9. Comparación de secuencias aminoacídicas de *Sarcocystis* spp. y *Toxoplasma gondii* por medio de BLAST.

Proteína <i>Sarcocystis</i>	ID	Proteína <i>Toxoplasma</i>	Cobertura	E-value	% de identidad
Antígeno superficial 1 (276 aa)	ADG26774.1	Secuencia relacionada con SAG SRS28 (291 aa)	86%	8e-12	27.68%
Antígeno superficial 2 (168 aa)	AAO38736.1	Proteína hipotética TGRH88_046180 (189 aa)	70%	5e-11	34.96%
Antígeno superficial 3 (281 aa)	AAO38737.1	Secuencia relacionada con SAG SRS28 (291 aa)	85%	2e-12	29.10%
Antígeno superficial 4 (287 aa)	ADG26780.1	Proteína específica de esporozoíto SAG (291 aa)	86%	1e-10	24.81%
Antígeno superficial 5 (279 aa)	ABD47681.1	Secuencia relacionada con SAG SRS28 (291 aa)	87%	2e-13	28.00%
Antígeno superficial 6 (281 aa)	ADG26773.1	Secuencia relacionada con SAG SRS28 (291 aa)	86%	4e-14	28.04%

Anexo 2: Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas superficiales y de organelos secretorios de *Sarcocystis* spp.

Con la finalidad de conocer las propiedades fisicoquímicas de las proteínas del género *Sarcocystis* se utilizó la herramienta expasy protParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005). En dicha herramienta se introdujeron las secuencias primarias representativas de cada grupo proteico y se tomaron en consideración sólo los valores de peso molecular, punto isoelectrico, vida media en reticulocitos de mamífero, índice de inestabilidad e índice alifático.

Resultados

Los rangos de los valores considerados para este estudio fueron los siguientes: peso molecular 16-29 kDa, punto isoelectrico 6-7, vida media en reticulocitos de mamíferos 30 h, índice de inestabilidad 26-42 e índice alifático 82-92. Las características particulares de cada proteína se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas superficiales de *Sarcocystis* spp.

Proteína <i>Sarcocystis</i>	ID	Peso molecular(kDa)	Punto isoelectrico	Vida media (reticulocitos de mamíferos)	Índice de inestabilidad	Índice alifático
Antígeno superficial 1 (276 aa)	ADG26774.1	28.350	7.48	30 h	34.44	85.36
Antígeno superficial 2 (168 aa)	AAO38736.1	16.810	6.85	30 h	31.30	83.75
Antígeno superficial 3 (281 aa)	AAO38737.1	28.480	6.55	30 h	26.55	87.54
Antígeno superficial 4 (287 aa)	ADG26780.1	29.746	6.56	30 h	42.51	92.13
Antígeno superficial 5 (279 aa)	ABD47681.1	28.533	6.12	30 h	41.02	82.01
Antígeno superficial 6 (281 aa)	ADG26773.1	28.814	6.79	30 h	32.74	87.97

Referencia

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker, A., Duvaud S., Wilkins M., Appel R., Bairoch A.,(2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker J.M. (eds) The Proteomics Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

Anexo 3: Predicción de las estructuras secundarias de las proteínas de *Sarcocystis spp* a través del servidor web SOPMA

La predicción de estructuras secundarias se llevó a cabo por la herramienta de investigación en línea SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) (Deléage, 2017). Ingresando las secuencias primarias de las proteínas y tomando los parámetros que la página arroja predeterminadamente.

Resultados

La predicción tanto de las estructuras secundarias como las terciarias de las proteínas es importante, debido a que pueden determinar algún efecto significativo en su función biológica.

Los resultados de este análisis se muestran en la **Tabla 11**, en donde el antígeno de micronema 10 fue la proteína que obtuvo la mayor predicción de alpha hélices con un 61.96% de su secuencia primaria, mientras que el antígeno con un mejor porcentaje de beta láminas fue el antígeno superficial 4 con el 33.10%. Por último, los mejores porcentajes se presentaron para las estructuras azarosas en la mayoría de las proteínas, por lo que no se descartaría que estos sitios tuvieran alguna función biológica significativa.

Tabla 11. Predicción de las estructuras secundarias de las proteínas de *Sarcocystis spp* a través de SOPMA.

<i>Proteína Sarcocystis</i>	<i>ID</i>	<i>Alpha hélice (%)</i>	<i>Beta lámina (%)</i>	<i>Giro beta (%)</i>	<i>Estructura azarosa (%)</i>
<i>Antígeno superficial 1 (276 aa)</i>	<i>ADG26774.1</i>	<i>20.65</i>	<i>25.00</i>	<i>1.81</i>	<i>52.54</i>
<i>Antígeno superficial 2 (168 aa)</i>	<i>AAO38736.1</i>	<i>23.81</i>	<i>26.79</i>	<i>5.36</i>	<i>44.05</i>
<i>Antígeno superficial 3 (281 aa)</i>	<i>AAO38737.1</i>	<i>15.30</i>	<i>31.67</i>	<i>3.56</i>	<i>49.47</i>
<i>Antígeno superficial 4 (287 aa)</i>	<i>ADG26780.1</i>	<i>15.68</i>	<i>33.10</i>	<i>4.18</i>	<i>47.04</i>
<i>Antígeno superficial 5 (279 aa)</i>	<i>ABD47681.1</i>	<i>18.28</i>	<i>26.16</i>	<i>4.66</i>	<i>50.90</i>
<i>Antígeno superficial 6 (281 aa)</i>	<i>ADG26773.1</i>	<i>17.79</i>	<i>25.62</i>	<i>4.27</i>	<i>52.31</i>

Referencia

Deléage G. (2017). ALIGNSEC: viewing protein secondary structure predictions within large multiple sequence alignments. *Bioinformatics*. 33:3991–3992.

Anexo 4: Validación de las proteínas modeladas

La validación de las estructuras obtenidas se llevó a cabo por medio de la herramienta QMEAN (Qualitative Model Energy ANalysis) (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) (Benkert et al., 2011). QMEAN es un método de estimación de calidad que describe los principales aspectos geométricos de las estructuras proteicas. Se basa en la puntuación de la estructura ya sea de manera global (todo el modelo) o local (por residuo).

Para generar dicha puntuación, se emplean potenciales estadísticos de fuerza media y la consistencia de un modelo con características estructurales de predicciones basadas en secuencias. Dentro de los parámetros establecidos para generar la puntuación se toman en cuenta el potencial de interacción de los átomos, el potencial de solvatación de todos los átomos, solubilidad de la proteína y ángulos de torsión. El valor obtenido se transforma en una puntuación Z para relacionarlo con lo que se esperaría de las estructuras de rayos X de alta resolución.

Asimismo, todos los modelos tridimensionales fueron validados por PROCHECK el cual es un programa que comprueba la calidad estereoquímica de una estructura proteica, produciendo una serie de gráficos PostScript que analizan su geometría general y residuo por residuo. Esto a través del servidor en línea de la Universidad de California (UCLA) SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu>).

Resultados

Se ingresaron 12 modelos tridimensionales (6 por tipo de modelado) de los antígenos superficiales de *S. neurona* SAG 1-6. Siendo los modelados por homología los que cuentan con un puntaje de z más cercano al ideal (0) como se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Validación de las proteínas modeladas a través de QMEAN de los antígenos superficiales SAG 1-6 de *Sarcocystis neurona*.

Proteína	Tipo de modelado	Puntaje de Z	Calidad
SAG 1	Homología	-1.81	Aceptable
SAG 2		-3.48	Moderado
SAG 3		-2.77	Aceptable
SAG 4		-1.42	Aceptable
SAG 5		-3.74	Moderado
SAG 6		-4.33	Baja
SAG 1	AlphaFold2	-8.10	Baja
SAG 2		-12.93	Baja
SAG 3		-6.66	Baja

SAG 4		-6.42	Baja
SAG 5		-8.96	Baja
SAG 6		-8.71	Baja

Al igual que el punto anterior, todos los modelos generados se ingresaron en el servidor y se solicitó que se realizara el análisis con el programa PROCHECK. Los modelos obtenidos por homología siguen contando con mejores porcentajes de aceptación (85-88%) en comparación con los de AlphaFold2 (50-75 %) como se muestran en las **Figuras 22 y 23**.

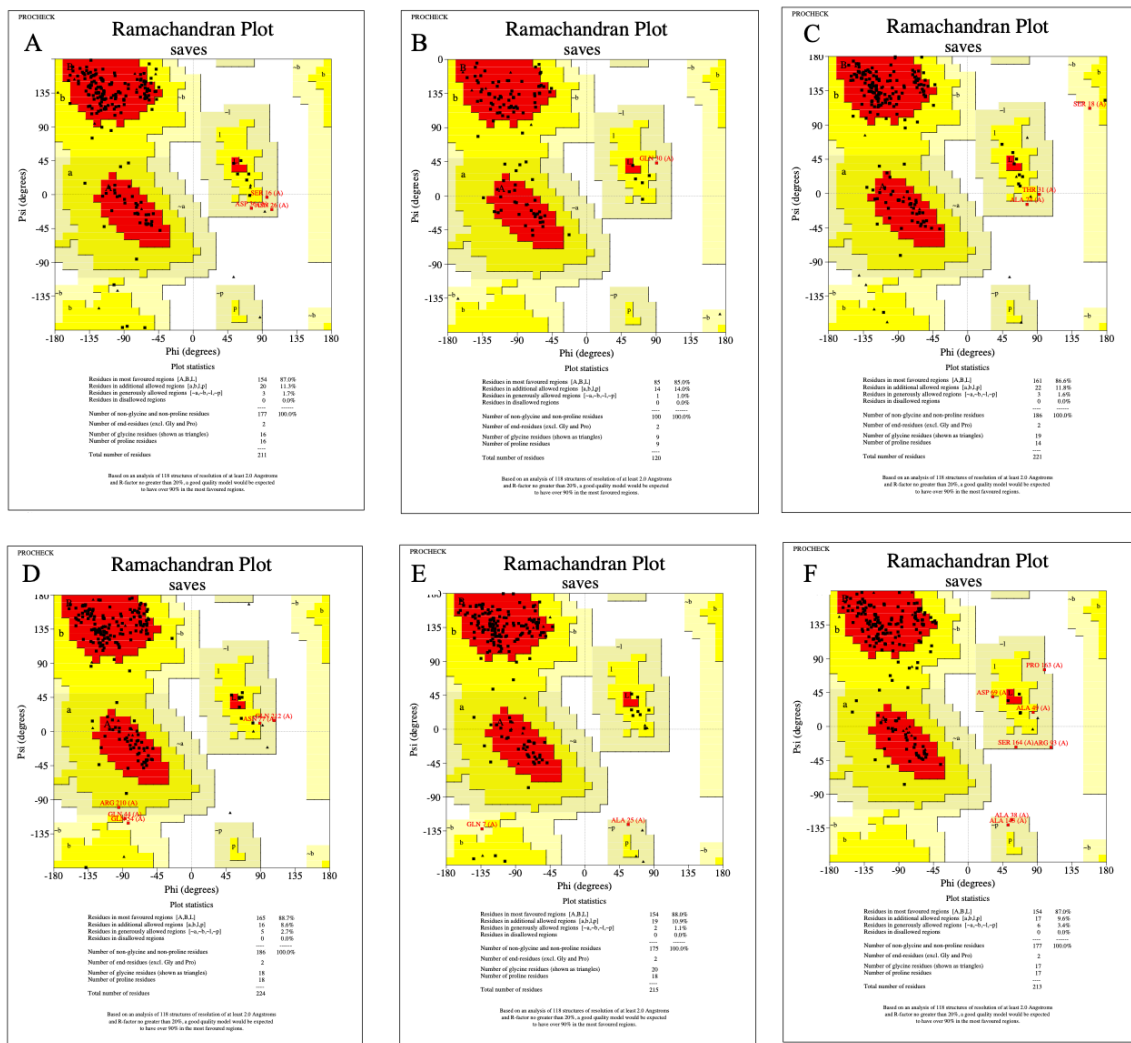


Figura 22. Validación de las proteínas modeladas por homología a través de PROCHECK de los antígenos superficiales SAG 1-6 de *Sarcocystis neurona*.

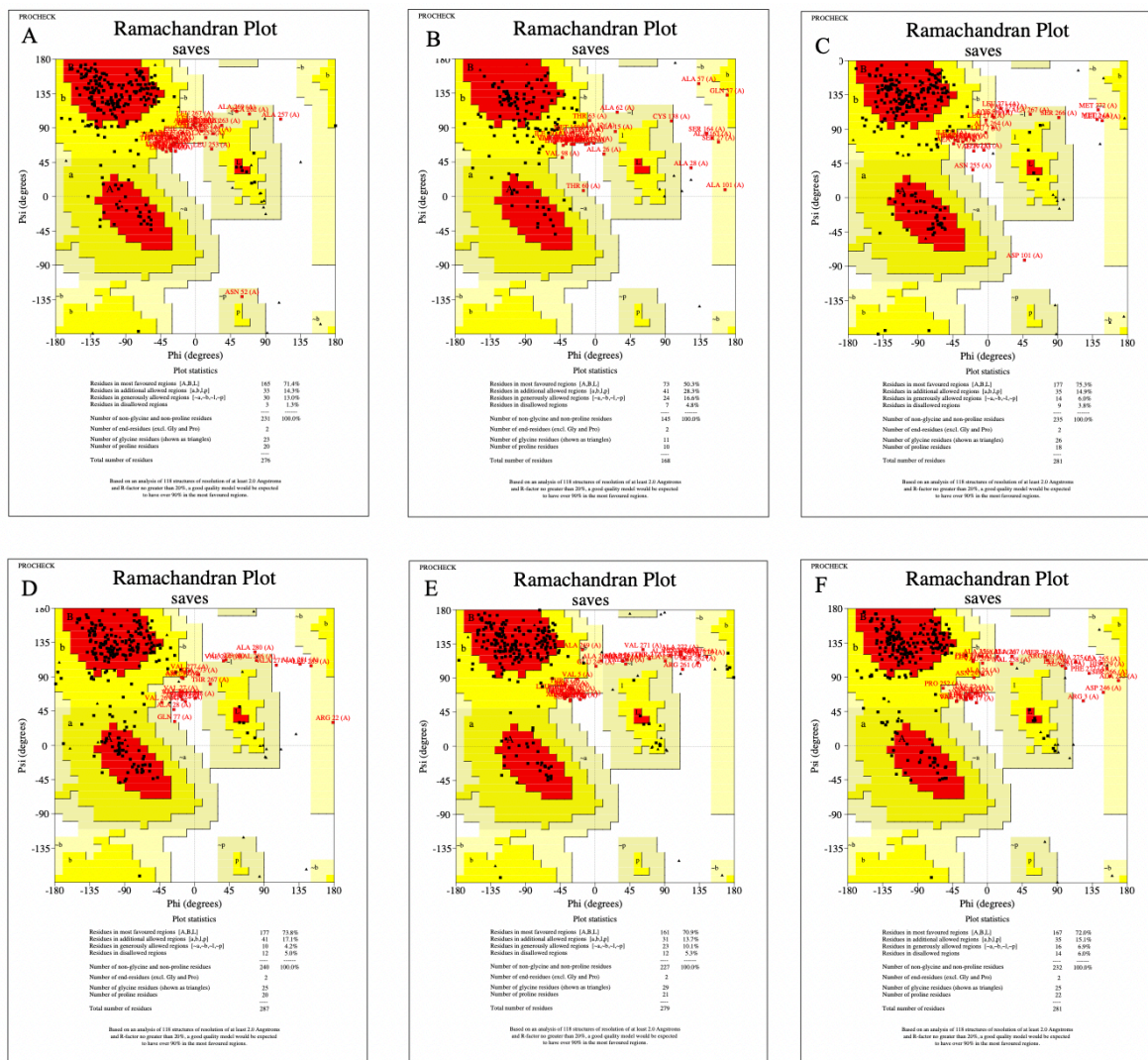


Figura 23. Validación de las proteínas modeladas por AlphaFold2 a través de PROCHECK de los antígenos superficiales SAG 1-6 de *Sarcocystis neurona*.

Referencia

Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343-350 .

Anexo 5: Docking molecular proteína-proteína con otro tipo de interacciones entre las moléculas interactuantes

Con el fin de complementar la información de las reacciones antígeno-anticuerpo, se realizaron imágenes que muestran otro tipo de interacciones importantes para las moléculas interactuantes como lo son las cargas interpoladas e hidrofobicidad.

Resultados

En total, se generaron 4 figuras (Fig. 24-27) que representan las interacciones antes mencionadas por los dos métodos de modelado realizados en este proyecto.

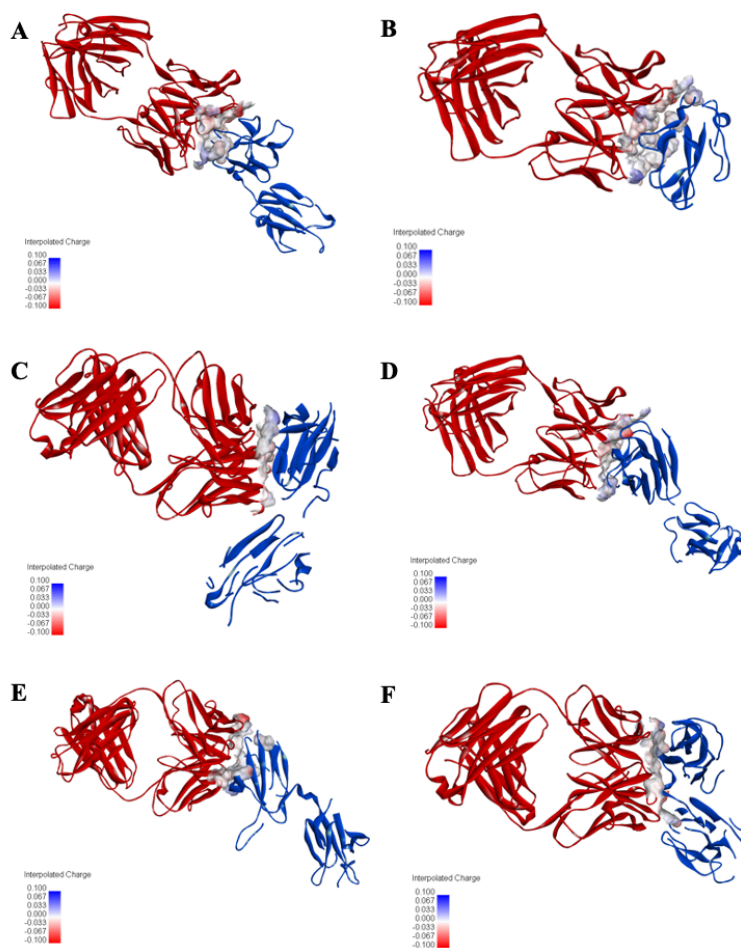


Figura 24. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona* a través del servidor web ClusPro modelados por homología (cargas interpoladas) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012). Se muestran las cargas interpoladas entre las moléculas interactuantes. A) Interacción Fab-SAG1. B) Interacción Fab-SAG2. C) Interacción Fab-SAG3. D) Interacción Fab-SAG4. E) Interacción Fab-SAG5. F) Interacción Fab-SAG6. Fragmento de unión a antígeno (Fab)(rojo); Antígenos superficiales modelados por homología (azul).

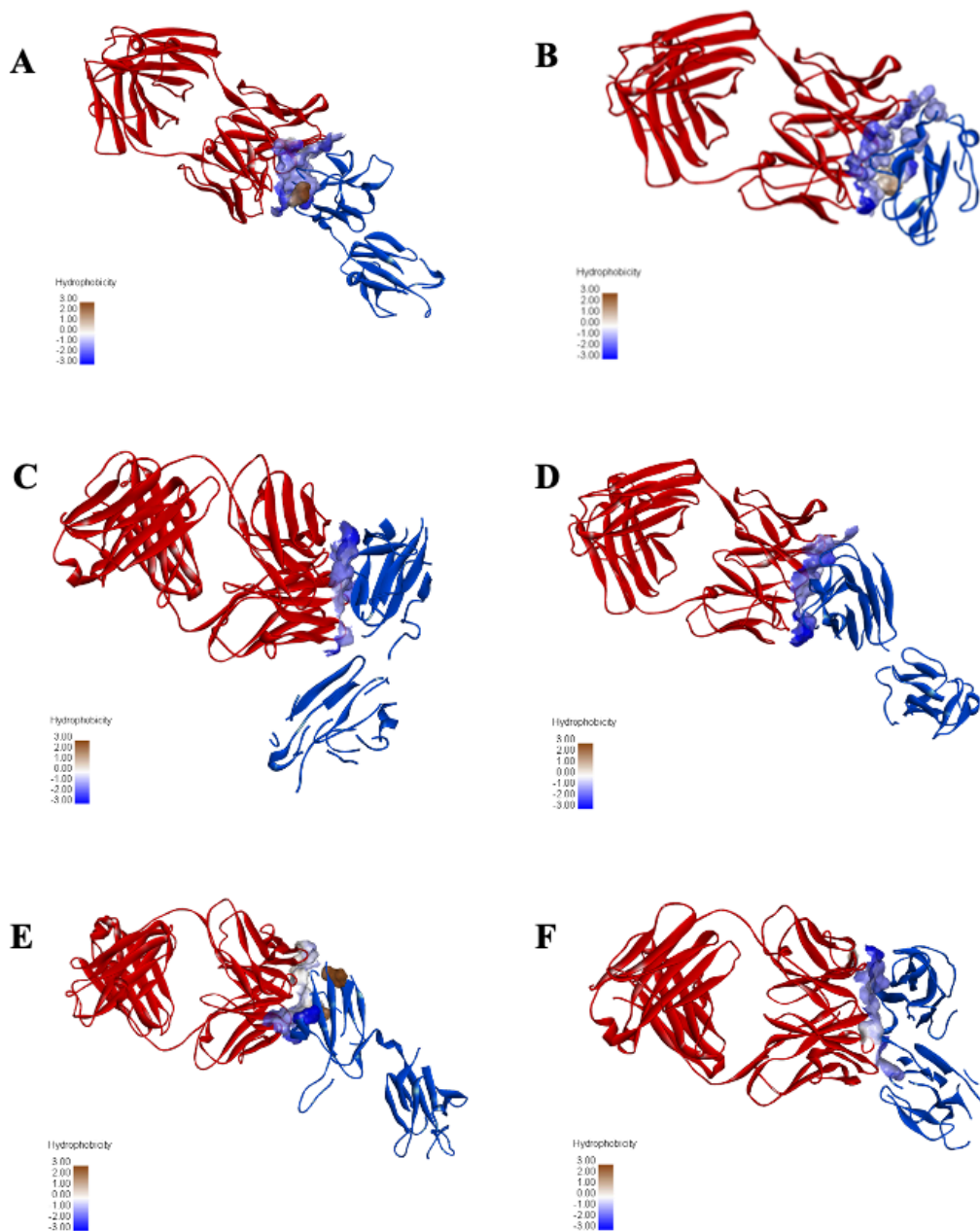


Figura 25. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona* a través del servidor web ClusPro modelados por homología (hidrofobicidad) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012). Se muestran la hidrofobicidad entre las moléculas interactuantes. A) Interacción Fab-SAG1. B) Interacción Fab-SAG2. C) Interacción Fab-SAG3. D) Interacción Fab-SAG4. E) Interacción Fab-SAG5. F) Interacción Fab-SAG6. Fragmento de unión a antígeno (Fab)(rojo); Antígenos superficiales modelados por homología (azul).

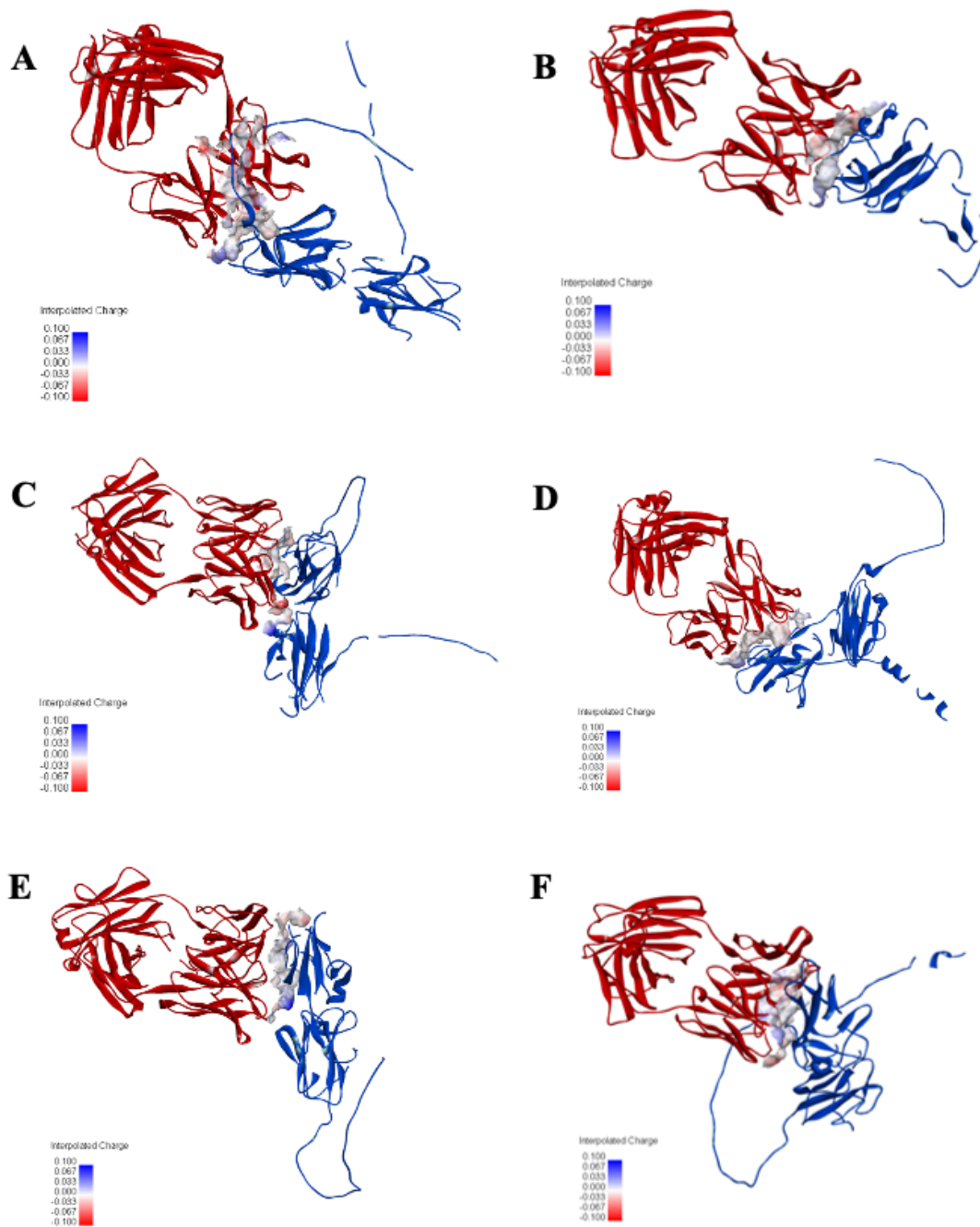


Figura 26. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona* a través del servidor web ClusPro modelados por AlphaFold 2 (cargas interpoladas) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012). Se muestran las cargas interpoladas entre las moléculas interactuantes. A) Interacción Fab-SAG1. B) Interacción Fab-SAG2. C) Interacción Fab-SAG3. D) Interacción Fab-SAG4. E) Interacción Fab-SAG5. F) Interacción Fab-SAG6. Fragmento de unión a antígeno (Fab)(rojo); Antígenos superficiales modelados por AlphaFold2 (azul).

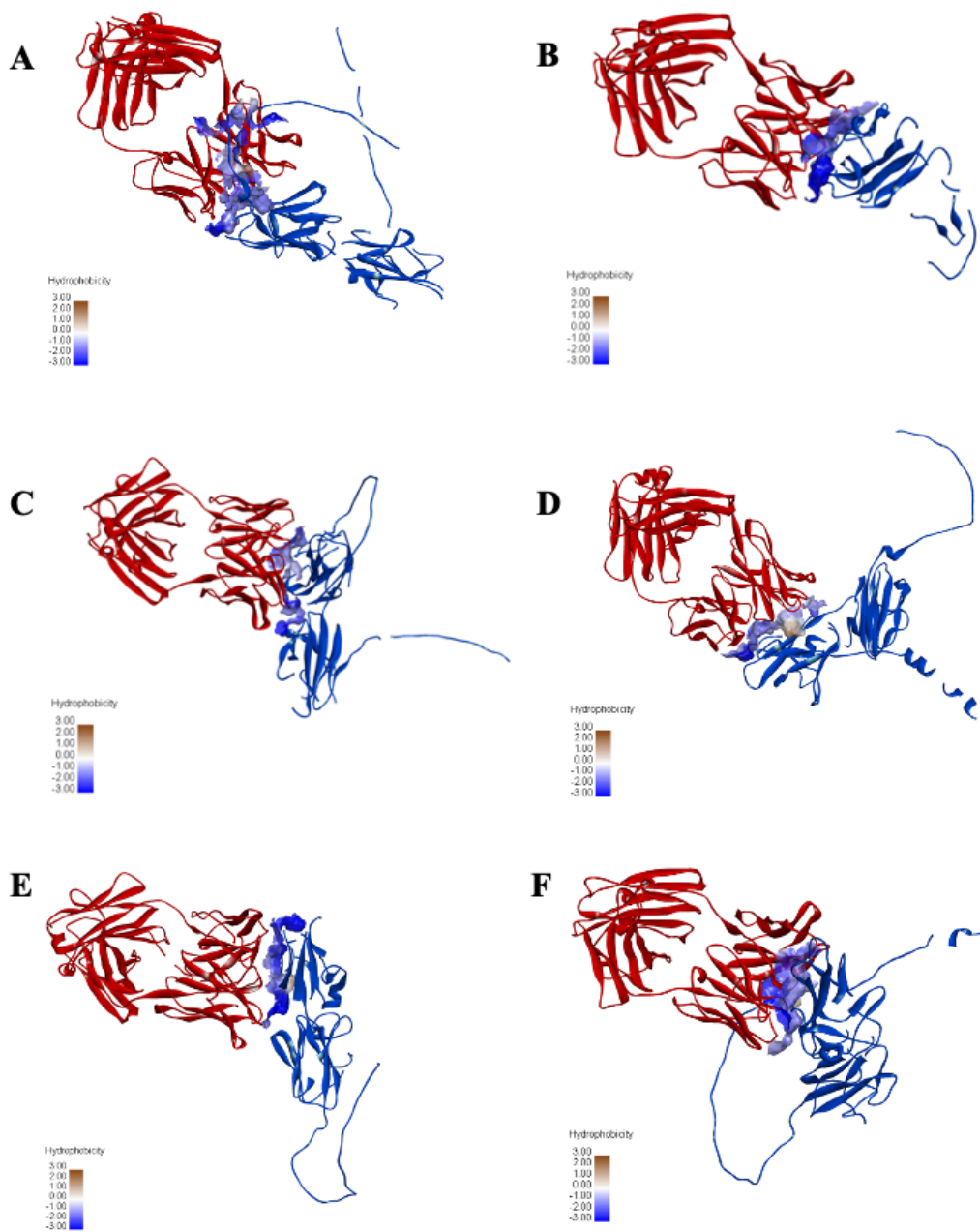


Figura 27. Docking molecular proteína-proteína de los antígenos superficiales 1-6 (SAG1-6) de *Sarcocystis neurona* a través del servidor web ClusPro modelados por AlphaFold2 (hidrofobicidad) (Desta et al., 2020; Vajda et al., 2017; Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Brenke et al., 2012). Se muestran la hidrofobicidad entre las moléculas interactuantes. A) Interacción Fab-SAG1. B) Interacción Fab-SAG2. C) Interacción Fab-SAG3. D) Interacción Fab-SAG4. E) Interacción Fab-SAG5. F) Interacción Fab-SAG6. Fragmento de unión a antígeno (Fab)(rojo); Antígenos superficiales modelados por AlphaFold2 (azul).