



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CINÉTICA DE INVASIÓN DE LAS CEPAS RH Y ME49
DE *Toxoplasma gondii* EN CÉLULAS ENDOTELIALES
HUMANAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MONTSERRAT CALZADA RUIZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ABEL GUTIERREZ RAMOS**

VOCAL: **Profesor: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ**

SECRETARIO: **Profesor: IRMA CAÑEDO SOLARES**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: JOSE CORDERO HERNANDEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

SECRETARIA DE SALUD

ASESOR DEL TEMA:

M . en C. IRMA CAÑEDO SOLARES

SUPERVISOR TÉCNICO:

MA. DOLORES CORREA BELTRÁN

SUSTENTANTE:

MONTSERRAT CALZADA RUIZ

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la M. en C. Irma Cañedo Solares, en el Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental. 2º Piso, de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Av. Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, México D.F, C.P. 04530.

Esta tesis fue parcialmente financiada por CONACYT; incluyendo una beca para la alumna.

Proyecto 139721-CONACYT-FOSISS: "Toxoplasmosis congénita. Relación de los polimorfismos de genes del parásito y de la respuesta inmune de la madre y del hijo con la expresión, la actividad biológica, la transmisión vertical y la patología fetal"

DEDICATORIAS

A toda mi hermosa familia, que siempre ha estado conmigo apoyándome en todas las decisiones que he tomado a lo largo del camino; especialmente a mi mamá por amarme sin condiciones ni limitaciones, por que nunca se cansó, nunca dejó de sonreír ni de brindarme la más dulce caricia en los mejores ni peores momentos. A mi papá que con todo el esfuerzo del día a día me enseñó que solo así se logran las cosas, esforzándose por ellas.

A mis queridos Nino y Nina, que sin ser mis padres me han brindado el mas grande cariño, la confianza y un apoyo incondicional, sin ustedes no sería la persona que soy ahora.

A Delhito, por ser más que mi prima, siempre has sido mi apoyo, mi ánimo, mi consuelo, mi cómplice y recuerda que al final de los tiempos, tu y yo siempre juntas.

A mi equipo, Roberto y Emilio, por las sonrisas y las travesuras compartidas, sin duda el mundo es mejor desde que ustedes aparecieron en mi vida.

A Uvi y Lipe, por cuidarme y enseñarme tanto y desde siempre, siendo el ejemplo de fortaleza viviente y a él por cuidarme desde tan lejos y sentirlo tan cerca por vivir en mi corazón.

A Jorge, por ser el ejemplo mas fiel y cercano de un hermano mayor, por todos los momentos gratos, por cuidarme y divertirme conmigo, la más pequeña de la casa, por no dejarme jugar sola.

A la familia que yo elegí, Tona, Mabelito, Wera, Jimenito, Jorge, Leo, Karis, Víc, Gabito, Sanders, por que sin ustedes la facultad no hubiera sido tan divertida y formativa.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química, por permitirme crecer y alcanzar el sueño más grande de mi vida.

A mi familia, por quererme, apoyarme, aceptarme y confiar en mi, sin límite de tiempo...

A Irma Cañedo Solares, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por el apoyo y la transferencia de conocimientos con la mejor disposición.

A la Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza y afecto, por ser una gran guía en el desarrollo de este trabajo.

A Belinda Ortiz, por ser parte tan esencial en mi desarrollo académico y personal, por trabajar hombro a hombro conmigo para conseguir mi tan anhelado sueño, por convencerme las veces necesarias de que con paciencia, las cosas saldrían mejor.

A todos los miembros del LIE, por que sin tan coordinado trabajo en equipo, hubiera sido imposible que lograra algo, por la disposición, atención y cariño con el que me abrieron las puertas no solo de tan agradable lugar de trabajo.

A mis amigos del LIE; Sandra, Heri, Liz, Carlos, Anita, Clau, Ale, Luis, por la amistad, las sonrisas, las pláticas formativas y las horas de esparcimiento que hicieron la estancia y el camino a la meta, el más agradable.

A la Dra. Conchita Agundis, que ha sido un apoyo incondicional desde el día en que me cruce en su camino, por creer en mi y siempre preocuparse por mi bienestar.

A la médica Guadalupe Santiago Ramos, por la ayuda en la obtención de las muestras.

A todas las personas involucradas en mi formación, sin duda soy una mejor profesionalista por todos los consejos y orientación que me han brindado.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
GENERALIDADES	3
CICLO DE VIDA	4
RESPUESTA INMUNE	6
TRANSMISIÓN	8
INVASIÓN CELULAR	11
EL ENDOTELIO VASCULAR	15
DESARROLLO DE LA PLACENTA	17
TRANSMISIÓN VERTICAL DE INMUNIDAD	19
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVO	21
METODOLOGÍA	22
Tipo de estudio	22
Estrategia general del estudio	22
Métodos de laboratorio	22
Cultivos celulares	22
Procedimiento para el aislamiento y cultivo primario de HUVECs	22
Cultivo de la línea celular semi-inmortal de endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1)	24
Ensayos de invasión de células endoteliales con taquizoitos de dos cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
Obtención de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
Cinética de invasión de <i>Toxoplasma gondii</i> en HUVECs y HMEC-1	26
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	42

CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48
APÉNDICE DE SOLUCIONES	55

RESUMEN

La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial causada por *Toxoplasma gondii*, un parásito protozoario intracelular obligado. Actualmente la estructura poblacional de este parásito está clasificada en 14 haplogrupos, con base en sus marcadores genéticos, en su mayoría relacionados con funciones de adhesión, invasión o replicación, siendo los haplogrupos 1, 2 y 3 (definidos previamente como linajes I, II y III, respectivamente), los más estudiados. *Toxoplasma gondii* es capaz de infectar prácticamente a todas las células nucleadas de vertebrados homeotermos, incluido el ser humano, en quienes puede causar enfermedades oportunistas, como la encefalitis toxoplásmica en pacientes con SIDA o niños infectados congénitamente. Reportes en la literatura indican que las cepas más relacionadas con la toxoplasmosis congénita son las tipo II, seguidas de las tipo I, en América del Norte y Europa. La incidencia y la severidad de la infección, así como el desarrollo de signos clínicos en el bebé está fuertemente relacionado con el tiempo en que ocurre la seroconversión de la madre. La transmisión congénita ocurre cuando una mujer se infecta con *T. gondii* por primera vez durante el embarazo, ya que el parásito tiene la capacidad de atravesar la placenta e infectar al embrión en desarrollo. Durante la gestación, las necesidades de irrigación sanguínea de la placenta aumentan con respecto al tiempo, mientras que, por otro lado, el parásito puede infectar leucocitos para diseminarse rápidamente a otros tejidos, además, tiene la capacidad de atravesar barreras biológicas; de ésta manera los taquizoitos pueden ser conducidos por la sangre materna hacia la placenta, atravesar el sinciotrofoblasto y el estroma hasta llegar al endotelio vascular, el cual deben también atravesar para llegar al torrente circulatorio fetal y posteriormente diseminarse hacia los diversos tejidos. Por lo anterior, las células endoteliales podrían ser una vía de transmisión vertical de *T. gondii*.

Existen escasos reportes enfocados en cinéticas de invasión, en diferentes tipos celulares y los modelos empleados son heterogéneos. En el presente trabajo se

emplearon dos tipos de células endoteliales humanas: cultivos primarios de vena de cordón umbilical (HUVECs) y una línea semi-inmortal de microvasculatura (HMEC-1) en los cuales se estandarizaron cinéticas de invasión de dos cepas de taquizoitos de *T. gondii* con diferentes características de virulencia, la cepa RH (tipo I) de alta virulencia y la ME49 (tipo II) de baja virulencia. El objetivo de este trabajo fue comparar la cinética de invasión de taquizoitos de la cepa RH y ME49 de *T. gondii*, en células endoteliales humanas de cultivos primarios y de una línea celular. Los taquizoitos de ambas cepas se adicionaron a los cultivos celulares en una proporción 10:1 (parásito:célula) y se incubaron durante diferentes tiempos (desde 30 min hasta 4 horas) bajo diferentes condiciones, posteriormente se fijaron y se tiñeron para llevar a cabo la evaluación de las monocapas celulares; la infección fue identificada con la presencia de al menos una vacuola parasitófora en el citoplasma de la célula y se expresó como porcentaje; además, se cuantificó el número de vacuolas por cada célula infectada considerando ahora el número de células infectadas como el 100%.

El porcentaje de células infectadas con ambas cepas aumentó con el tiempo; sin embargo, la cepa ME49 presentó porcentajes mas altos en ambos tipos celulares, además de que los taquizoitos de esta cepa infectaron más rápido a las células. En el caso de la cepa RH, la invasión fue progresiva con respecto al tiempo. La cantidad de vacuolas parasitóforas encontradas por célula invadida en ambos tipos de células endoteliales aumenta con respecto al tiempo, con la característica de que en todos los tiempos hay mayor numero de células infectadas con una sola vacuola; además, las células infectadas con la cepa ME49 presentan mayor cantidad de vacuolas por célula en ambos tipos celulares. Con respecto a los diferentes tipos celulares, las HMEC-1 presentan porcentajes de invasión mas altos que los cultivos primarios de HUVECs.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado que pertenece al Phylum Apicomplexa, término que hace referencia al complejo apical de su citoesqueleto, el cual está constituido por un conoide y algunos organelos secretorios, como los micronemas, las roptrias y los gránulos densos. Es capaz de infectar prácticamente a todas las células nucleadas de vertebrados homeotermos, incluido el ser humano, en quienes puede causar enfermedades oportunistas, como la encefalitis toxoplásmica en pacientes con SIDA. (Morisaki, et al 1995; Carruthers, 1999; Montoya y Liesenfeld, 2004; Laliberté y Carruthers, 2008).

La infección por *T. gondii* está ampliamente distribuida en humanos y la seroprevalencia varía dependiendo la zona geográfica y se incrementa con la edad; siendo más frecuente en regiones de clima cálido-húmedo (Dubey, 2004; Montoya y Liesenfeld, 2004). En cuanto a infección en mujeres embarazadas, los datos más altos de seroprevalencia se han encontrado en América del Sur, África Central, Austria y Francia. En México, existen pocos estudios epidemiológicos en población general en los que se reporta seropositividad que va desde 11 hasta 30%. En un estudio con muestras de las Encuestas Nacionales Seroepidemiológicas de Salud del 2000 y 2006, encontramos que la prevalencia es de 30 a más de 80% (Velasco-Castrejón et al, 1992; Cook et al, 2000; Alvarado-Esquivel et al, 2011; Uribe-Salas et al, en preparación).

Hasta hace unos años los aislamientos de *T. gondii* derivados en su mayoría de Europa y Estados Unidos, eran considerados clonas con discreta diversidad genética ($\leq 1\%$). Los aislados se agruparon en uno de los tres tipos genéticos o linajes principales (I, II y III), con base en electroforesis de isoenzimas, el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y la tipificación de microsatélites; sin embargo estudios recientes, usando nuevos marcadores para la

caracterización de genotipos de diferentes partes del mundo, han revelado una mayor variabilidad genética (Ajzenberg et al, 2002; Ajzenberg et al, 2004; Cedillo-Pelaez, 2009; Dardé, 2004; Saeij et al, 2005; Switaj et al, 2005; Su et al, 2006). A partir de todos estos aislados recientemente se ha hecho una clasificación de *T. gondii* en 14 haplogrupos con base en sus marcadores genéticos, en su mayoría relacionados con funciones de adhesión, invasión o replicación, esto es, con virulencia. Los haplogrupos 1, 2 y 3 (definidos previamente como linajes I, II y III respectivamente), además del 12, correspondieron exclusivamente a aislamientos de Norteamérica y Europa, mientras que los grupos 4, 5 y 8 a 10 se encuentran distribuidos principalmente en Sudamérica; el grupo 6 se presentó en Europa y Sudamérica; el grupo 7 quedó cercano a los grupos de Norteamérica mientras que el haplogrupo 11, corresponde a un aislamiento en Canadá. Recientemente dos aislamientos en China y África, han sido clasificados como haplogrupos 13 y 14 respectivamente (Sibley et al, 2009; Khan et al, 2011).

Los aislamientos del parásito son determinados como virulentos o no virulentos, con base en el resultado de su replicación en ratones, y aunque la virulencia depende básicamente de la cepa del parásito el genotipo del huésped también tiene una clara influencia en la patología de la diseminación, ya que algunas cepas de ratones son más susceptibles a la infección que otras. (Appleford y Smith, 1997; Boothroyd y Grigg, 2002; Dardé, 2004, Saeij et al, 2005)

Ciclo de vida

En el ciclo existen tres estadios infecciosos para todos sus huéspedes: los taquizoitos, los cuales corresponden a la forma de replicación rápida, dentro de cualquier célula de los huéspedes intermediarios y en células no epiteliales del intestino del huésped definitivo, tienen un tamaño de 2 x 6 µm con forma de media luna; los bradizoitos, que son formas de replicación lenta y están contenidos en un quiste tisular, crecen y se mantienen intracelulares; el tamaño de los quistes puede variar de 70 a 100 µm, dependiendo la cantidad de bradizoitos en su

interior. Ambos estadios se dividen por endodiogenia, proceso de reproducción sexual donde se producen dos células hijas dentro de la célula madre. Y los esporozoitos, que están confinados dentro de ooquistes que son eliminados en las heces de los huéspedes definitivos y su estructura les confiere gran resistencia a las condiciones ambientales (Dubey, 1998; Ferguson, 2004; Dubey, 2004; Hill et al, 2005; Correa et al, 2006; Dubey, 2010).

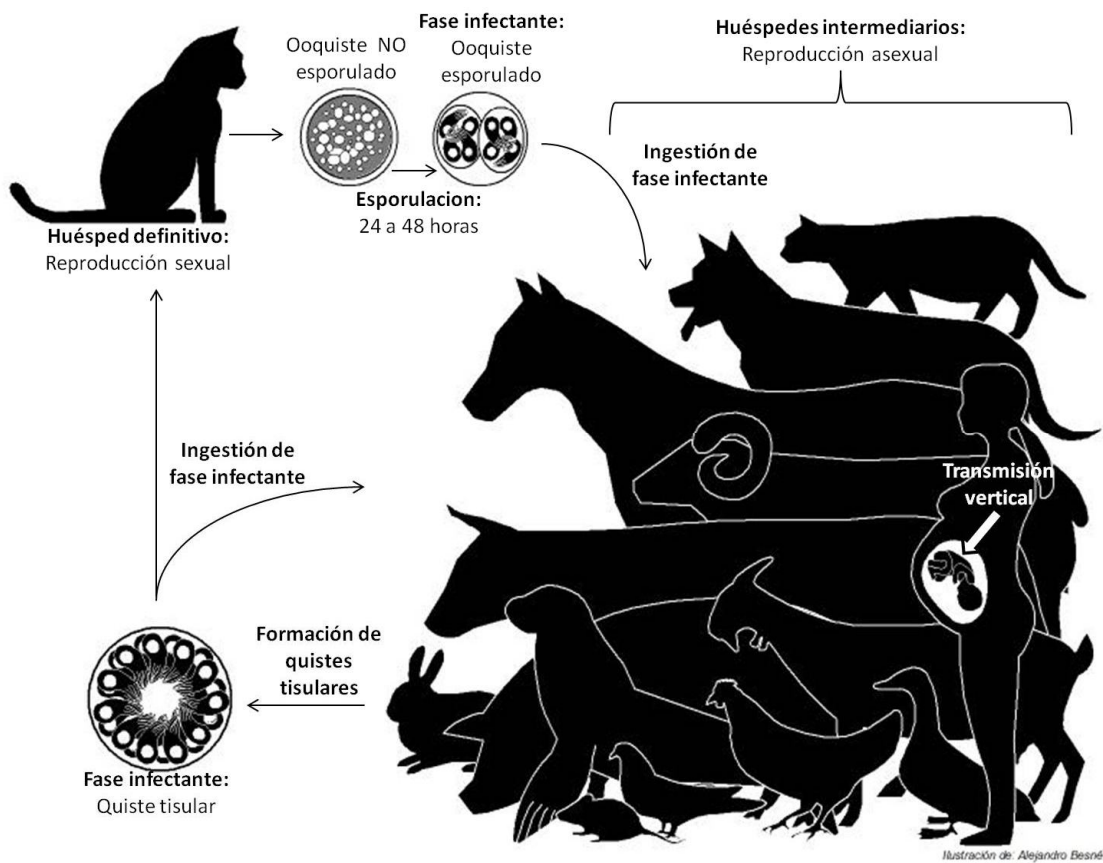


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii* (tomado de Besné-Mérida, 2010)

El ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* consta de dos fases: la reproducción sexual, que se lleva a cabo únicamente en las células epiteliales del intestino de los huéspedes definitivos, que son los felinos y la reproducción asexual que se desarrolla en los huéspedes intermediarios, que corresponden a cualquier animal homeotermo, en los cuales el parásito puede transmitirse por el ciclo fecal-oral, paso transplacentario y por canibalismo (figura 1) (Dubey, 1998; Dubey, 2004;

Tenter et al, 2000; Ajzenberg et al, 2005; Hill et al, 2005;).

La fase de reproducción sexual comienza cuando el huésped definitivo ingiere tejidos con quistes tisulares del parásito, los cuales al llegar al intestino delgado son digeridos por enzimas proteolíticas y se liberan bradizoitos a la luz de éste, e invaden los enterocitos del intestino delgado; para que se lleve a cabo la gametogénesis, en la cual se originan los ooquistes. Los ooquistes esporulan en condiciones de aireación, temperatura y humedad adecuados y se vuelven infecciosos (Dubey et al, 1998; Tenter et al, 2000; Dubey, 2002; Hill *et al*, 2005). Posteriormente cuando algún huésped intermediario ingiere ooquistes esporulados o cualquier otro estadio infeccioso del parásito, se desarrolla en éste la fase de reproducción asexual; así los estadios infecciosos se diferencian a taquizoitos, que pueden diseminarse rápidamente a todos los órganos y tejidos, ya que pueden infectar cualquier célula nucleada y además poseen la habilidad para sobrevivir dentro de macrófagos y células dendríticas. Bajo la presión de la respuesta inmune del huésped pueden transformarse a bradizoitos, para formar quistes tisulares que predominan en el sistema nervioso central, ojo, músculo cardiaco y esquelético; los cuales pueden ser ingeridos por otros huéspedes intermediarios o definitivos, para continuar el ciclo (Dubey, 1998; Montoya y Liesenfeld, 2004; Tenter *et al*, 2000; Hill *et al*, 2005; Black y Boothroyd, 2000; Miller et al, 2009).

Respuesta inmune

La infección por *T. gondii* logra activar células de la respuesta inmune innata así como de la adaptativa. En el inicio de la infección, la primera respuesta que actúa es la innata mediada por neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NKs), a través de fagocitosis y citotoxicidad celular. Una de las características de la respuesta desencadenada contra el parásito es la producción de altos niveles de citocinas tipo Th1, debido al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), a través de receptores como son los tipo Toll (TLRs). Las citocinas producidas principalmente son el IFN- γ por las NKs, la IL-12

por las células dendríticas (CDs) y macrófagos activados, éstos últimos además producen TNF- α que induce a apoptosis de las células infectadas; así el IFN- γ , IL-12 y TNF- α son las citocinas principales en la resistencia contra la replicación del parásito (Correa et al, 2007; Miller et al, 2009; Muñoz et al, 2011). Además se ha reportado que la producción continua de IFN- γ juega un papel importante en la conversión de taquizoito a bradizoito en la fase aguda, además de suprimir la conversión de bradizoito a taquizoito durante la infección crónica (Miller et al, 2009).

Por otro lado, las CDs y los macrófagos presentan antígenos a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ los cuales producen IL-12, induciendo también un fenotipo Th1. El IFN- γ activa a las células efectoras incrementando la fagocitosis, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) por NKs y la citotoxicidad por linfocitos T CD8⁺ (Denkers y Gazzinelli, 1998). Aunque las reacciones pro-inflamatorias son necesarias, una respuesta tipo Th1 exacerbada conduce a la patología e incluso podría matar al huésped, por lo que es necesario modular la respuesta; ésta modulación se lleva a cabo por citocinas T reguladoras, principalmente la IL-10 y el TGF- β . Si la infección inicia en un microambiente Th2, con IL-4, IL-10, IL-13, IL-5 e IL-6, se inhibe la producción de IFN- γ , y por ende, los mecanismos efectoras, permitiendo la proliferación parasitaria sin control. (Neyer et al, 1997; Correa, 2007; Lang et al, 2007; Miller et al, 2009; Muñoz et al, 2011)

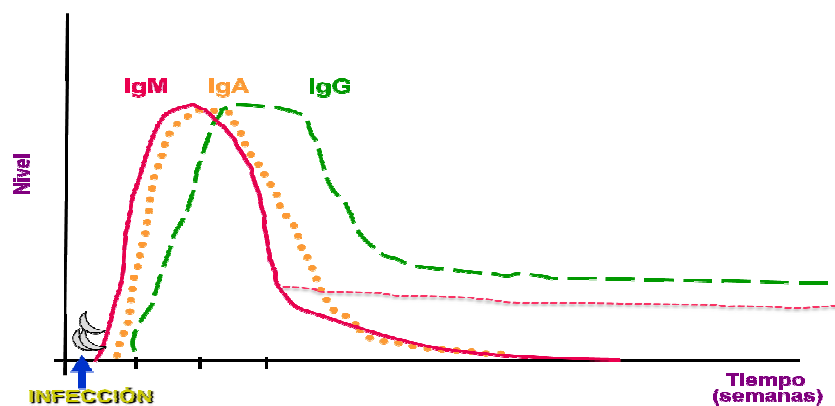


Figura 2. Diagrama de aparición de las diferentes clases de inmunoglobulinas tras la infección por *T. gondii* (modificado de Huskinson et al, 1989; Correa et al, 2007)

La respuesta de las células B, es esencial para el control de la infección de *T. gondii* (figura 2). Los anticuerpos de clase IgM aparecen de 3 a 10 días después de la infección y en general desaparecen; aunque, se ha visto que pueden permanecer por varios años. En seguida, se presentan los anticuerpos de clase IgA, los cuales tienen un papel protector, principalmente a nivel de mucosas, inhibiendo la invasión celular por el parásito. Finalmente, se presentan todas las subclases de IgG, predominantemente los de la subclase IgG1, los cuales pueden proteger al huésped de re-infecciones. La respuesta humoral es polarizada por las interleucinas presentes: la IgG1 y la IgG3 son estimuladas por IFN- γ y promueven protección, pues son activadores de la vía clásica del complemento e inducen inflamación, se unen a macrófagos y a neutrófilos a través de receptores Fc- γ y opsonizan a los parásitos para la fagocitosis. Las NKs, activadas por IFN- γ , despliegan Fc- γ RIII (CD16), el cual une a estas subclases y media ADCC matando a los taquizoitos. La IgG2 es inducida por IL-2 e IL-6. La IgE y la IgG4 son estimuladas por IL-4 e IL-13, relacionándose la primera con mal pronóstico en individuos con infección congénita o adquirida (Huskinson et al, 1989; Roberts et al, 1996; Kasper et al, 2004; Correa et al, 2007; Matowicka-Karna et al, 2009).

Transmisión

La transmisión de *Toxoplasma gondii* puede ser horizontal o vertical. La primera, comúnmente llamada adquirida, es aquella infección que se adquiere en cualquier tiempo posterior al nacimiento; debido a la ingesta de carne mal cocida que contiene quistes tisulares viables, alimentos o agua contaminada con ooquistes que provienen de las heces de gatos infectados, los cuales son una fuente de contaminación. Se ha encontrado que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada con *T. gondii*. En la mayoría de los adultos la infección es subclínica; sin embargo, puede causar enfermedades en personas inmunocomprometidas y rara vez en personas inmunocompetentes, debido a que es uno de los parásitos mejor adaptado a sus huéspedes (Montoya y Liesenfeld, 2004; Dubey, 2004 y 2010).

En personas inmunocompetentes la toxoplasmosis comienza con fatiga, cefalea, sudoración excesiva y dolor muscular y articular; además, puede presentar fiebre ligera y en algunos casos urticaria. Con base en los síntomas mencionados, la toxoplasmosis aguda es poco identificada y puede pasar desapercibida; sin embargo, cuando alguno de éstos síntomas está acompañado con linfadenopatía, se sospecha de toxoplasmosis por ser la manifestación clínica más característica (Dubey, 2004 y 2010)

El desarrollo de daño ocular como la retinocoroiditis aguda, esta comúnmente involucrada con la toxoplasmosis adquirida; donde las lesiones tienden a recurrir con la pérdida de visión progresiva, especialmente cuando se encuentran cerca de las estructuras centrales del ojo (Dubey, 2010).

Las complicaciones más peligrosas de la toxoplasmosis se presentan en los pacientes cuyo sistema inmune ha sido suprimido por alguna enfermedad, terapias anti-tumorales o por presentar el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido (SIDA), ya que en estos pacientes ocasiona encefalitis toxoplásmica, a partir de una reactivación de una infección latente del parásito debido a los efectos inmunosupresores del Virus de Inmunodeficiencia Humana (Dubey, 2004 y 2010).

Otra de las vías de transmisión es por transplante de órganos infectados de un donador positivo a un receptor seronegativo, que al estar recibiendo terapias inmunosupresoras puede iniciar una infección aguda incontrolada o la reactivación de la infección latente en el receptor (Montoya y Liesenfeld, 2004; Dubey, 2004 y 2010)

Se han identificado ciertos trastornos psicológicos de individuos con infección asintomática crónica de *T. gondii*, como la dificultad para evaluar la relación causa-efecto; además, la seropositividad al parásito ha sido ligada a deficiencias con respecto al tiempo de reacción, tendencia a accidentes, cambios de

comportamiento y enfermedades mentales (Dubey, 2004 y 2010).

La transmisión vertical o congénita ocurre cuando una mujer se infecta con *T. gondii* por primera vez durante el embarazo, el parásito puede atravesar la placenta e infectar al embrión en desarrollo, causando la infección congénita. La incidencia y la severidad de la infección, así como el desarrollo de signos clínicos en el bebé está fuertemente relacionado con el tiempo en que ocurre la seroconversión de la madre (Dunn et al, 1999). Cuando la infección congénita se lleva a cabo en el comienzo de la gestación hay menor probabilidad de transmisión; sin embargo, si ésta llegara a ocurrir hay mayor probabilidad de aborto o de que el neonato presente signos clínicos; por el contrario, si la infección de la madre es en etapas tardías, existe una mayor frecuencia de transmisión, pero, hay menor probabilidad de que el recién nacido presente signos clínicos por lo que la infección pasa inadvertida; sin embargo, si no es diagnosticada y tratada se pueden desarrollar problemas clínicos irreversibles, como corioretinitis o retraso de crecimiento en la segunda o tercera década de su vida. (Dunn et al, 1999; Montoya y Liesenfeld, 2004; Correa et al, 2007; figura 3).

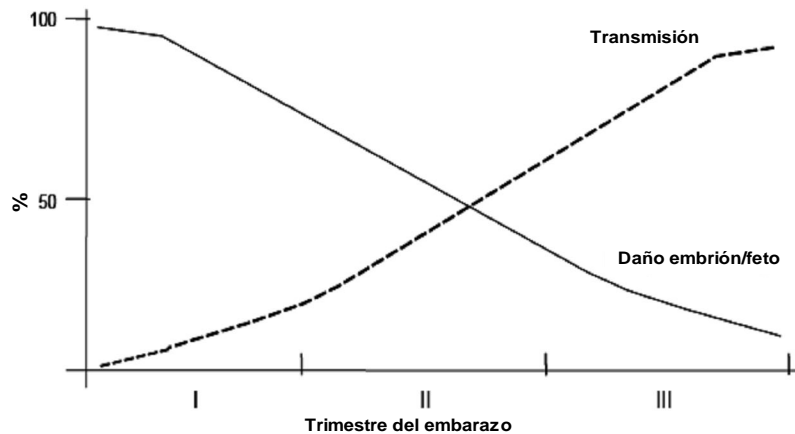


Figura 3. Diagrama que muestra la relación entre la tasa de transmisión vertical de *T. gondii* y el daño al bebé (modificado de Dunn et al, 1999).

Invasión celular

Toxoplasma gondii como parásito intracelular obligado, debe invadir células para sobrevivir y replicarse; presenta tres tipos de organelos secretorios con una alta capacidad de almacenaje de proteínas involucradas en la unión a la célula huésped, en la penetración y en la formación de la vacuola parasitófora (VP); éstos son, los micronemas, las roptrias y los gránulos densos, los cuales se fusionan alternadamente con la membrana del parásito a una velocidad modulada en respuesta a los estímulos involucrados en el proceso de invasión celular descargando las proteínas contenidas en ellos (Carruthers VB. 1999; Laliberté y Carruthers, 2008).

En la figura 4 se muestra un esquema de los organelos celulares del parásito; entre los que se incluyen, situados cerca del núcleo (N): el retículo endoplásmico (ER), el aparato de Golgi (G), el apicoplasto (A) y la mitocondria (M). Los gránulos densos (GD) se encuentran distribuidos a lo largo del citoplasma, mientras que los micronemas (MN) y las roptrias (R) se ubican en la región apical del parásito. En el extremo apical está el conoide (C), a partir del cual se organizan los microtúbulos (MT) y los microfilamentos (MF) del citoesqueleto que se encuentran dentro del complejo interno de membrana (CIM) y la membrana plasmática (MP) (Carruthers, 1999).

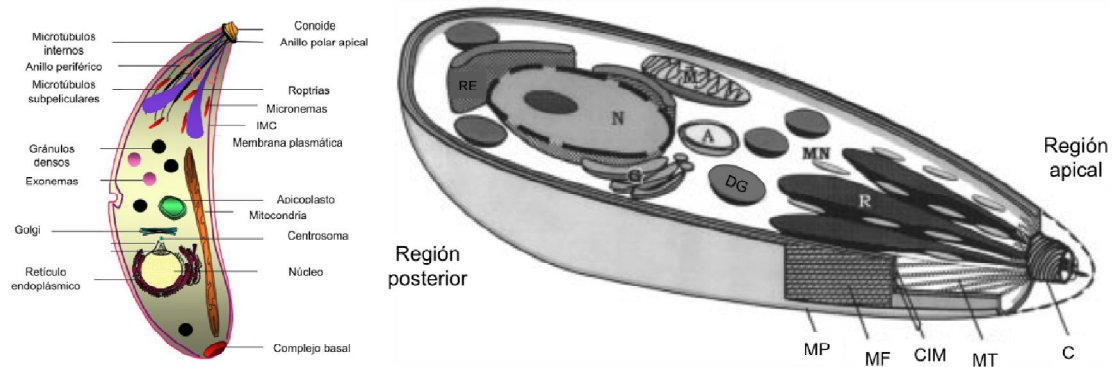


Figura 4. Representación esquemática de los organelos celulares de *T. gondii*. (Tomado y modificado de Carruthers, 1999 y Baum et al, 1996)

La invasión del parásito a su célula blanco está precedida por rotación helicoidal y motilidad por deslizamiento a través de la superficie celular; posteriormente *T. gondii* lleva a cabo un proceso secuencial de secreción de proteínas que comienza con la descarga de los micronemas al mismo tiempo que se adhiere su complejo apical. Las proteínas contenidas en los micronemas (MICs) juegan un papel central en la unión a la célula huésped a través de receptores específicos. Posteriormente, se lleva a cabo la extrusión de las roptrias que comprenden dos diferentes subestructuras, las roptrias del cuello (RON) y las del bulbo (ROP). Las RONS y las MIC se ensamblan en la superficie del parásito para formar la “unión móvil” (MJ), entre la superficie del parásito y la membrana plasmática de la célula huésped; dicha unión asegura la formación de la membrana de la vacuola parasitófora a partir de la membrana celular de la célula huésped. Las ROPs son inyectadas hacia el citoplasma de la célula huésped en pequeñas vesículas que posteriormente se fusionan con la VP; algunos modelos sugieren que el contenido de las roptrias modifica la vacuola para hacer que ésta no se fusione con lisosomas, ni se acidifique y permitir su asociación con la mitocondria y el retículo endoplásmico (figura 5). Una vez que el parásito está dentro de la célula huésped, las proteínas de los gránulos densos (GRAs) son liberadas y organizan la estructura de las membranas tubulares de la red intravacuolar dentro de la VP, la cual soporta el arreglo característico de los parásitos en la replicación (Morisaki et al, 1995; Carruthers VB, 1999; Kim, 2004; Carruthers y Boothroyd, 2007; Laliberté y Carruthers, 2008).

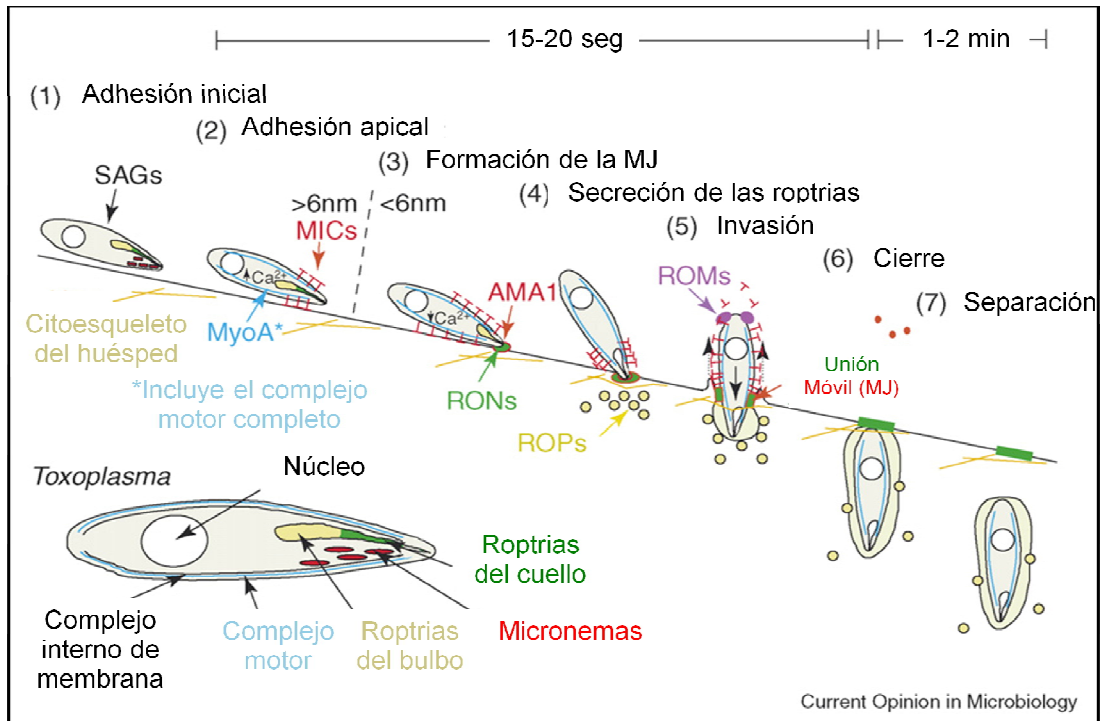


Figura 5. Proceso de invasión celular de *Toxoplasma gondii* (modificado de Carruthers y Boothroyd; 2007)

La membrana de la VP, además de proteger al parásito, presenta proteínas que aseguran el reclutamiento de los organelos como la mitocondria y el retículo endoplásmico, así como la adquisición de nutrientes que vienen del citosol de la célula huésped, para lo cual el parásito forma poros en ella que permiten la difusión bidireccional de pequeñas moléculas, independientemente de la temperatura y energía (Carruthers VB, 2002; Carruthers y Boothroyd, 2007; Laliberté y Carruthers, 2008).

La gran capacidad de adaptación del parásito, está altamente representada por su habilidad de invadir *in vitro* cualquier tipo celular de origen vertebrado que tenga núcleo y que se haya probado; sin embargo, son pocos los estudios enfocados a cinéticas de invasión en diferentes tipos celulares y los modelos empleados son heterogéneos. Contreras-Ochoa et al en el 2011, llevó a cabo una revisión bibliográfica de los diferentes modelos reportados, éstos y otros datos recopilados se pueden observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Datos de los modelos *in vitro* de invasión celular por *T. gondii* (Tomado y modificado de Contreras-Ochoa et a, 2012).

	Tipo celular	Cepa	Genotipo	Relación parásito:célula	Tiempo (h)	% Células infectadas	Referencia
Endotelio	HUVECs	RH	I	2:1	1	58	Benedetto et al, 1997
Sistema Nervioso	Astrocitos Glioblastoma (U373) Fibroblastos	RH	I	1:1	3 3 3	17.9 32 20	Brenier- Pinchart et al, 2004
	Glioblastoma (86HG39)	BK	I	1:1	3	22	Däubener et al, 1993
	Astrocitos	PRU	II	1:1	3	5	Estrán et al, 2006
	Astrocitoma (Glioblastome Humain E)	RH	I	1:1	1 24	10 25	Pelloux et al, 1994
				7:1	1 24	20 45	
	Astrocitoma (Glioblastome Humain E)	RH	I	1:1	24	18	Pelloux et al, 1996
Sangre periférica	Monocitos no adherentes	RH	I	2:1	2	40	Fadull et al, 1995
	Monocitos adherentes				2	20	
	Monocitos no adherentes				2	63	
	HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells)	RH	I	1:10	1	50	Youn et al, 1991

El endotelio vascular

Durante el desarrollo embrionario se forman las tres capas que darán origen a los diversos órganos y tejidos: endodermo, mesodermo y ectodermo. El mesodermo da origen al tejido conectivo del cuerpo, a las células sanguíneas, a los vasos linfáticos y sanguíneos, así como al músculo, riñón y otras estructuras y tipos celulares como las células endoteliales. Estas últimas son de gran importancia ya que delimitan todos los vasos linfáticos y sanguíneos, contribuyen al mantenimiento de la pared de los vasos y a la función circulatoria; además de que tienen la capacidad de ajustar su número y arreglo para cubrir los requerimientos locales (Gilbert, 2003; Galley y Webster 2004).

Los vasos sanguíneos más grandes son las arterias y las venas que tienen una pared gruesa de tejido conectivo y varias capas de músculo liso; ésta pared está delineada por una lamina delgada de células endoteliales, que a su vez está separada de las capas exteriores por la lamina basal. La cantidad de tejido conectivo y músculo liso de la pared de los vasos varía de acuerdo al diámetro del vaso y la función, pero la delimitación endotelial siempre está presente. En los brazos más finos del “árbol vascular”, los capilares y sinusoides, además de la capa de células endoteliales sostenidas por la lamina basal existen únicamente algunos pericitos, que son células de tejido conectivo que rodean estos vasos pequeños y dan sostén (Gilbert, 2003).

En el embrión, las células endoteliales se originan en sitios específicos a partir de precursores que dan lugar a células sanguíneas; éstas migran, proliferan y se diferencian para formar los primeros y rudimentarios vasos sanguíneos, proceso conocido como vasculogénesis. El crecimiento subsecuente de los vasos a través del cuerpo se debe principalmente a la proliferación y movimiento de las células endoteliales, a partir de esos primeros vasos, por un proceso llamado angiogénesis (Alberts et al, 2008).

A pesar de que todo el endotelio viene de células endoteliales comunes, existe una marcada variación fenotípica entre las células endoteliales de diferentes partes del sistema vascular; esto debido a las células endoteliales que desarrollan arterias, venas y vasos linfáticos expresan diferentes genes, presentando así, diferencias que permiten guiar los tipos de vasos a través de las diversas vías, controlar selectivamente la formación de conexiones y regular el desarrollo de diferentes tipos de paredes a lo largo de los vasos (Alberts et al, 2008).

Entre las funciones del endotelio, destaca su participación en la homeostasis y en reacciones inmunológicas e inflamatorias. Como una barrera el endotelio es semi-permeable y regula la transferencia de pequeñas y grandes moléculas bidireccionalmente a la circulación sanguínea, además de que participa también en funciones metabólicas y sintéticas (Galley y Webster 2004).

El endotelio tiene mecanismos de transporte específico para movilizar macromoléculas esenciales de la sangre circulante a través de éste al espacio sub-endotelial, para cubrir las necesidades metabólicas del tejido circundante; además, las uniones entre células, uniones estrechas, actúan como una barrera selectiva al egreso de moléculas de la circulación (Galley y Webster 2004).

Para llevar a cabo la transcitosis o el transporte transcelular, las células endoteliales son capaces de formar invaginaciones en su membrana celular para formar vesículas acarreadoras; mientras que, para el transporte paracelular, las uniones estrechas son importantes, aunque la permeabilidad vascular depende de ambos tipos de transporte. Las uniones estrechas pueden funcionar como puertas, regulando el paso de iones, agua o algunas macromoléculas y mantienen la polaridad celular previniendo que se mezclen moléculas del lado apical (en contacto con la sangre) con aquellas que se encuentran del lado membranal (Galley y Webster 2004).

Las células endoteliales tienen una posición estratégica en la defensa del huésped y la inflamación, la regulación de estas respuestas depende de la comunicación intracelular y se lleva a cabo por medio de citocinas que incluyen quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento, entre otras que son producidas o reconocidas por éstas células. Además, regulan el movimiento leucocitario hacia los tejidos y median la adhesión de leucocitos al endotelio por la unión a moléculas de adhesión o ligandos específicos como la E-selectina, P-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (Galley y Webster 2004).

Desarrollo de la placenta

Durante la vida intrauterina el embrión/feto debe adquirir oxígeno y nutrientes, así como remover desechos, para sobrevivir y crecer. La placenta y los tejidos que la rodean deben satisfacer estos requerimientos, al mismo tiempo que secretan hormonas que ayudan al útero a retener al embrión y producen reguladores de la respuesta inmune que impiden a la madre rechazarlo. Alrededor de los tres días después de la fertilización, la mórula, un pequeño grupo interno de células rodeado por un grupo más grande (trofotodermo), alcanza la cavidad uterina y se convierte en blastocisto. El primer paso de diferenciación consiste en que la masa celular interna, localizada en uno de los polos, origina al embrión, mientras que el trofotodermo, compuesto por trofoblastos, rodea la cavidad del blastocisto y se convierte en la placenta, posteriormente el blastocisto se adhiere al endometrio y los trofoblastos se diseminan rápidamente y proliferan invadiéndolo, en el proceso llamado implantación. Conforme el embrión crece, el endometrio es invadido y las paredes superficiales de los capilares sufren erosión, dando lugar a la *decidua basalis*, iniciando la infiltración de la sangre materna a las lagunas. Hacia el final de la segunda semana del embarazo comienza el desarrollo de las vellosidades coriónicas, cuya porción terminal consiste de una columna de citotrofoblastos y una envoltura, el sinciciotrofoblasto (figura 6). Más adelante, cuando las arterias espirales invaden, la sangre materna llega en mayor cantidad, llenando la laguna, alrededor del sinciciotrofoblasto y se convierten de vasos angostos a anchos

permitiendo un flujo de sangre materna más abundante alrededor de las vellosidades (figura 7).

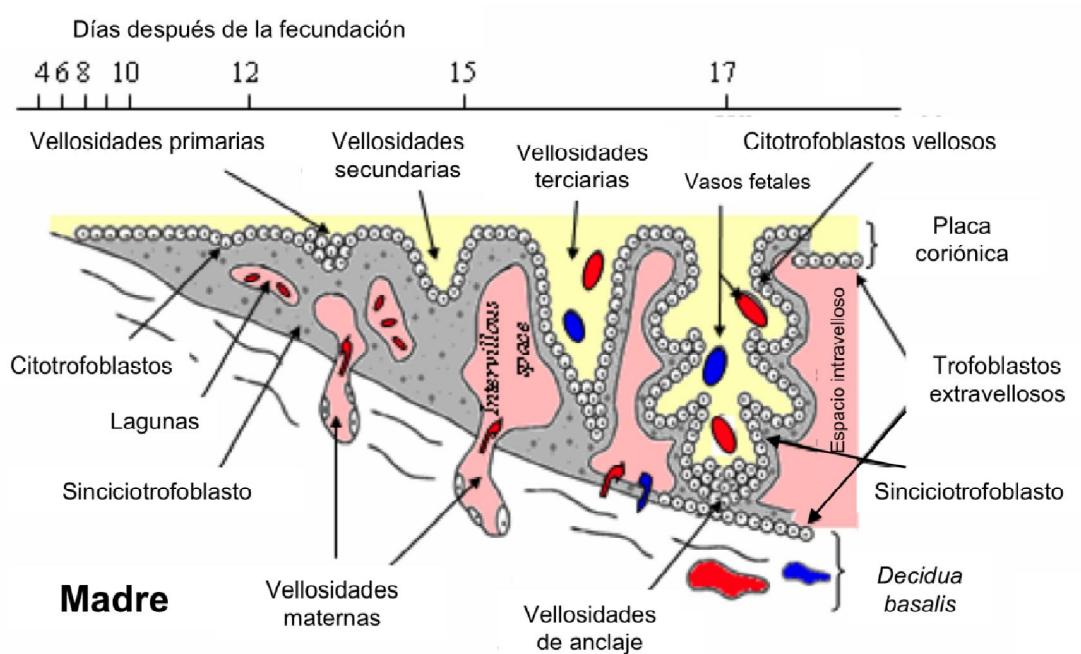


Figura 6. Desarrollo de la placenta (modificado de Correa et al, 2007)

Cuando los vasos sanguíneos fetales son funcionales comienza la circulación fetoplacentaria, posteriormente se establecen las vellosidades coriónicas, unidades funcionales y estructurales de la placenta y la sangre materna baña a su superficie externa (Gilbert, 2003; Correa et al, 2007; Wang et al; 2010).

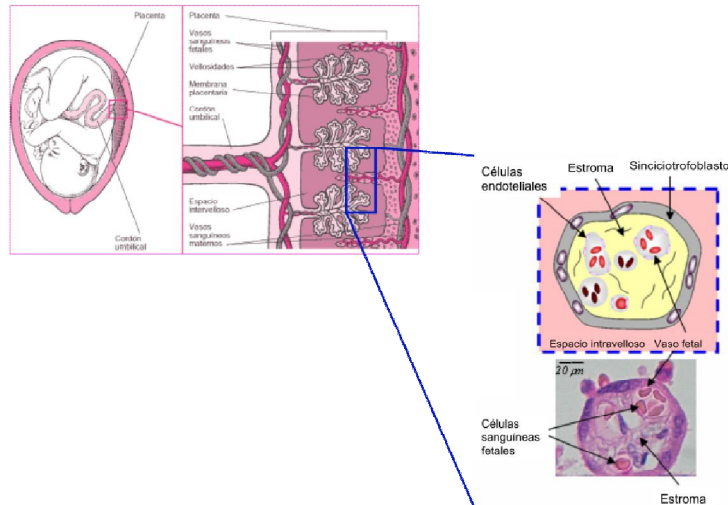


Figura 7. Vasos sanguíneos fetales (tomado y adaptado de Saji, 1999 y Correa et al, 2007)

Transmisión vertical de inmunidad

La placenta humana es un órgano fetal que participa en el intercambio de sustancias entre la madre y el feto; algunas de las funciones de este órgano son el transporte y la secreción. Las sustancias que pasan de la sangre materna a la fetal deben atravesar una barrera histológica compuesta por el sinciciotrofoblasto, el estroma del espacio intravilloso y el endotelio de los vasos sanguíneos fetales; sin embargo una amplia variedad de sustancias es transferida activa o pasivamente a través de la placenta. Muchos compuestos de bajo peso molecular (<500 Daltons) pasan por difusión simple, mientras que las sustancias de alto peso molecular usualmente no atraviesan la placenta; pero hay excepciones como los anticuerpos de clase IgG, para los que cada uno de los tejidos y células placentarias expresan patrones únicos de los diferentes tipos de receptores para el Fc de las IgGs. Sin embargo, el único que se ha demostrado que transporta anticuerpos es el FcR “neonatal” (FcRn), localizado en el sinciciotrofoblasto y en células endoteliales de los vasos fetales de la placenta (Kristoffersen et al, 1990; Simister y Story, 1997; Saji, et 1999; Takizawa et al, 2005; Roopenian y Akilesh, 2007; Wang et al; 2010).

JUSTIFICACIÓN

Cuando una mujer se infecta con *T. gondii* por primera vez durante el embarazo puede transmitirlo al feto, ocasionando la toxoplasmosis congénita, que le puede causar diversas lesiones severas dependiendo de la etapa de la gestación. Reportes en la literatura indican, que las cepas más relacionadas a la toxoplasmosis congénita son las tipo II seguidas de las tipo I en América del Norte y Europa. La tasa de transmisión vertical de la toxoplasmosis aumenta conforme avanza el embarazo mientras que la probabilidad de daño al feto disminuye. Las necesidades de irrigación sanguínea de la placenta aumentan con respecto al tiempo de gestación; por otro lado, el parásito puede infectar leucocitos para diseminarse rápidamente a otros tejidos vía torrente sanguíneo, además tienen la capacidad de atravesar barreras biológicas como la placenta. De ésta manera los taquizoitos pueden ser conducidos por la sangre materna hacia la placenta, pueden atravesar el sincitiotrofoblasto y el estroma hasta llegar al endotelio vascular, el cual deben también atravesar, para llegar al torrente circulatorio fetal, para posteriormente diseminarse hacia los diversos tejidos. Por lo anterior, es de suponer que las células endoteliales podrían ser una vía de transmisión vertical de *T. gondii*. Existen pocos estudios que evalúen la invasión de células endoteliales del parásito *in vitro*; además hay gran heterogeneidad en los tipos celulares estudiados, las cepas del parásito y los tiempos de interacción entre ellos; con muy pocas excepciones, no se ha hecho una cinética de invasión comparando cepas de linajes “virulentos”, teóricamente más invasivas, y aquellas más comunes, pero menos patogénicas, generalmente tipo II. Por lo anterior, se planteó el siguiente objetivo.

OBJETIVO

Comparar la cinética de invasión de taquizoitos de la cepa RH (tipo I) y ME49 (tipo II) de *T. gondii*, en células endoteliales humanas de cultivos primarios y de una línea celular.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Experimental, longitudinal y comparativo.

Estrategia general del estudio

1. En una primera fase se estandarizó el aislamiento y cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs) y las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) de una línea comercial.
2. Posteriormente se llevó a cabo la obtención de taquizoitos de la cepa virulenta (RH) y no virulenta (ME49) en ratones infectados BALB/c y C57BL6 RAG2-/- respectivamente y propagadas en cultivos de células Vero, una línea comercial de células epiteliales de riñón de mono verde.
3. Finalmente se hicieron cinéticas de invasión utilizando taquizoitos de ambas cepas de *T. gondii* en los dos tipos de cultivos de células endoteliales.

MÉTODOS DE LABORATORIO

1. Cultivos celulares

1.1 Procedimiento para el aislamiento y cultivo primario de HUVECs

Se obtuvieron muestras de cordón umbilical (~100g) de bebés con más de 36 semanas de gestación, de mamás clínicamente sanas, sin complicaciones en embarazos previos o en el presente, provenientes del Hospital Belisario Domínguez, de la delegación Iztapalapa. Todas las mujeres aceptaron participar en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado. Las muestras de cordón se trasladaron en el medio M199 de transporte.

El aislamiento de las HUVECs se realizó dentro de una campana de flujo laminar, mediante el siguiente procedimiento. El cordón umbilical se lavó externamente con alcohol al 70%, posteriormente se localizaron y se canularon ambos extremos de la vena umbilical con un dilatador y se fijaron conectores de acero quirúrgico con la ayuda de hilo de sutura. La vena umbilical se lavó con HEPES 1x (solución de

lavado) para eliminar la sangre y los coágulos y las HUVECs se obtuvieron por digestión con colagenasa tipo II, al 0.02%, durante 20 min a 37°C en una incubadora con 7% de CO₂. Transcurrido este tiempo, las HUVECs fueron desprendidas dando ligeros masajes al cordón y la acción de la colagenasa fue detenida con medio de transporte (Figura 8).

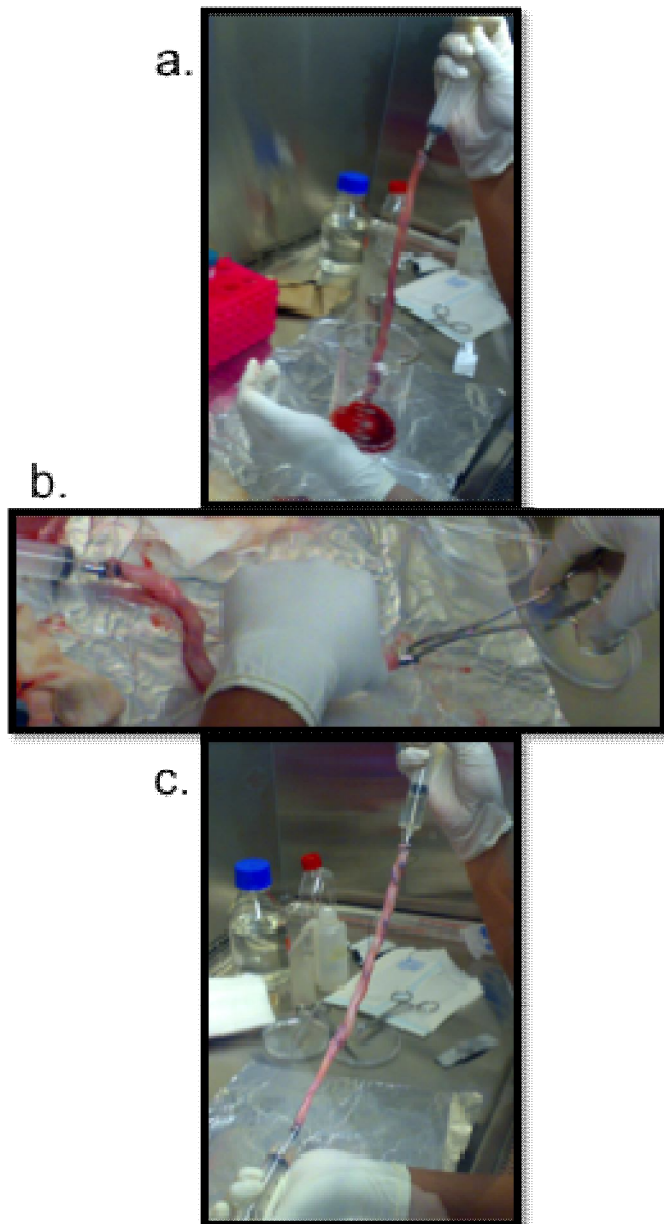


Figura 8. Aislamiento de HUVECs. (a). Lavado de vena umbilical con HEPES; (b). Canulación y fijación de adaptadores quirúrgicos; (c). Incorporación de la colagenasa para la digestión de las HUVECs.

La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos; el botón, que contenía las HUVECs se resuspendió en medio M199 completo y fue sembrado en cajas de cultivo de plástico de 25cm² y se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 7% CO₂, hasta confluencia para su posterior resiembra; ésta resiembra y las consecutivas tuvieron como finalidad la proliferación y purificación de las células endoteliales de otros tipos celulares provenientes de la muestra (Jaffe et al, 1973; Baudin et al, 2007).

Los cultivos celulares con una confluencia mayor al 95% (Figura 9b), se lavaron con 3 mL de HEPES 1x, se les agregó 3 mL de tripsina al 0.5% y se incubaron a 37° C para despegarlas de la caja; esta reacción fue detenida con medio M199 de paro, al observar que la mayoría de las células ya estaban flotando en la solución. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm por 10 min. Posteriormente, las HUVECs se resuspendieron en M199 completo y se dividieron en dos botellas (1er resiembra). Lo descrito anteriormente se llevó a cabo una vez más para así obtener la 2da resiembra; mientras que la tercer resiembra se llevó a cabo en cajas de cultivo de 24 pozos, las cuales contenían cubreobjetos, colocando 100,000 células por pozo; contabilizadas por cámara de Neubauer y con azul tripano para conocer su viabilidad. Los cultivos del tercer pase se mantuvieron con sus respectivos medios por 72 horas para lograr una confluencia celular mayor al 90%.

1.2 Cultivo de la línea celular semi-inmortal de endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1)

Las células endoteliales de microvasculatura humana fueron transfectadas por el antígeno T del virus 40 de simio y posterior a esto fueron caracterizadas, encontrándose que mantenían varias de las características de células endoteliales por Ades et al en 1992. El crecimiento y las características celulares de las HMEC-1 son similares a los de las HUVECs con respecto a la expresión del factor von Willebrand (glicoproteína constitutiva del endotelio) y epitopos de superficie como el CD31 (molécula involucrada en la angiogénesis); unión a lectinas, incorporación de lipoproteína acetilada de baja densidad, patrones de expresión de moléculas de

adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) además de citocinas (IL-8, MCP-1 y GM-CSF) (Lidington et al, 1999; Bouïs et al, 2001; Unger et al, 2002).

Las HMEC-1 fueron propagadas en medio MCDB-131, en botellas de cultivo de 75 cm², a 37° C en una incubadora con 7% de CO₂ (Figura 9a); se realizaron pases rutinarios y cuando fue necesario se resembraron en cajas de cultivo de 24 pozos, colocando 100,000 células por pozo de manera similar a lo descrito para las HUVECs.

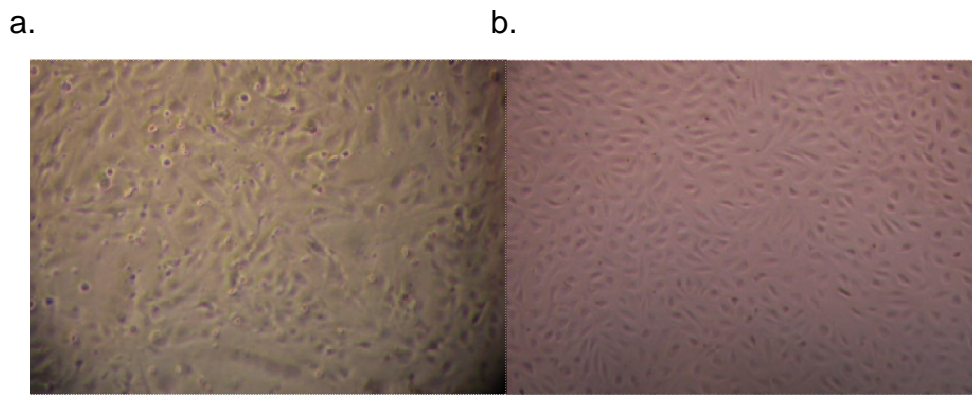


Figura 9. Cultivos de monocapas confluentes de células endoteliales, visto con microscopio invertido en contraste de fases; aumento 10x. (a). Línea celular HMEC-1; (b). Cultivos primario de HUVECs

2. Ensayos de invasión de células endoteliales con taquizoitos de dos cepas de *T. gondii*.

2.1 Obtención de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*.

Los taquizoitos de la cepa RH y ME49, fueron mantenidos por pases en peritoneo de ratones BALB/c y C57BL6 RAG2^{-/-} respectivamente. Los ratones se infectaron vía intraperitoneal con una dosis de 3×10^6 taquizoitos contenidos en 500µL de PBS 1x; 4 días después de la infección, se llevo a cabo el lavado del peritoneo con 3mL de PBS 1x y se colectaron aproximadamente 250×10^6 de taquizoitos de la cepa RH y 10×10^6 de la cepa ME49. Con el fin de purificar y propagar los

taquizoitos recolectados, se inocularon 20×10^6 de la cepa RH y 10×10^6 de la cepa ME49 en cultivos confluentes de células Vero contenidos en botellas de cultivo de 25 cm^2 ; éstos se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 7% de CO_2 por 48 horas. Finalmente se cosecharon aproximadamente 100×10^6 de taquizoitos de la cepa RH y 44×10^6 de la cepa ME49, que se emplearon para llevar a cabo los ensayos de infección.

La suspensión obtenida de los cultivos infectados se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min, y después se resuspendió en una cantidad necesaria de medio M199 de invasión (Saadatnia et al, 2010).

2.2. Cinética de invasión de *T. gondii* en HUVECs y HMEC-1

Para llevar a cabo la interacción entre los taquizoitos de *T. gondii* y las HUVECs o HMEC-1, se retiró el medio de cultivo metabolizado y se adicionó la cantidad de taquizoitos correspondiente a la relación parásito-célula 10:1 (Contreras-Ochoa, 2011) resuspendida en $400 \mu\text{L}$ de medio de invasión. Posteriormente las placas se agitaron para distribuir homogéneamente los parásitos inoculados y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que los parásitos se depositaran en el fondo de los pozos y tuvieran interacción con la monocapa celular. Finalmente se permitió la invasión de los taquizoitos por tiempos de 30 minutos hasta 4 horas. Transcurridos los tiempos, los parásitos no adheridos fueron removidos con el sobrenadante y las células fueron lavadas cuidadosamente con solución de Hank's a 37°C dos veces; toda la solución fue removida y la invasión fue completamente detenida por fijación con metanol en frío por 10 minutos. Los parásitos extracelulares remanentes en los sobrenadantes fueron cuantificados. (Morisaki et al, 1995; Kafsack et al, 2007)

Después de los diferentes tiempos de invasión, los cultivos infectados y no infectados (control), previamente fijados fueron teñidos con colorante de Wright o Giemsa. Para la tinción de Wright se colocaron $300 \mu\text{L}$ de colorante por 3 minutos,

se agregaron 300 μ L de agua por 3 minutos más para lograr un contraste de la tinción y finalmente las placas se lavaron 3 veces con 1mL de agua destilada y se dejaron secar al aire para su posterior evaluación. Para la tinción con Giemsa se colocaron 300 μ L por 2 minutos, se retiró completamente el colorante y se colocaron 300 μ L de agua por 3 minutos; finalmente a las placas se les retiró completamente el agua y se dejaron secar al aire para su posterior evaluación.

Finalmente se llevó a cabo la evaluación de las monocapas celulares; la infección fue identificada con la presencia de al menos una vacuola parasitófora en el citoplasma de la célula y se expresó como porcentaje (número de células con vacuolas parasitóforas por cada 100 células contadas); además, se cuantificó el número de vacuolas por cada célula infectada considerando ahora el número de células infectadas como el 100% (Benedetto et al, 1997; Abbasi et al, 2003; Contreras-Ochoa, 2011). Cada ensayo se realizó por triplicado.

RESULTADOS

*Estandarización de la cinética de invasión de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en células endoteliales humanas.*

Las cinéticas de invasión celular se realizaron en cultivos de HUVECs confluentes (>90%) con taquizoitos de la cepa RH, en ausencia de la mezcla de antibióticos-antimicótico; la primera relación parásito:célula empleada fue 1:1 hasta 1 hora, pero no se observaron resultados positivos a la infección, por lo que se probaron las relaciones de 2:1 y 4:1. Como se puede observar en la figura 10, los porcentajes de invasión celular son menores al 1%, presentando todas las células infectadas sólo una vacuola parasitófora; por lo que se decidió incrementar tanto la relación parásito:célula (10:1) como los tiempos de exposición (hasta 4 horas).

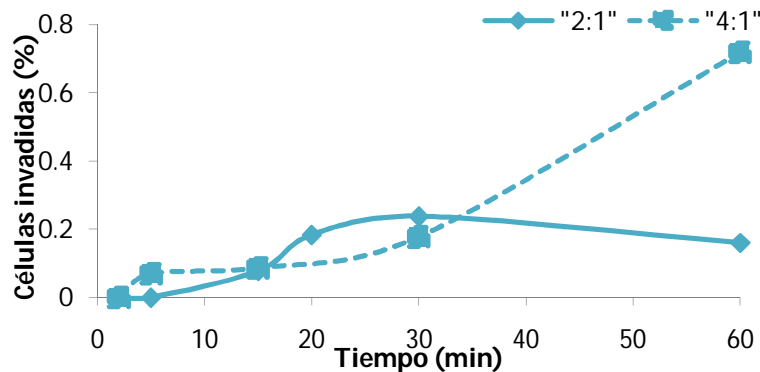


Figura 10. Cinética de invasión de taquizoitos RH de *T. gondii* en HUVECs. Relación parásito:célula 2:1 y 4:1.

Para identificar si la confluencia de la monocapa celular influía en el porcentaje de invasión, se llevó a cabo un ensayo donde se infectaron cultivos celulares de HMEC-1 de confluencia aproximada del 40% con taquizoitos de la cepa RH en presencia de la mezcla de antibióticos-antimicótico en el medio de cultivo. Los resultados indican que la confluencia parece no influir sobre los porcentajes de invasión (Figura 11); sin embargo, debido a que se busca montar un modelo experimental que logre representar adecuadamente las condiciones *in vivo*, la

confluencia mínima requerida para llevar a cabo las cinéticas de invasión en los ensayos posteriores fue $\geq 90\%$.

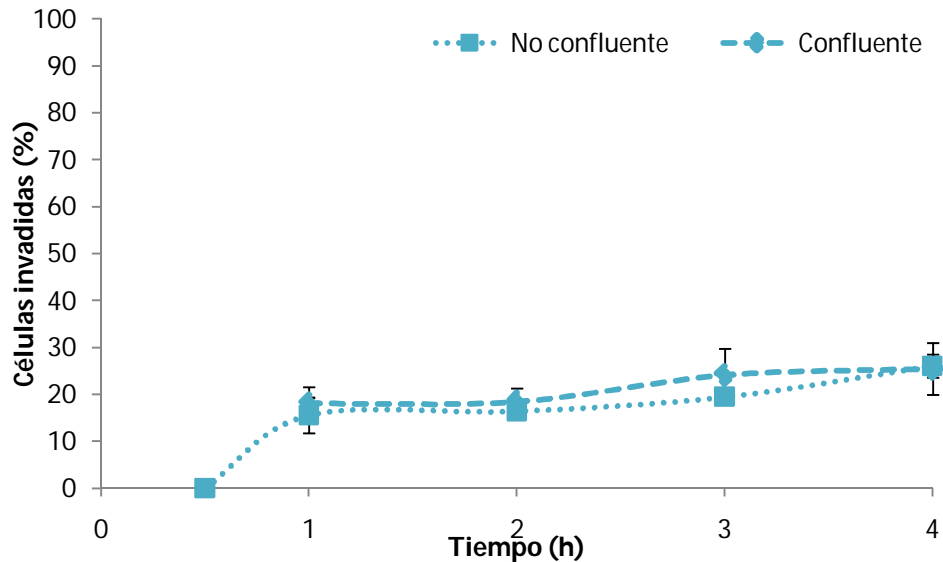
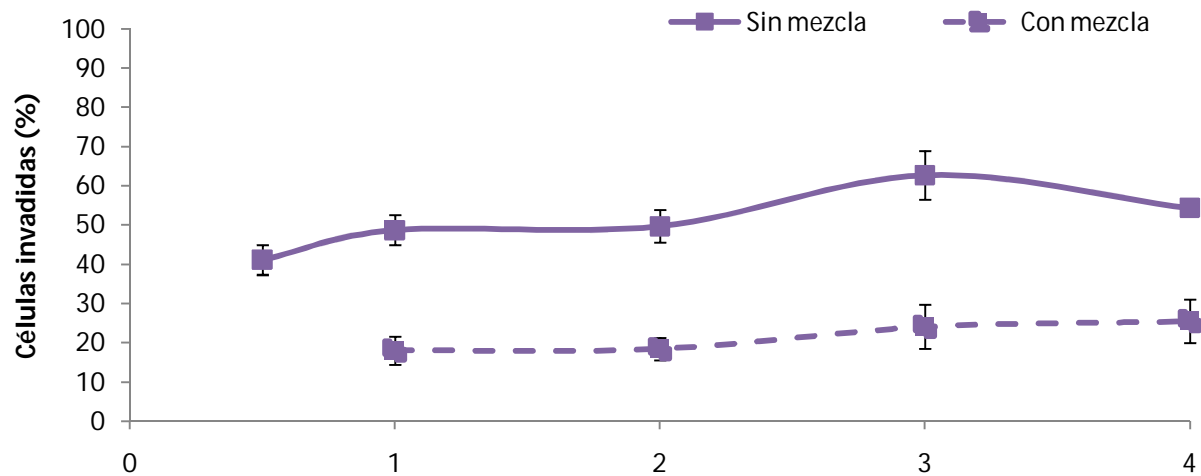


Figura 11. Cinética de invasión de tachizoitos RH de *T. gondii* en cultivos confluentes y no confluentes de HMEC-1, en presencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico.

Relación parásito:célula 10:1.

Los siguientes ensayos realizados se llevaron a cabo en presencia y ausencia de la mezcla de antibióticos-antimicótico en el medio de cultivo con ambas cepas de tachizoitos a la relación 10:1 en cultivos celulares confluentes de la línea HMEC-1; los resultados se muestran en la figura 12 y 13.

a)



b)

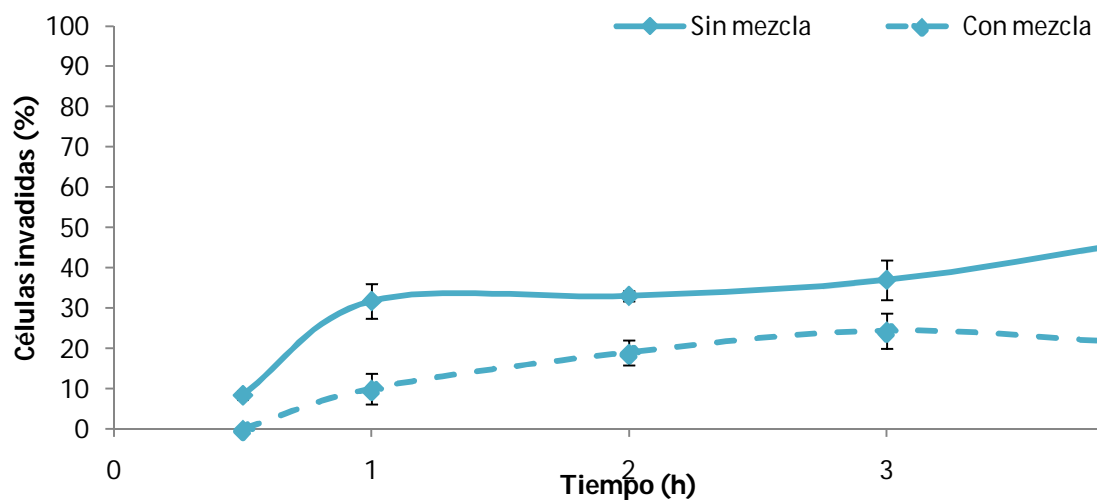
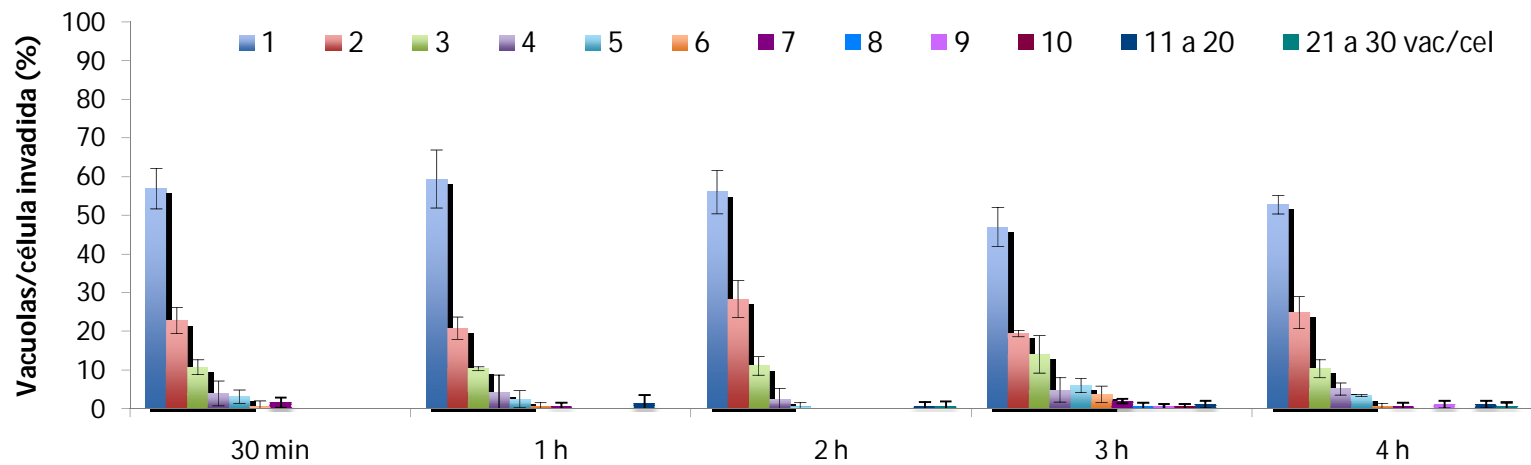
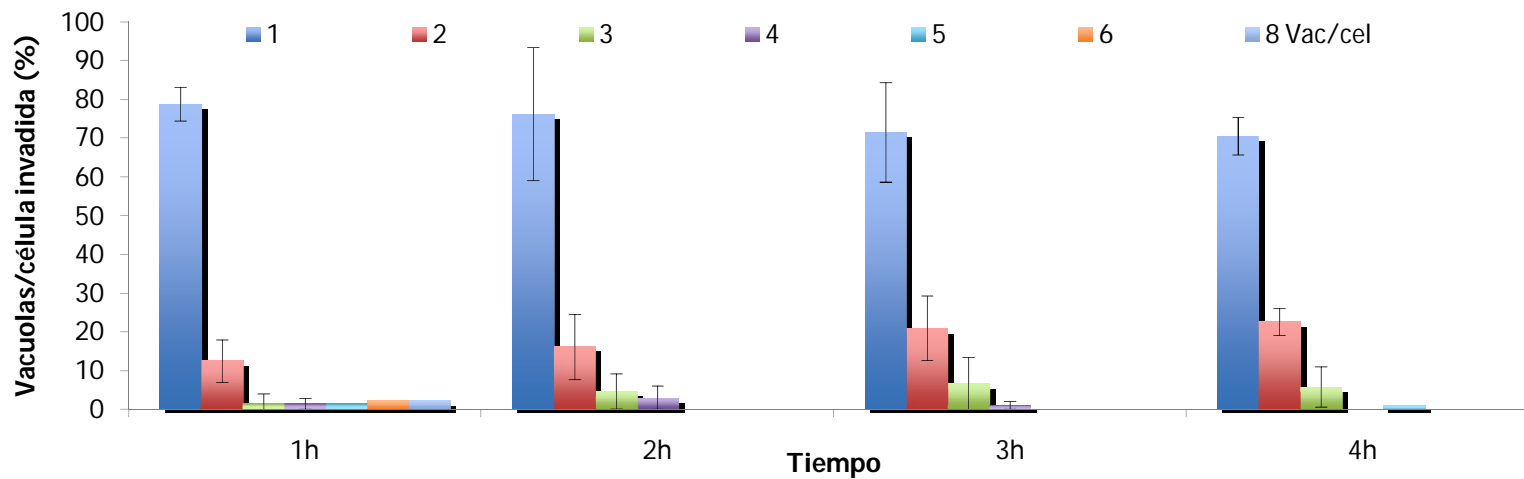


Figura 12. Cinética de invasión de taquizoitos ME49 (a) y RH (b) de *T. gondii* en presencia o ausencia de la mezcla de antibióticos/antimicótico en el medio de cultivo en HMEC-1. Relación parásito:célula 10:1.

a)



b)



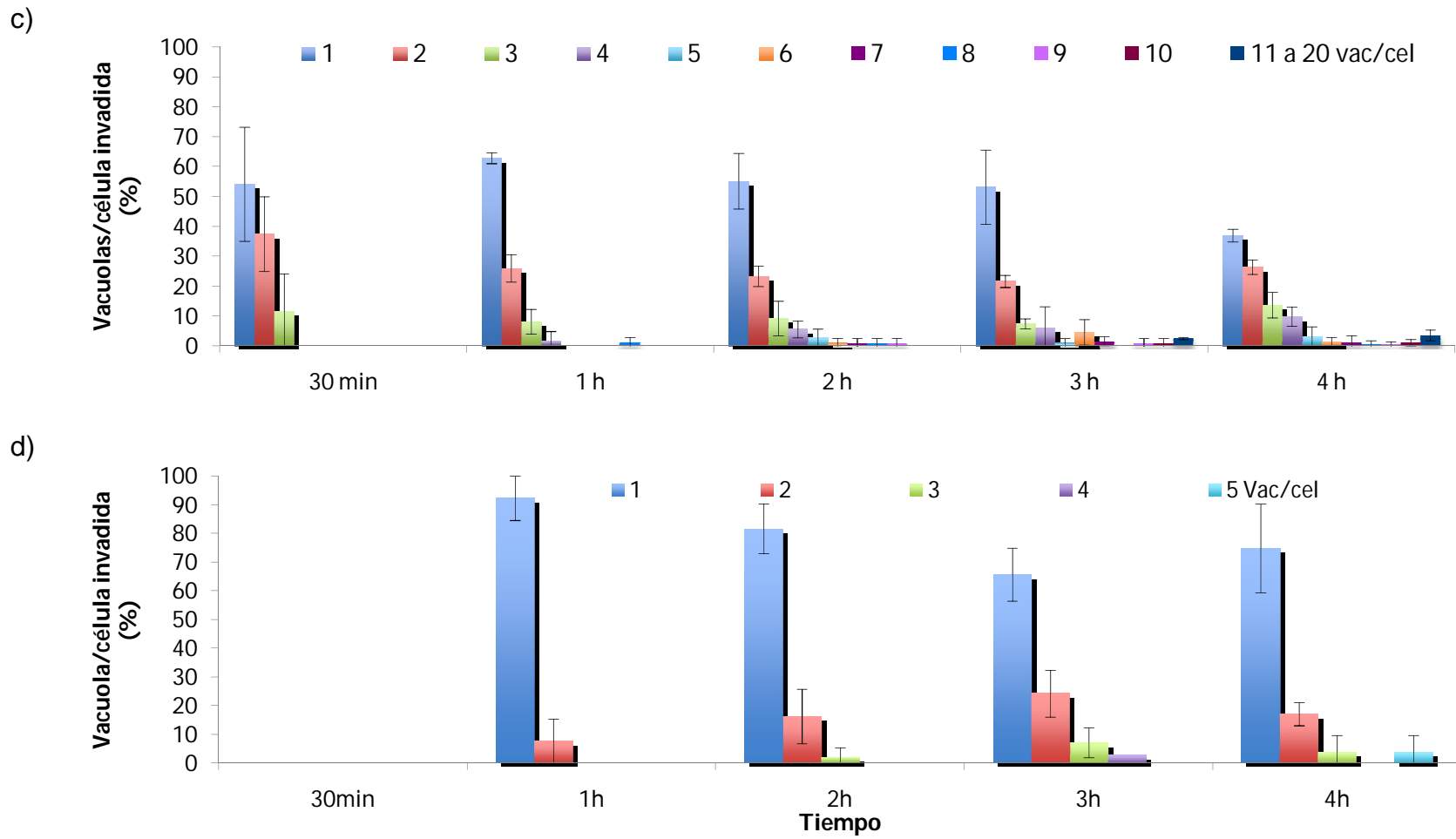
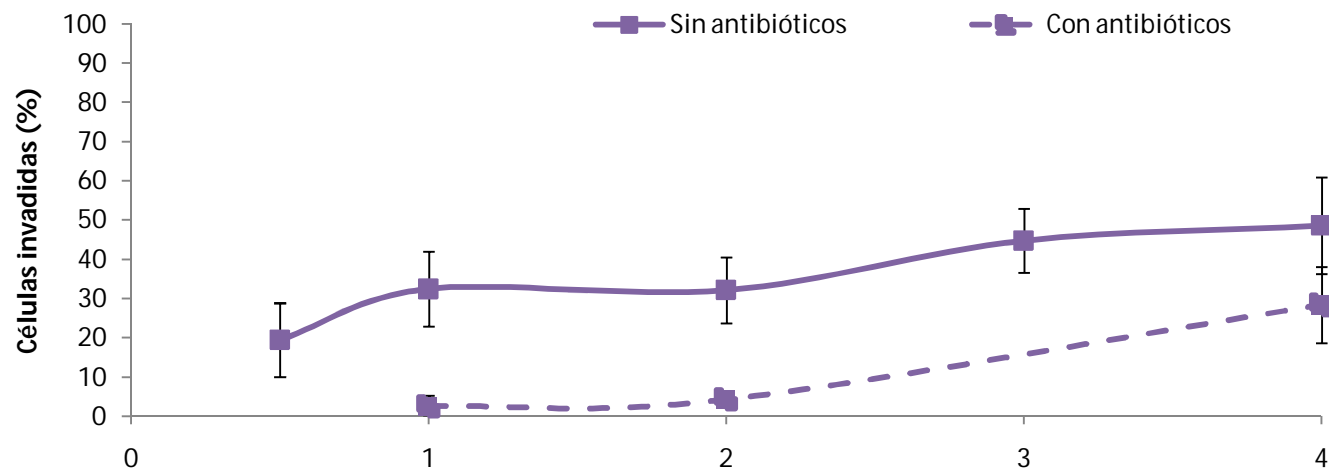


Figura 13. Número de vacuolas parasitóforas desde 30 minutos hasta 4h en el 100% de células invadidas con taquizoitos de *T. gondii* de la cepa ME49 (a y b) y RH (c y d) en ausencia y en presencia de la mezcla de antibióticos/antimicótico respectivamente.

El porcentaje de invasión celular disminuyó cuando en el medio de invasión se incluyó la mezcla de antibióticos-antimicótico con ambas cepas de *T. gondii*. También la cantidad de vacuolas/célula infectada disminuyó (Figura 13a y b para ME49; c y d para RH). Para la cepa ME49 se observaron hasta 30 vacuolas/célula sin la mezcla, mientras que con esta se observaron solo 8 como máximo. Para la cepa RH se observaron 20 y 5 vacuolas/célula sin y con la mezcla respectivamente.

Con base en estos resultados se probó si la presencia solo de los antibióticos (penicilina-G y estreptomicina) afectaba la invasión celular del parásito utilizando HUVECs. Los resultados indican que la cantidad de HUVECs invadidas, así como la cantidad de vacuolas parasitóforas/célula invadida disminuyó (Figura 14 y 15), por lo que se decidió llevar a cabo el resto de los ensayos en ausencia de cualquiera de éstos.

a)



b)

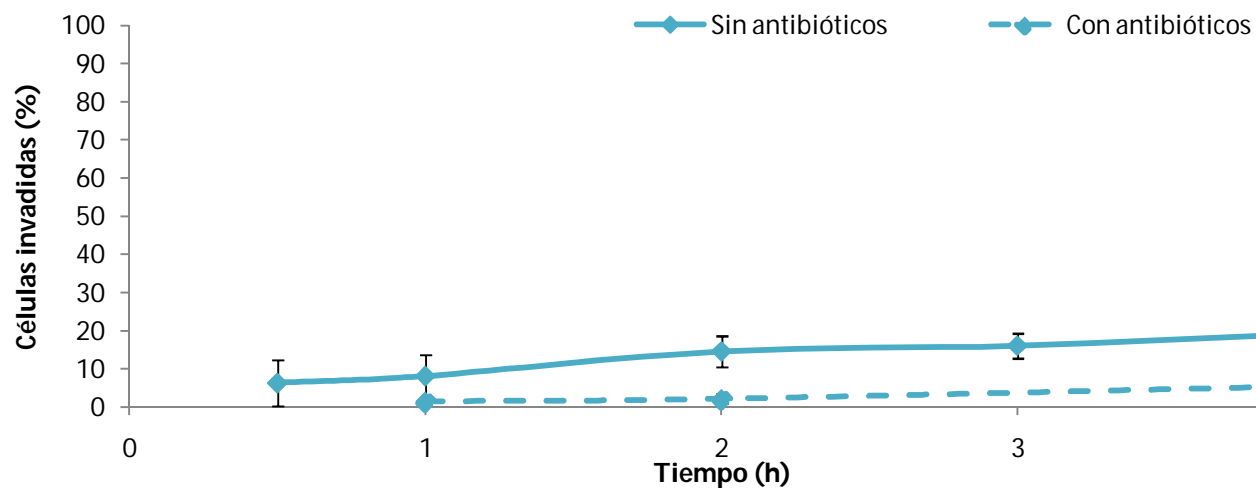
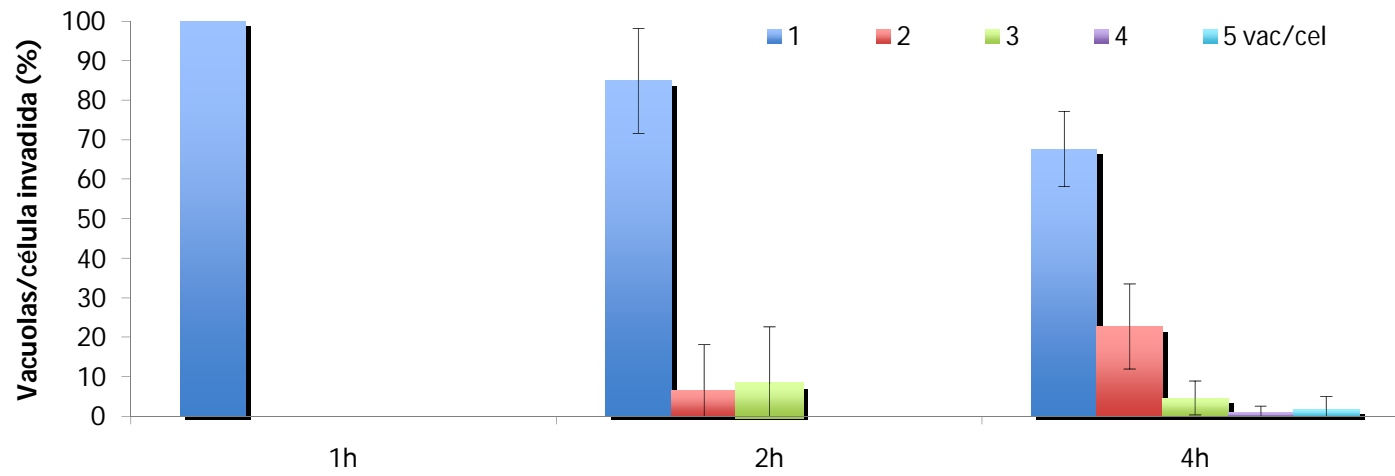


Figura 14. Cinética de invasión de taquizoitos ME49 (a) y RH (b) de *T. gondii* en presencia o ausencia de antibióticos en el medio de cultivo en HUVECs. Relación parásito:célula 10:1.

a)



b)

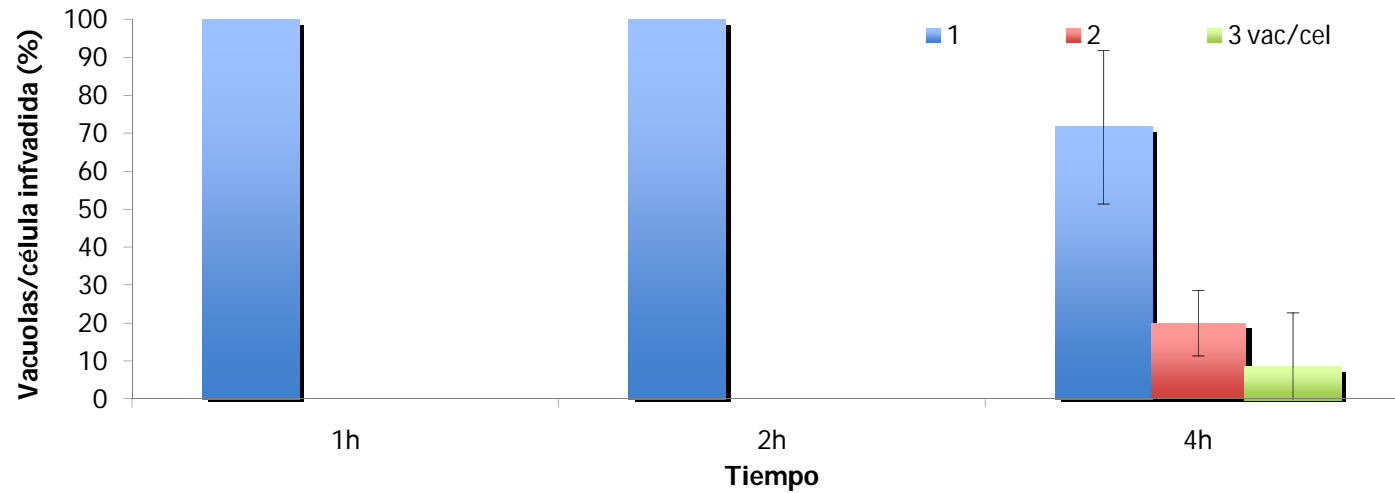
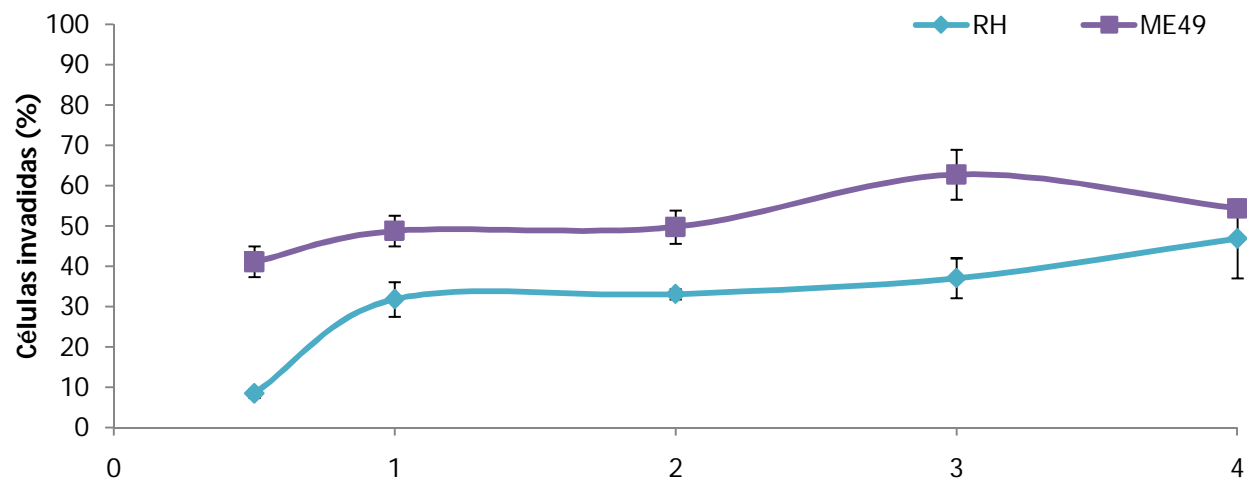


Figura 15. Número de vacuolas parasitóforas desde 30 minutos hasta 4h en el 100% de células invadidas con taquizoitos de *T. gondii* de la cepa ME49 (c) y RH (d) en presencia de la mezcla de antibióticos.

En la figura 16 y 17, podemos observar que el porcentaje de invasión celular y la cantidad de vacuolas/célula en los cultivos retados con los taquizoitos de la cepa ME49 es mayor que con la cepa RH, sin importar el tipo celular. Así mismo, los porcentajes de invasión más altos, se obtuvieron en las HMEC-1 (figura 16a y b). En la figura 17, las gráficas c y d de la cepa ME49 y la e y f de la RH, se observa que el número de vacuolas/célula invadida aumenta proporcional al tiempo, prevaleciendo la presencia de sólo una vacuola incluso a las 4 horas.

Las figuras 18 y 19 representan esquemáticamente las cinéticas en HMEC-1 y HUVECs respectivamente.

a)



b)

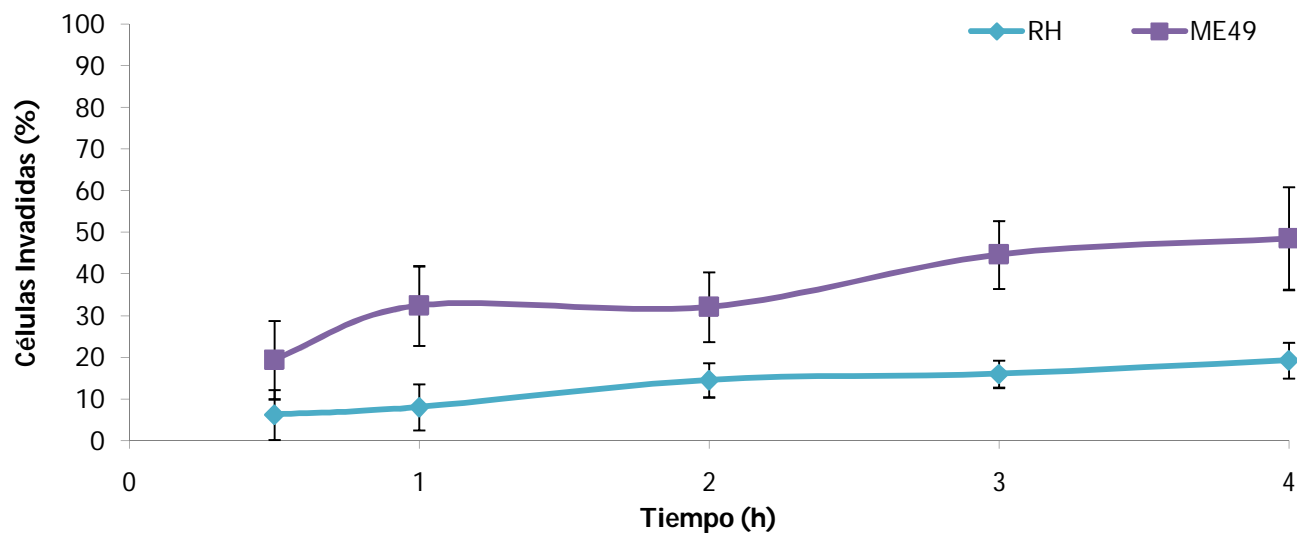
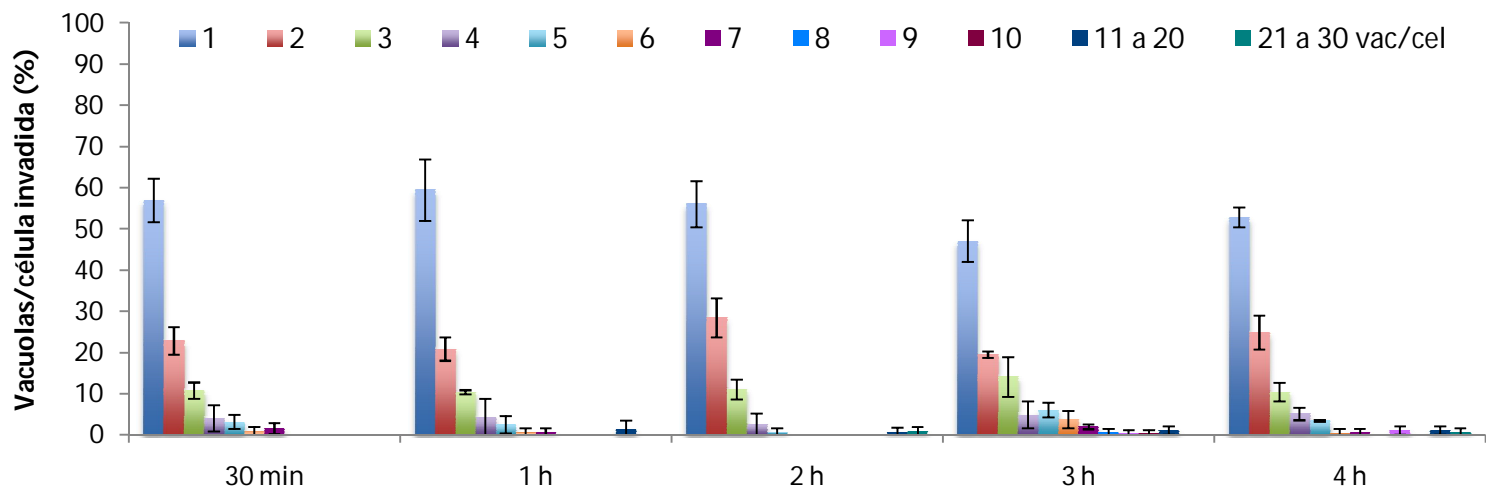
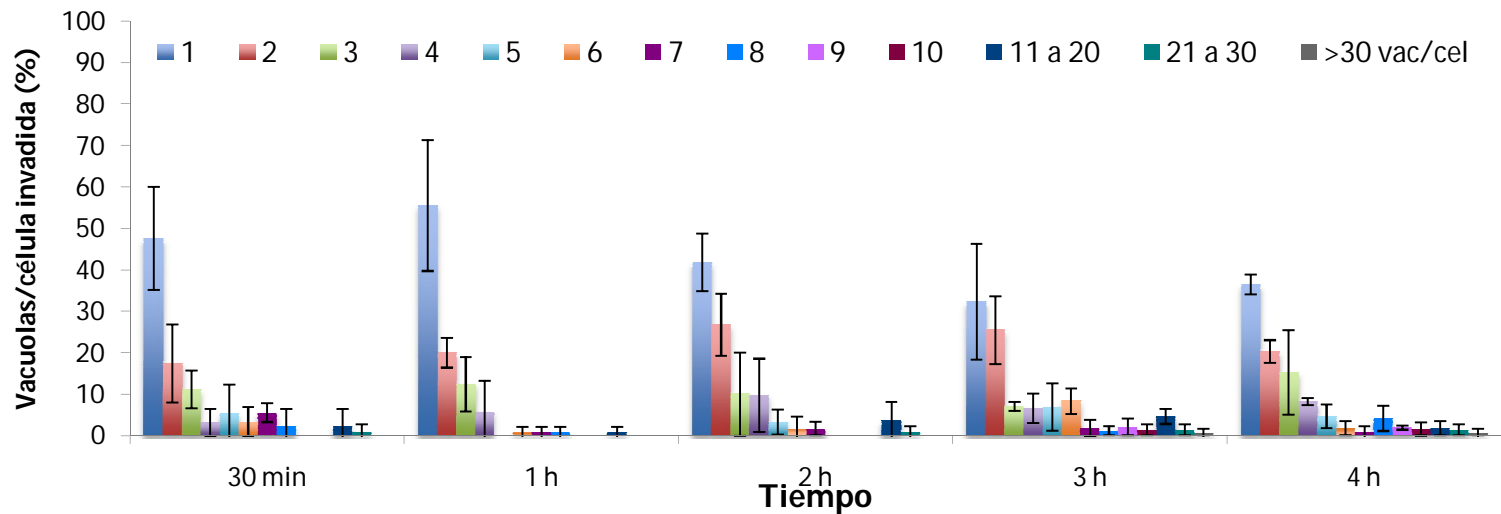


Figura 16. Cinética de invasión de taquizoitos RH y ME49 de *T. gondii* en células (a) HMEC-1 y (b) HUVECs, en ausencia de antibióticos/antimicótico en el medio de cultivo.

a)



b)



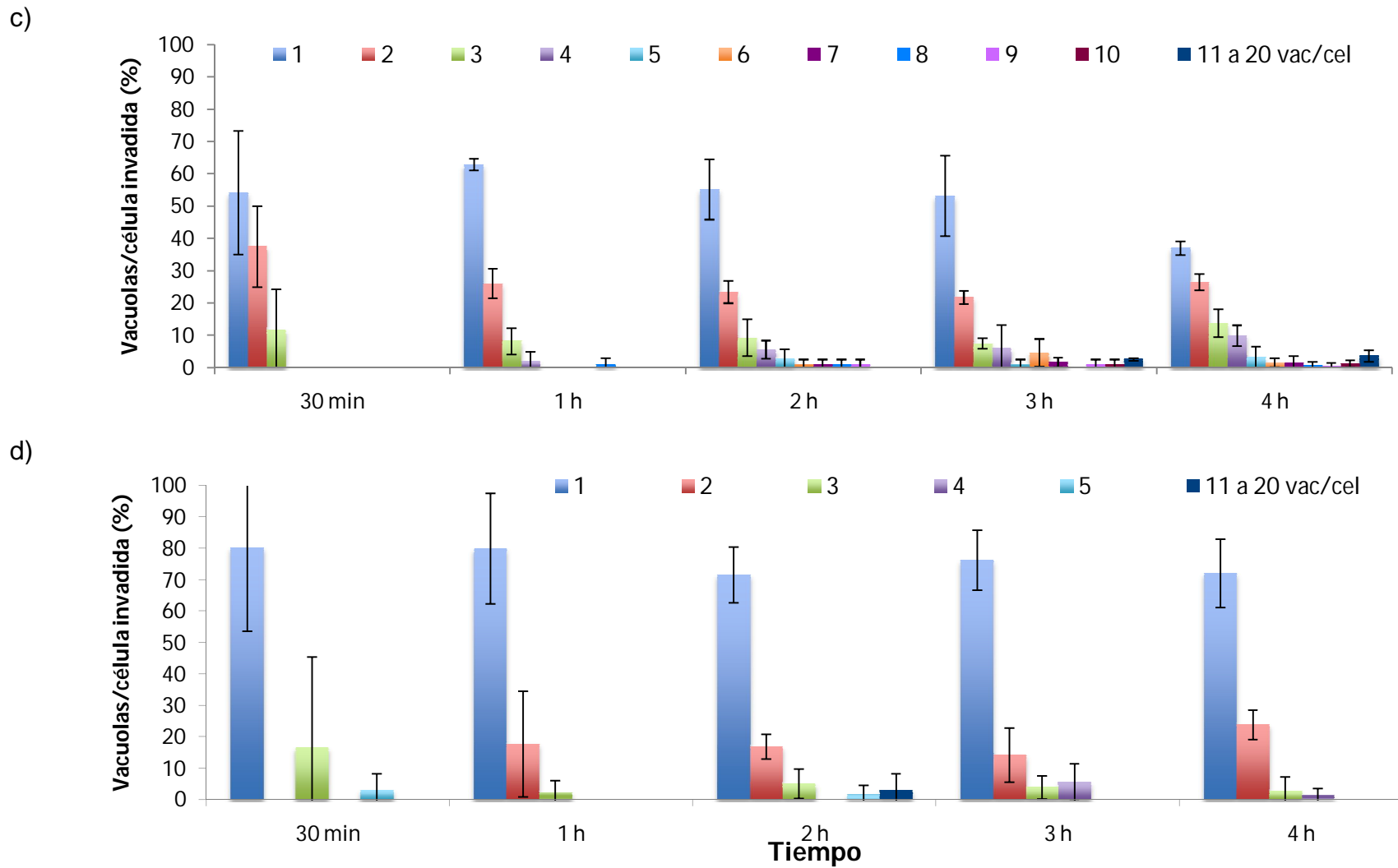


Figura 17. Número de vacuolas parasitóforas desde 30 minutos hasta 4h en el 100% de células invadidas con taquizoitos de *T. gondii* de la cepa ME49 (a y b) y RH (c y d) en HMEC-1 y HUVECs respectivamente.

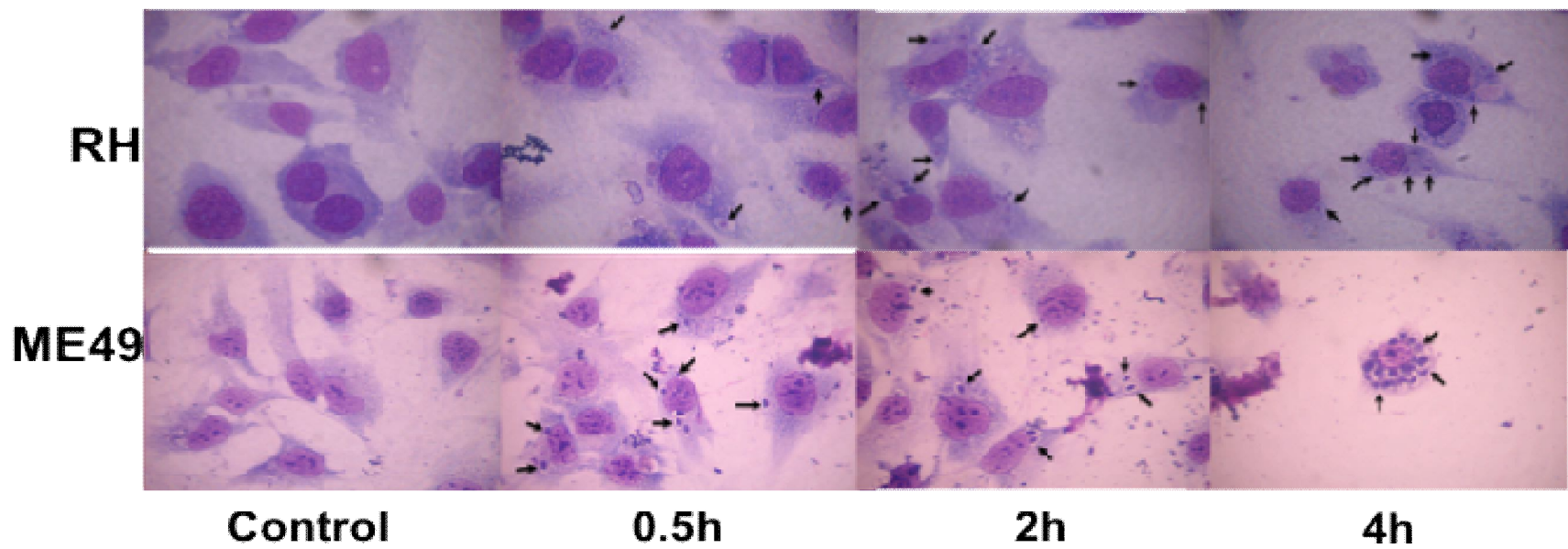


Figura 18. HMEC-1 invadidas por taquizoitos RH y ME49 de *T. gondii*. Las flechas indican vacuolas parasitóforas en el citoplasma de la célula.

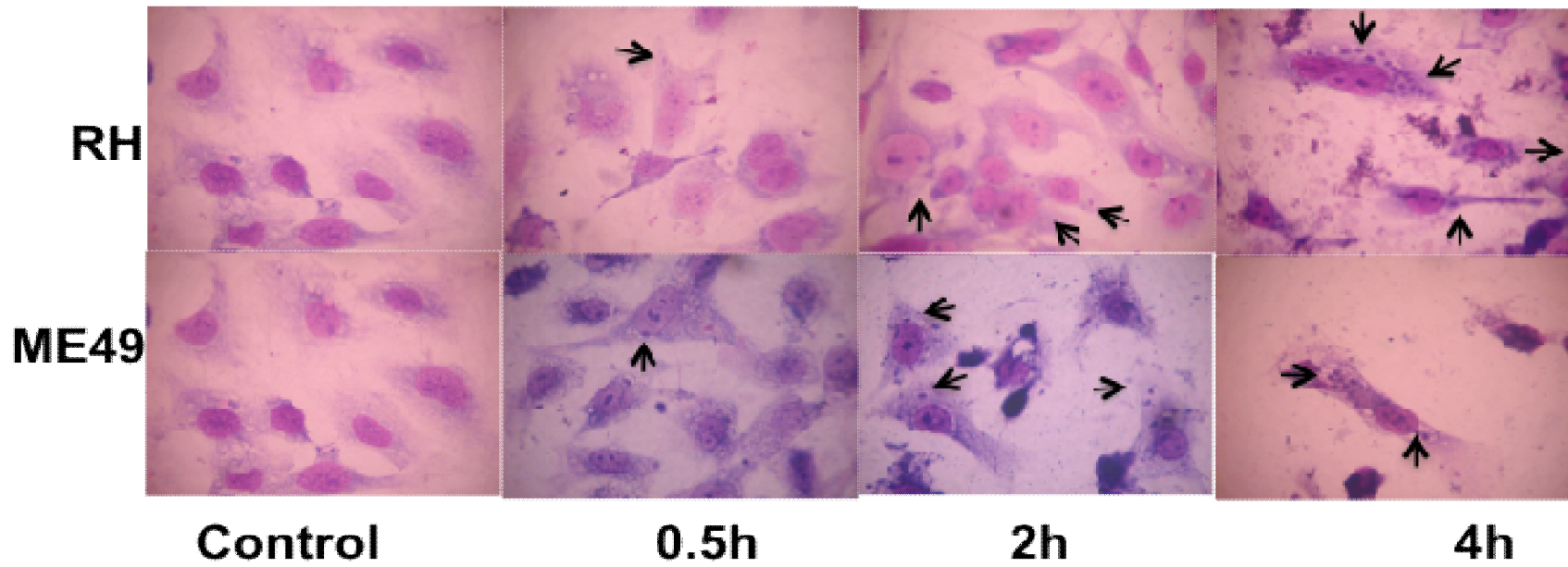


Figura 19. HUVECs invadidas por taquizoitos RH y ME49 de *T. gondii*. Las flechas indican vacuolas parasitóforas en el citoplasma de la célula.

DISCUSIÓN

La infección con *Toxoplasma gondii* por primera vez durante el embarazo, representa un problema de salud pública considerable, ya que éste parásito puede atravesar la placenta y ocasionar daños al feto en desarrollo o después del nacimiento, por lo que es importante que se generen modelos para identificar a las posibles vías de transmisión al feto. Debido a que las células endoteliales del sistema vascular fetal pueden ser una vía de transmisión potencial y además, en la literatura hay pocos estudios sobre la cinética de invasión en los diferentes tipos celulares que pueden ser infectados por éste parasito; en el presente trabajo se adaptó y estandarizó un modelo de invasión *in vitro* de células endoteliales humanas. Para esto, se llevó a cabo un proceso de estandarización y se determinó la dosis parásito:célula, a la cual se obtuviera alrededor del 50% de invasión celular y las condiciones adecuadas para ello.

Para determinar la relación parásito:célula, se probaron varias proporciones, desde 1:1 hasta 4:1 hasta 1 hora; sin embargo, no se detectaron porcentajes de invasión considerables, lo cual pudo deberse a que el tiempo de interacción fue corto o a que la poca cantidad de taquizoitos no encontró una célula blanco ideal para invadirla. Por lo que se decidió incrementar la relación a 10:1 y los tiempos desde 5 minutos hasta 4 horas; observándose un incremento de las células invadidas desde los 30 minutos de contacto, por lo que se llevaron a cabo las cinéticas a esta relación y tiempo.

Se realizaron experimentos para determinar el papel de la confluencia celular en la invasión, para ello, se llevó a cabo un ensayo comparando cultivos celulares cuya confluencia era mayor al 90% (confluentes) y otras con confluencia menor al 50% (no confluentes). Los resultados obtenidos no mostraron diferencia alguna, lo cual puede deberse a que la relación parásito:célula siempre se mantuvo, es decir, por cada célula de ambos cultivos siempre hubo 10 parásitos, esto aunado a que la solución de parásitos siempre estuvo correctamente homogenizada sobre los

cultivos, lo que implica la misma probabilidad de las células para ser encontradas e invadidas por los taquizoitos. Debido a que solo se realizó un ensayo en estas condiciones los datos no son determinantes y se necesitan un número mayor de ensayos para corroborar estos resultados. Sin embargo, tomando en cuenta que *in vivo* las células endoteliales recubren totalmente las venas y capilares, para los ensayos siguientes se emplearon cultivos con una confluencia mínima del 90%.

Así también, se observó que la invasión de las células HMEC-1 por los taquizoitos de ambas cepas de *Toxoplasma gondii* disminuyó cuando estaba presente una mezcla de antibióticos-antimicótico (penicilina-G, estreptomicina, anfotericina B) en el medio de invasión; la literatura reporta como tratamiento de elección contra el parásito a la pirimetamina y a la sulfadiazina; por lo que la disminución de la invasión celular pudo deberse al efecto sinérgico de ambos antibióticos con el antimicótico. A pesar de que no hay datos que demuestren que la viabilidad de los taquizoitos puede ser afectada por éstos, otros reportes en los que llevan a cabo investigación usando algunos antimicóticos como el fluconazol y el itraconazol para ser empleados como una alternativa en el tratamiento contra el parásito en pacientes que no pueden ser tratados con el medicamento de elección (Martins-Duarte, et al; 2010). Con base en estos datos, así como de algunos reportes en los que llevaron a cabo ensayos de interacción parásito:célula, en presencia de antibióticos, se decidió probar si la mezcla de únicamente los antibióticos afectaba la invasión celular; cabe mencionar que es necesario probar la sola presencia del antimicótico en el medio para corroborar su efecto.

Los ensayos de invasión en HUVECs utilizando únicamente la mezcla de antibióticos (penicilina-G y estreptomicina) también mostraron disminución en la invasión sin embargo, la viabilidad de los taquizoitos de ambas cepas, no disminuyó después de la interacción con los cultivos celulares, (datos no mostrados), se puede sugerir que los antibióticos y la mezcla de antibióticos-antimicótico podría afectar algún mecanismo; por ejemplo, de motilidad o de adhesión del parásito y que por ende disminuya su capacidad de invasión. Por

tanto, se eliminó la presencia de cualquier antibiótico y antimicótico en el medio de invasión.

Se llevó a cabo el análisis de los resultados comparando únicamente ensayos en los que estuviera ausentes los antibióticos y antimicótico en el medio de invasión, con una relación parásito:célula 10:1 con la cepa virulenta, RH, y la no virulenta, ME49, en cultivos al 90 % de confluencia de los dos tipos celulares humanos: HMEC-1 y HUVECs. Con ambas cepas los porcentajes de invasión aumento conforme al tiempo de interacción, sin embargo, la cepa ME49 presentó porcentajes de invasión mas altos que la RH en ambos tipos celulares, desde los tiempos cortos, pues a los 30 minutos el 41.1% de las HMEC-1 y el 19.4% de las HUVECs ya estaban infectadas, además de que también hubo un mayor número de vacuolas por célula con respecto al tiempo. En el caso de la cepa RH, además de que invade menor cantidad de células, 46.8% en HMEC-1 y 19.3% en HUVECs, alcanza su máximo porcentaje de invasión a tiempos mas largos; estas características de invasión son contradictorias con los datos de la virulencia de ambas cepas, ya que se esperaba que la RH al ser un prototipo de cepa virulenta infectaría más a los cultivos que la ME49; sin embargo, el hecho de que la cepa ME49 presente porcentajes de invasión mas altos podría deberse a que la viabilidad de los taquizoitos de esta cepa se ve afectada si no esta dentro de su célula huésped, por lo que el parásito entra más rápido. Por otro lado, la cantidad de vacuolas parasitóforas encontradas por célula invadida en ambos tipos de células endoteliales aumenta con respecto al tiempo, encontrándose hasta 20 vacuolas/célula en los ensayos con la cepa RH y aproximadamente 30 vacuolas/célula en los realizados con la cepa ME49; con la característica de que en todos los tiempos hay mayor número de células infectadas con una sola vacuola; estas observaciones pueden atribuirse al hecho de que la cepa ME49 puede ser menos selectiva al momento de invadir su célula blanco, ya que al ver afectada su viabilidad, invade con mayor preferencia a las células circundantes aunque éstas ya estén invadidas por otros parásitos; por otro lado debe también tomarse en cuenta que las cepas menos virulentas, como la ME49 tienen mayor

preferencia por invadir células en la fase del ciclo celular G1-S (Youn et al, 1991), por lo que la mayor cantidad de vacuolas observadas en los ensayos realizados con esta cepa corroboran dicha preferencia. En el caso particular de la cepa RH cuando invadieron a las HUVECs, el número de vacuolas por célula es menor que en los demás casos, esto puede deberse a que el porcentaje total de células invadidas es bajo y tomando en cuenta que éste número se tomó como el 100% para el conteo de vacuolas/célula, pudieron no cuantificarse algunas células invadidas con mayor número de vacuolas, por lo que es necesario analizar un número mayor de células invadidas (al menos 100).

Con respecto a las diferencias encontradas entre los dos tipos de células endoteliales; la línea semi-inmortal HMEC-1 presentó porcentajes de invasión más altos (con ambas cepas del parásito) que los cultivos primarios de HUVECs, lo cual podría deberse en cierto grado a que el medio utilizado para cultivar a las células de la línea están adicionados con hidrocortisona. Se sabe que ésta hormona tiene efecto sobre varias vías de señalización, como la gluconeogénesis, el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, y la supresión de la respuesta inmune (Alberts et al, 2008); con respecto a ésta última, interfiere con la producción de radicales libres producidos por los macrófagos, los cuales son necesarios para el control del parásito en la fase inicial de la infección (Miller et al, 2009), algunos de estos mecanismos que alteran la integridad de las células podrían estar sucediendo, por lo que aumentaría la susceptibilidad de este tipo de células endoteliales. Brenier-Pinchard et al, en el 2004; reporta un 32% de invasión de la línea U373 de glioblastoma humano contra el que observaron en astrocitos humanos de cultivos primarios, de 17.9%, a las 3 horas, con una relación parásito:célula de 1:1, con taquizoitos de la cepa RH; estos datos y los obtenidos aquí sugieren que algunas líneas de células humanas son más susceptibles a la invasión por el parásito que células de cultivos primarios, lo que puede deberse al hecho de que pierden controles en el ciclo celular al ser transfectadas para que lleven a cabo un proceso de proliferación descontrolada para su mantenimiento *in vitro*. Por otro lado, el propio parásito secreta algunos

factores, aún desconocidos, que inducen a los cultivos a entrar a la fase del ciclo celular G1-S; además como se mencionó anteriormente, se ha visto que tanto los parásitos de la cepa RH y de la ME49 tienen preferencia por invadir células en dicha fase, siendo ésta mayor para la cepa no virulenta (Youn et al, 1991; Angeloni et al, 2009; Lavine y Arrizabalaga, 2009). Dado que las HMEC-1 tienen un ciclo de división celular más rápido, la probabilidad de que el parásito encuentre células en la fase S es más alta que en el caso de las HUVECs, por lo que este factor explicaría en parte que la línea sea más susceptible a la invasión por el parásito. Por lo tanto, se necesitan más estudios para comprobar el efecto de la hidrocortisona sobre la susceptibilidad de las HMEC-1 a la invasión por *T. gondii*; asimismo, emplear otros tipos celulares humanos y comparar entre cultivos primarios y líneas para identificar si se repite el fenómeno de mayor susceptibilidad para las líneas.

Las células endoteliales humanas son susceptibles a la infección por las dos cepas de *T. gondii* empleadas en este trabajo, aunque al compararlas con otros tipos celulares como células del sistema nervioso (Däubener et al, 1993; Pelloux et al, 1994; Pelloux et al, 1996; Brenier-Pinchart et al, 2004; Estrán et al, 2006) o de sangre periférica (Youn et al, 1991; Fadull et al, 1995) se infectan en menor porcentaje. Sin embargo, dado que si son invadidas por el parásito si podrían ser una vía potencial de transmisión, aunque, se necesitan más estudios como cinéticas a tiempos mayores, paso del parásito a través de una monocapa y proliferación células endoteliales, para demostrar por completo su papel en la transmisión vertical.

CONCLUSIONES

La línea celular HMEC-1 es más susceptible a la invasión por el parásito intracelular *Toxoplasma gondii* que los cultivos de HUVECs.

Los taquizoitos de la cepa ME49 invaden más rápidamente con una mayor cantidad de parásitos por célula que la cepa RH a ambos tipos de células endoteliales.

La habilidad de los taquizoitos de *T. gondii* de las cepas RH y ME49 para invadir los cultivos de células endoteliales se afectó por la presencia de la mezcla de penicilina-G, estreptomycin y anfotericina B e incluso por la sola presencia de los antibióticos en el medio de cultivo.

REFERENCIAS

- Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. 2003. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. J Infect Dis. **188**(4):608-16.
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. J Invest Dermatol. **99**(6):683-690.
- Ajzenberg D, Dumètre A, Dardé ML. 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol. **43**(4):1940-1943.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Tibayrenc M and Dardé ML. 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. Int J Parasitol. **32**: 27-38.
- Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carme B, Dardé ML. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. **34**:1185-1196.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Molecular biology of the cell. 5^a ed. Garland Science. 1445-1450 pp.
- Angeloni MB, Silva NM, Castro AS, Gomes AO, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. 2009. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. Placenta. **30**(9):785-91.
- Appleford PJ, Smith JE. 1997. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. Acta Trop. **65** (2):97-104.
- Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. 2007. A protocol for isolation and culture of human vein endothelial cells. Nat Protoc. **2**(3): 481-485.
- Benedetto N, Folgore A, Ferrara C, Moliterno M, Galdiero F. 1997. Effects of alpha-adrenergic agonists on *Toxoplasma gondii* replication in human umbilical vein endothelial cells. Pathol Biol (Paris). **45**(1):9-18.
- Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol

Mol Biol Rev. **64**(3):607-23.

- Boothroyd JC, Grigg ME. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?. *Curr Opin Microbiol.* **5**(4):438-4.
- Bouïs D, Hospers GAP, Meijer C, Molema G, Mulder NH. 2001. Endothelium *in vitro*: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis.* **4**: 91-102.
- Brenier-Pinchart M-P, Blanc-Gonnet E, Berger F, Durand F, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. 2004. Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression in Vitro. *Acta Neuropathol.* **107**: 245–249.
- Carruthers VB. 1999. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int.* **48**:1-10.
- Carruthers VB. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* **81**: 111-122.
- Carruthers V, Boothroyd JC. 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol.* **10**(1):83-9.
- Cedillo-Pelaez C. 2009. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México. (Tesis de Maestría).
- Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, Correa D. 2012. *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol Res.* 2012 Feb 8.
- Contreras-Ochoa CO. 2011. Dinámica de crecimiento de *Toxoplasma gondii* en astrositos murinos y su efecto en la supervivencia y la apoptosis de la célula infectada. (Tesis de Doctorado).
- Correa D, Coballase UE, Cañedo SI, Rico TC. 2006. Toxoplasmosis. En: Flisser A, Pérez TR, editores. *Aprendizaje de la parasitología basado en problemas.* Editores de Textos Mexicanos. México, D.F., México. 355-367 pp.

- Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. 2007. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* **29**: 651-660.
- Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Becerra-Torres E, Olmedo-Hernández M, Medina-Escutia ME, Murrieta S, Hernández-Islas JL. 2007. Immunobiology of congenital toxoplasmosis. En: Terrazas LI (ed). *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*. Research Signpost. Kerala, India, 387 pp.
- Dardé ML. 2004. Genetic análisis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità* **40**(1):57-63.
- Däubener W, Pilz K, Seghrouchni Zennati S, Bilzer T, Fischer HG, Hadding U. 1993. Induction of toxoplasmostasis in a human glioblastoma by interferon gamma. *J Neuroimmunol.* **43**(1-2):31-38.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.* **11**: 569-588.
- Dubey JP. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* **28**(7):1019-24.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* **11**(2):267-99.
- Dubey JP. 2002. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J Parasitol.* **88**(4):713-7.
- Dubey JP. 2004. Toxoplasmosis -a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* **126**: 57-72.
- Dubey JP. 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press. 2nd Edition. USA.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* **353**: 1829-1833.

- Estran C, Brenier-Pinchart MP, Pelletier L, Cesbron-Delauw MF, Pelloux H. 2006. *Toxoplasma gondii* in human astrocytes in vitro: interleukin (IL)-12 and IL-10 do not influence cystogenesis. J Parasitol. **92**(5):1108-1110.
- Fadul CE, Channon JY, Kasper LH. 1995. Survival of immunoglobulin G-opsinized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. Infect Immun. **63**(11):4290-4.
- Ferguson DJ. 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. Int J Parasitol. **34**(3):347-60.
- Galley HF, Webster NR. 2004. Physiology of the endothelium. Br J Anaesth. **93**(1):105-13.
- Gilbert SF. 2003. Developmental Biology. 7^a ed. 641 pp.
- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. **6**(1):41-61.
- Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. 1989. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. J Clin Microbiol. **27**: 2031-2038.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. **52**(11):2745-56.
- Kafsack BF, Carruthers VB, Pineda FJ. 2007. Kinetic modeling of *Toxoplasma gondii* invasion. J Theor Biol. **249**(4):817-25.
- Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D. 2004. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. Int J Parasitol. **34**(3):401-9.
- Khan A, Miller N, Roos DS, Dubey JP, Ajzenberg D, Dardé ML, Ajioka JW, Rosenthal B, Sibley LD. 2011. A monomorphic haplotype of chromosome 1a is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. MBio. **2**(6): 228-11.

- Kim K. 2004. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Trop.* **91**:69–81.
- Kristoffersen EK, Ulvestad E, Vedeler CA, Matre R. 1990. Fcg receptor heterogeneity in the human placenta. *J Immunol.* **31**: 561-564.
- Lang C, Gross U, Lüder CG. 2007. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* **100**(2):191-203.
- Laliberté J, Carruthers VB. 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* 65:1900-1915.
- Lavine MD, Arrizabalaga G. 2009. Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. *Mol Biochem Parasitol.* **164**(1):95-9.
- Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML. 1999. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol.* **7**(4):239-46.
- Martins-Duarte ES, Lemgruber L, de Souza W, Vommaro RC. 2010. *Toxoplasma gondii*: fluconazole and itraconazole activity against toxoplasmosis in a murine model. *Exp Parasitol.* **124**(4):466-9.
- Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. 2009. Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)? *Clin Develop Immunol.* **2009**: 374696.
- Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 39(1):23-39.
- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 363: 1965-1976.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci.* **108**: 2457-2464.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev.* **240**(1):269-85.
- Neyer LE, Grüng G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* **65**: 1675-1682.

- Pelloux H, Ricard J, Nissou MF, Renversez JC, Vuillez JP, Meunier A, Ambroise-Thomas P. 1994. Infection with *Toxoplasma gondii* does not Alter TNFalpha and IL-6 Secretion by A human Astrocytoma Cell Line. *Mediators Inflamm.* **3**(4):291-5.
- Pelloux H, Pernod G, Polack B, Coursange E, Ricard J, Verna JM, Ambroise-Thomas P. 1996. Influence of cytokines on *Toxoplasma gondii* growth in human astrocytoma-derived cells. *Parasitol Res.* **82**(7):598-603.
- Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. 1996. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun.* **64**: 897-904.
- Roopenian DC, Akilesh S. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Rev.* **8**: 715-725.
- Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A, Rahmah N. 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop Biomed.* **27**(1):125-30.
- Saeij JPJ, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. 2005. Bioluminescence Imaging of *Toxoplasma gondii* Infection in Living Mice Reveals Dramatic Differences between Strains. *Infec Immun.* **73**(2):695-702.
- Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. 1999. Dynamics of immunoglobulins at the feto–maternal interface. *Rev Reprod.* **4**: 81–89.
- Simister NE, Story CM. 1997. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol.* **37**: 1-23.
- Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **364**(1530):2749-61.
- Su C, Zhang X, Dubey JP. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol.* **36**(7):841-8.

- Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. 2005. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. Clin Microbiol Infect. **11**(3):170-6.
- Takizawa T, Anderson CL, Robinson JM. 2005. A novel FcgR-defined, IgG-containing organelle in placental endothelium. J Immunol. **175**: 2331–2339.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 30(12-13):1217-58.
- Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. 2002. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. Microvasc Res. **64**(3):384-97.
- Wang Y, Zhao S. 2010. Vascular Biology of the Placenta. Granger DN, Granger JP (eds). Morgan & Claypool Life Sciences series. 98 pp.
- Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS, Choi WY. 1991. Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. Korean J Parasitol. **29**(2):121-8.

APÉNDICE DE SOLUCIONES

1. Medio de cultivo M199, incompleto.

- Pesar 1.98g de medio M199, 0.44g de NaHCO_3 , 0.0724g de L-glutamina, 0.594g de HEPES.
- Disolver en agua inyectable.
- Adicionar 100 μL de heparina.
- Ajustar a pH= 7.2.
- Llevar a 200mL con agua inyectable.
- Filtrar con filtro de perinola de 0.20 μm .
- Guardar a 4°C.

2. Factor de Crecimiento endotelial (FCE).

- Hidratar 75mg de FCE en 7.5ml de agua inyectable.
- Hacer fracciones de 400 μL .
- Almacenar en congelamiento a -20°C hasta su uso.

3. HEPES 20x

- Pesar 88g de NaCl.
- Pesar 3,3g de KCl.
- Pesar 26.18 de HEPES.
- Pesar 22g de glucosa.
- Disolver en agua inyectable.
- Ajustar a pH=7.4.
- Aforar a 500mL y esterilizar en autoclave.
- Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: si no se esteriliza de inmediato debe refrigerarse, para evitar contaminación por la glucosa que contiene.

4. HEPES 1x

- Tomar 2.6mL de HEPES 20x

- Llevar a 50mL con agua inyectable.
 - Almacenar a temperatura ambiente.
5. Solución salina balanceada de Hanks' 1x
- Tomar 5mL de la solución salina balanceada de Hanks' 10x.
 - Llevar a 50mL con agua inyectable.
 - Almacenar a temperatura ambiente.
6. Solución de tripsina 0.05%
- Tomar 10mL de la solución de tripsina 0.25%
 - Llevar a 50mL con HEPES 1x.
 - Almacenar en congelamiento a -20°C hasta su uso.
7. Medio de cultivo M199, completo.
- Agregar 10mL de Suero Fetal de Bovino de complementado (SFB).
 - Añadir 500µL de la mezcla de antibióticos/antimicóticos 1x, compuesta por penicilina G sódica (100 UI/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (0.25 µg/mL).
 - Adicionar 200µL (40µg/mL) de Factor de Crecimiento Endotelial (FCE).
 - Llevar a 50mL con medio M199 incompleto.
8. Medio de transporte/paro.
- Agregar 2.5mL de SFB.
 - Añadir 500µL de antibióticos/antimicóticos 1x.
 - Llevar a 50mL con medio M199 incompleto.
9. Medio de invasión.
- Agregar 1mL de Suero Fetal de Bovino (SFB).
 - Llevar a 20mL con medio M199 incompleto.
10. Solución de colagenasa 0.02%.

- Pesar 9mg de colagenasa.
- Disolver en 45mL de HEPES 1x.
- Filtrar con filtro de perinola de 0.20µm.
- Hacer fracciones de 15mL.
- Almacenar en congelamiento a -20°C hasta su uso.

11. Medio de cultivo MCDB 131.

- Pesar 0.0731g de L-glutamina.
- Disolver en 10mL de medio MCDB 131.
- Filtrar con filtro de pirinola de 0.20µm.
- Agregar 5mL de SFB.
- Añadir 500µL de antibióticos/antimicóticos 1x.
- Adicionar 100µL de Factor de Crecimiento Endotelial (FCE).
- Llevar a 50mL con medio MCDB 131.
- Agregar 1µL (1µg/mL) de Hidrocortisona.