



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

“Efecto *in vitro* de la dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ANGÉLICA LUNA NOPHAL

TUTOR PRINCIPAL

JORGE MORALES MONTOR

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

SAÉ MUÑÍZ HERNÁNDEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

KAREN ELIZABETH NAVA CASTRO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

CD.MX. Junio, 2016



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.

ACADÉMICOS

- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México
- ❖ A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- ❖ Al programa de posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal
- ❖ Al Instituto de Investigaciones Biomédicas
- ❖ Al Instituto Nacional de Cancerología
- ❖ A mi tutor principal el Dr. Jorge Morales Montor
- ❖ A mi comité tutor: La Dra. Saé Muñiz Hernández y la Dra. Karen Elizabeth Nava Castro
- ❖ A la M. en C. Bertha Vanessa Izquierdo Sánchez
- ❖ Al Dr. Pedro Ostoia Saloma
- ❖ Al técnico académico titular M. en C. Ricardo Hernández Ávila
- ❖ A la Dra. Mariana Días Zaragoza
- ❖ A mis compañeros de laboratorio
- ❖ A la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., por su apoyo y asesoría.

APOYOS FINANCIEROS

- ❖ Durante el desarrollo de esta tesis se contó con de la beca de maestría número 300434, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

- ❖ Para la realización del presente proyecto, se agradece el apoyo financiero del donativo No. 176803 obtenido del Programa de Fondos Sectoriales Ciencia Básica (CB-SEP-CONACyT); y el donativo IN-208715 otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, ambos donativos otorgados al Dr. Jorge Morales Montor, Tutor principal de la presente Tesis.

RESUMEN

La toxoplasmosis es una zoonosis provocada por el protozoario *Toxoplasma gondii*; en personas inmunocomprometidas ocasiona algunas patologías como calcificaciones intracraneales, linfopatía, encefalitis e incluso la muerte. Durante el embarazo, el parásito puede atravesar la placenta e infectar al feto. Si la infección ocurre en el primer trimestre de embarazo puede inducir el aborto. La terapia estándar para tratar la toxoplasmosis es la combinación pirimetamina-sulfadiazina; la cual es administrada junto con un complemento de ácido fólico, debido a los efectos adversos de dicha combinación. Diferentes estudios han mostrado que el tratamiento convencional presenta una eficacia limitada y efectos adversos; por lo que resulta importante la búsqueda de tratamientos alternativos que muestren mayor eficacia y carezcan efectos adversos. En ese sentido se ha propuesto el empleo de moléculas endógenas del hospedero, entre otras se encuentran los esteroides sexuales. La dehidroepiandrosterona (DHEA) posee una amplia gama de funciones en el organismo que son dependientes de su concentración. En el presente estudio se evaluó *in vitro* el efecto parasiticida de la DHEA sobre el taquizoíto de *T. gondii*. De acuerdo a los datos obtenidos, se encontró que la DHEA afecta el proceso de invasión mientras que la sulfadiazina-pirimetamina afecta el proceso de proliferación intracelular. En cuanto al perfil proteómico de taquizoítos tratados con 10 μ M de DHEA y con DHEA 10 μ M/S-P 800 μ M, mostró un menor número de spots comparados con taquizoítos no tratados. Además encontramos que la expresión proteica de los tk's disminuye con respecto al tiempo y de manera independiente al tratamiento. A nivel ultraestructural todos los tratamientos modifican la morfología del parásito; sin embargo, los cambios son mayormente evidentes al utilizar DHEA/S-P. Por lo anterior, sugerimos que la DHEA podría ser una alternativa para el tratamiento de toxoplasmosis y probablemente resulte más eficaz si se combina con el tratamiento convencional.

Palabras clave: Toxoplasmosis, DHEA, proteoma, taquizoíto, *Toxoplasma gondii*, invasión y proliferación.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*; in immunocompromised causes some diseases such as intracranial calcifications, linfopatia, encephalitis and even death. During pregnancy, the parasite can cross the placenta and infect the fetus. If the infection occurs in the first trimester of pregnancy can induce abortion. Standard therapy for treating toxoplasmosis is pyrimethamine-sulfadiazine combination; which it is administered along with a folic acid supplement due to the adverse effects of such combination. Studies have shown that conventional treatment has limited effectiveness and adverse effects; so it is important to search for alternative treatments that show greater efficacy and lack adverse effects. In this regard it has been proposed to use endogenous host molecules, among others are sex steroids. Dehydroepiandrosterone (DHEA) has a wide range of functions in the body that are dependent on their concentration. This study assessed the in vitro parasiticidal effect of DHEA on tachyzoite *T. gondii*. According to the data obtained, it was found that DHEA affects the invasion process while sulfadiazine pyrimethamine affect intracellular proliferation process. As for the proteomic profile of tachyzoites treated with 10 μM of DHEA and DHEA 10 μM / 800 μM S-P, he showed a greater number of spots compared to untreated tachyzoites. We also found that the protein expression of tk's decreases with time and treatment independently. At the ultrastructural level all treatments modify the morphology of the parasite; however, the changes are mostly evident when using DHEA / S-P. Therefore, we suggest that DHEA may be an alternative for the treatment of toxoplasmosis and probably more effective when combined with conventional treatment.

Key words: Toxoplasmosis, DHEA, proteome, tachyzoite, *Toxoplasma gondii*, invasion and proliferation.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
I.1. Generalidades de <i>Toxoplasma gondii</i>	1
I.1.1. Ciclo de vida	1
I.1.1.a. Ciclo sexual	1
I.1.1.b. Ciclo asexual	2
I.2. Formas infectivas de <i>T. gondii</i>	3
I.2.1. Esporozoíto	3
I.2.2. Bradizoíto	3
I.2.3. Taquizoíto.	4
I.3. Procesos de Invasión del taquizoíto de <i>T. gondii</i> .	6
I.3.1. Invasión Activa	6
I.3.2. Invasión Pasiva	8
I.4. Toxoplasmosis	9
I.5. Tratamiento convencional de la toxoplasmosis	13
I.5.1 Alternativas terapéuticas contra la toxoplasmosis	16
I.5.2 Dehidroepiandrosterona (DHEA)	18
I.5.3. Usos de la DHEA como parasiticida	21
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVO GENERAL	24
V. OBJETIVOS PARTICULARES	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
VI.1. Cultivo de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	25
VI.2. Ensayos <i>in vitro</i>	25
VI.2.1. Supervivencia de taquizoítos expuestos a la DHEA	25
VI.3. Ensayos <i>ex vivo</i>	26
VI.3.1. Inducción de macrófagos peritoneales en ratones <i>Balb-</i>	26

<i>CanN</i>	
VI.3.2. Activación de macrófagos <i>ex vivo</i>	26
VI.3.3. Invasión y proliferación en macrófagos murinos de taquizoítos pretratados con DHEA	26
VI.3.4. Tinción de contraste	28
VI.3.5. Cultivo de células HEp-2	29
VI.4. Obtención de proteínas totales de taquizoítos de <i>T. gondii</i> expuestos a los diferentes tratamientos.	29
VI.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	29
VI.4.2. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata	30
VI.5. Electroforesis bidimensional: obtención de proteínas totales	31
VI.5.1. Separación por punto isoelectrico	31
VI.5.2. Separación por peso molecular	32
VI.6. Análisis ultraestructural del efecto de la DHEA sobre los taquizoítos extracelulares.	33
VI.7. Análisis estadístico	34
VII. ESQUEMA EXPERIMENTAL	35
VIII. RESULTADOS	36
VIII.1. Efecto de la DHEA sobre taquizoítos extracelulares de <i>T. gondii</i>	36
VIII.2. Taquizoítos pretratados con DHEA no modifican el proceso de invasión pasiva, en cultivos primarios de macrófagos murinos	41
VIII.3. Efecto de la DHEA en la capacidad de proliferación de taquizoítos un cultivos primarios de macrófagos murinos	51
VIII.4. Efecto de la DHEA sobre la capacidad de invasión de los taquizoítos pretratados	51
VIII.5. Efecto de la DHEA sobre la capacidad de proliferación de taquizoítos en monocapas de células HEp-2	56
VIII.6. Modificaciones en el patrón proteico de taquizoítos extracelulares expuestos a la DHEA	65

VIII.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida de una dimensión	65
VIII.6.2. Perfil proteómico por separación de proteínas en doble dimensión	65
VIII.7. Diferencias ultraestructurales de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA	75
IX. DISCUSIÓN	88
X. CONCLUSIONES	95
XI. ABREVIATURAS Y SIGLAS	96
XII. PERSPECTIVAS	97
XIII. REFERENCIAS	98
XIV. ANEXOS	105
XIV.1. Datos individuales utilizados en la elaboración de cada una de las gráficas en todos los ensayos realizados; así como sus desviaciones estándar	105

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tratamientos contra la toxoplasmosis	14
Cuadro 2. Concentraciones normales de DHEA en humanos	20
Cuadro 3. Número de spots obtenidos por extracto de taquizoítos pretratados 30 y 2 horas	68
Cuadro 4. Diferencias en el número de spots de cada uno de los tk's tratados por 30 y 2 horas en comparación con el control	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	2
Figura 2. Formas infectivas de <i>Toxoplasma gondii</i>	4
Figura 3. Morfología del taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
Figura 4. Invasión Activa representada en un eritrocito	7
Figura 5. Representación esquemática del proceso de Invasión Pasiva	9
Figura 6. La seroprevalencia aumenta conforma aumenta la edad de los individuos	10
Figura 7. Seroprevalencia de la toxoplasmosis en México	12
Figura 8. Síntesis de esteroides sexuales a partir de la hormona pregnenolona	18
Figura 9. Síntesis de la Dehidroepiandrosterona (DHEA)	19
Figura 10. Invasión en macrófagos murinos	27
Figura 11. Proliferación en macrófagos murinos	28
Figura 12. Análisis de spots de los geles en 2-D en el programa PDQuest	33
Figura 13. Esquema experimental	35
Figura 14. Curva dosis-respuesta de taquizoítos tratados con DHEA	37
Figura 15. Curva dosis-respuesta de taquizoítos tratados con Sulfadiazina-Pirimetamina	38
Figura 16. Curva dosis-respuesta de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos	39
Figura 17. Curva dosis-respuesta de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos	40
Figura 18. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA	42
Figura 19. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Sulfadiazina-Pirimetamina	43
Figura 20. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos	44

Figura 21. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos	45
Figura 22. Invasión de macrófagos peritoneales	46
Figura 23. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA	47
Figura 24. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con S-P	48
Figura 25. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA/S-P	49
Figura 26. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA/S-P	50
Figura 27. Proliferación de taquizoítos tratados con DHEA en macrófagos peritoneales	52
Figura 28. Proliferación de taquizoítos tratados con Sulfadiazina-Pirimetamina en macrófagos peritoneales	53
Figura 29. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos en macrófagos peritoneales	54
Figura 30. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos macrófagos peritoneales	55
Figura 31. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con DHEA	57
Figura 32. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con S-P	58
Figura 33. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos	59
Figura 34. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos	60
Figura 35. Proliferación de taquizoítos tratados con DHEA en células Hep-2	61
Figura 36. Proliferación de taquizoítos tratados con S-P en células Hep-2	62
Figura 37. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos en células Hep-2	63
Figura 38. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos	64

fármacos en células Hep-2

Figura 39. Perfil proteico del extracto total de tk's tratados en geles al 10%	66
Figura 40. Perfil proteico del extracto total de tk's tratados en geles al 15%	67
Figura 41. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 30 minutos con DHEA	70
Figura 42. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 30 minutos con S-P y DHEA/S-P	71
Figura 43. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 2 horas con DHEA	72
Figura 44. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 2 horas con S-P y DHEA/S-P	73
Figura 45. Diferencias de spots en cada uno de los extractos proteicos de tk's tratados con DHEA, S-P o la combinación de ambos	74
Figura 46. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	76
Figura 47. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	77
Figura 48. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA 10 μM	79
Figura 49. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA 100 μM	80
Figura 50. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA 400 μM	81
Figura 51. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA 600 μM	82
Figura 52. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con S-P 200 μM	83
Figura 53. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con S-P 800 μM	84
Figura 54. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA/S-P 10/600 μM	85
Figura 55. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA/S-P 10/800 μM	85
Figura 56. Morfología de taquizoítos de <i>T. gondii</i> tratados con DHEA/S-P 600/600 μM	86

Figura 57. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA/S-P
600/800 μ M

87

I. INTRODUCCION

I.1. Generalidades de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado, el cual pertenece al phylum *Apicomplexa*. En 1908, los biólogos Charles Nicolle y Louis Manceaux lo identificaron en tejidos del roedor *Ctenodactylus gundi* en el norte de África (Nicolle y Manceaux, 1908). La morfología característica de media luna de la forma móvil del parásito (taquizoíto), con un extremo más agudo que el otro, fue descrita en 1909; concluyendo con sus análisis que se trataba de una especie aún no descrita, por lo que denominaron al nuevo género *Toxoplasma* (toxon = arco y plasma = vida). La especie del género, *gondii* deriva del nombre del roedor donde fue encontrado; siendo la única especie del género *Toxoplasma* (Nicolle y Manceaux, 1909).

I.1.1. *Ciclo de vida*

T. gondii tiene un ciclo de vida facultativo heterogéneo en todos los felinos, incluyendo al gato doméstico, como hospederos definitivos; y todos los animales homeotermos, incluyendo al hombre, como hospederos intermediarios. Presenta dos tipos de replicación, sexual en hospederos definitivos, y asexual en hospederos intermediarios (Figura 1) (Fortier *et al*, 2000).

I.1.1.a. *Ciclo sexual*

El ciclo sexual da inicio cuando algún felino consume una presa previamente infectada con quistes tisulares (Figura 1A). La pared del quiste es digerida por las enzimas proteolíticas en el estómago y en el intestino delgado, la forma parasitaria de bradizoíto es liberada, y ésta penetra las células epiteliales (enterocitos) del intestino delgado del felino, y se inicia el desarrollo de cinco formas morfológicamente diferentes de *T. gondii* (tipos de A-E) previo al inicio de la gametogonia (proceso de formación de las formas sexuales). Los tipos D y E, son las formas que participarán en la gametogonia dando origen a los gametos, las formas sexuales masculina y femenina. Durante el proceso de gametogonia, el microgameto (masculino, forma móvil) fertiliza al macrogameto (femenino) lo que resulta

en la formación del cigoto, quien finalmente dará lugar al ooquiste. A través de las heces de los felinos, los ooquistes son liberados al ambiente de forma no esporulada o inmadura, la cual se considera una forma no infecciosa. Si las condiciones de temperatura y humedad en el ambiente son adecuadas, los ooquistes esporulan dando lugar a la forma infecciosa. 1 ooquiste contiene en su interior ocho esporozoítos (Dubey *et al.*, 1970, Dubey *et al.*, 1998; Galván y Mondragón, 2001).

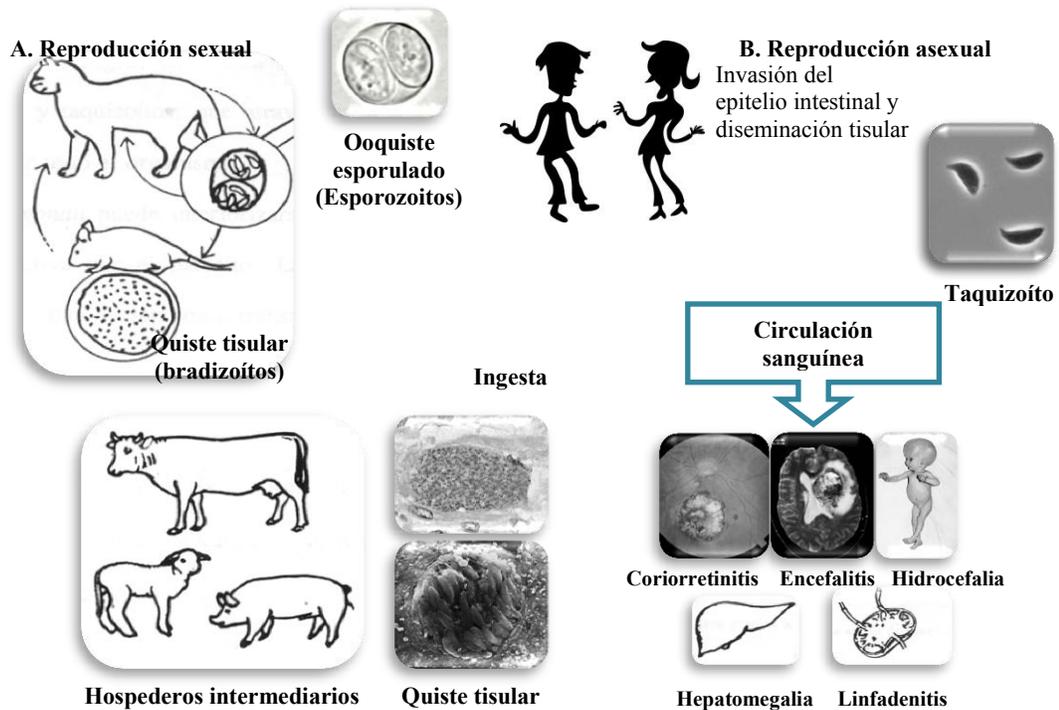


Figura. 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

El ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* se divide en dos partes: **A. Reproducción sexual**, la cual tiene lugar en el hospedero definitivo, dando como resultado la formación de ooquistes inmaduros que son liberados al ambiente. **B. Reproducción asexual**, tiene lugar en los huéspedes intermediarios, al ingerir ooquistes esporulados del ambiente o quistes tisulares de otros hospederos intermediarios, los esporozoítos y/o bradiazóitos se diferencian en taquizoítos, los cuales replican y se diseminan por todo el organismo pudiendo desencadenar diferentes patologías (modificada de Muñiz y Mondragón, 2009).

1.1.1.b. Ciclo asexual

El ciclo de replicación asexual inicia cuando algún hospedero intermediario ingiere ooquistes maduros libres en el ambiente o quistes tisulares presentes en tejidos de animales

previamente infectados (Figura 1B). De manera similar a lo que ocurre en el ciclo sexual, las formas infectivas, esporozoitos y/o bradizoítos, son liberadas a partir de sus quistes por acción de las enzimas digestivas; ya en el tracto intestinal se diferencian rápidamente a la forma móvil y altamente invasiva, el taquizoíto. El taquizoíto invade el epitelio intestinal, atraviesa la lámina propia y llega al torrente sanguíneo y linfático, a partir del cual se disemina y es capaz de infectar prácticamente todos los órganos, incluyendo aquellos que se encuentran en sitios inmunológicamente privilegiados, por ejemplo, la barrera hematoencefálica y la placentaria (Galván y Mondragón, 2001; Muñiz y Mondragón, 2009).

I.2. Formas infectivas de *T. gondii*.

Toxoplasma presenta tres formas infectivas, las cuales se desarrollan dependiendo de la etapa del ciclo de vida: 1) el taquizoíto (forma móvil e invasiva), 2) el bradizoíto (forma de lenta replicación que se encuentra en el quiste tisular) y 3) el esporozoíto (forma quiescente presente en el ooquiste) (Figura 2). Cada una de las formas parasitarias posee características , tanto desde el punto de vista estructural como del bioquímico. Las tres formas son infecciosas para cualquiera de sus hospederos y la infección se puede presentar entre hospederos intermediarios, definitivos o ambos (Dubey 2010)

I.2.1. Esporozoíto.

La forma del esporozoíto está contenida en el ooquiste, que son expulsados a través de las heces de los felinos en forma no esporulada. Se considera una forma latente, resistente a la mayoría de las condiciones medio ambientales, como son temperatura, humedad, pH del suelo, salinidad, entre otras. Cuando el ooquiste inmaduro esporula, el esporozoíto se convierte en una forma infectiva (Figura 2A) (Galván y Mondragón, 2001; Hill y Dubey, 2002).

I.2.2. Bradizoíto.

Es la forma de lenta replicación, se encuentra dentro de los quistes tisulares durante la infección crónica del hospedero intermediario. El tamaño de los quistes tisulares varía de 10 a 100 μm y contener en su interior miles de bradizoítos (Figura 2B) (Derouin *et al.*,

1987). El quiste tisular no es reconocido por el sistema inmune del hospedero; al ser una forma silente, y al permanecer toda la vida del individuo, sin emerger y desarrollar signos. Si el sistema inmune del individuo se suprime, el bradizoíto puede emerger rápidamente, diferenciándose a taquizoíto, pudiendo desencadenar algunos cuadros clínicos (Galván y Mondragón, 2001; Muñiz y Mondragón, 2009).

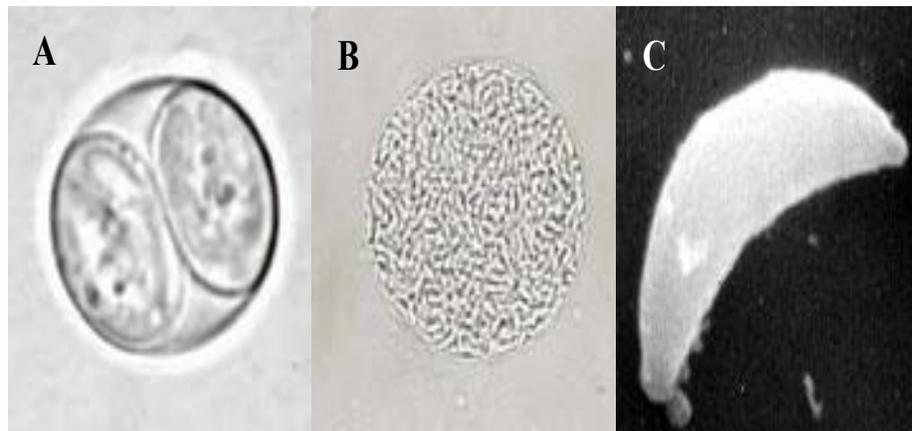


Figura 2. Formas infectivas de *Toxoplasma gondii*.

A. Ooquiste, conteniendo 4 esporozoítos, forma latente presente en el medio ambiente, **B.** Quiste tisular, en su interior contiene cientos de bradizoítos, forma latente en tejidos animales. **C.** Taquizoíto, forma móvil altamente invasiva (tomada de Muñiz-Hernández, 2009).

1.2.3. Taquizoíto.

El taquizoíto es la forma móvil, asexual infectiva, altamente invasiva y estrictamente intracelular, tiene un tamaño aproximado de 3 x 7 μm (Figura 2C) (Muñiz y Mondragón, 2009). La forma del taquizoíto es muy sensible a las condiciones del ambiente y mueren rápidamente fuera de sus células hospederas (Dubey y Beattie, 1988; Dubey et al., 1998). En la morfología del parásito es claramente distinguible un extremo apical (Ap) y un extremo posterior (Pp) (Figura 3A). En el extremo apical se localizan tres organelos principales, el conoide (c), las roptrías (r) y los micronemos (mn). El taquizoíto posee un núcleo (n), retículo endoplásmico (re), mitocondria (mt), y aparato de Golgi (Figura 3A). Además tiene dos organelos especializados propios del phylum, el apicoplasto y el acidocalciosoma. El cuerpo del taquizoíto se encuentra rodeado por un complejo de tres membranas, conocido como películo (p), conformado en la parte más externa por la

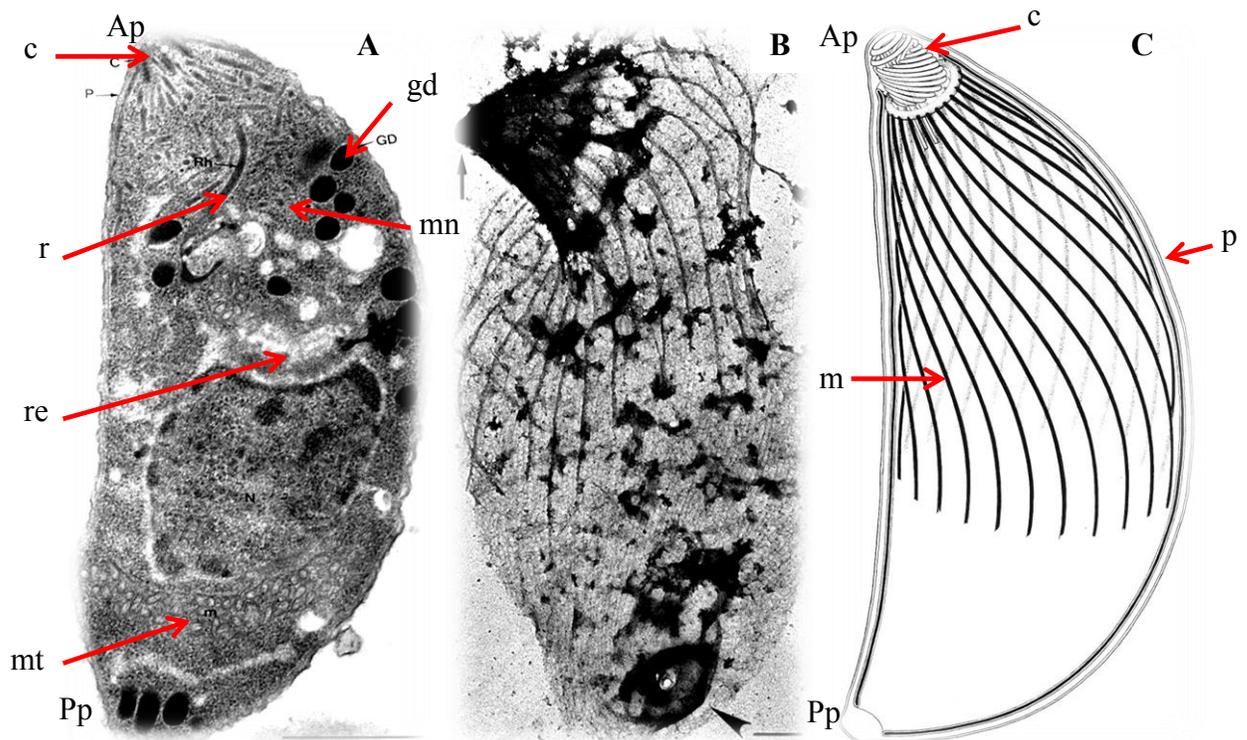


Figura 3. Morfología del taquizoito de *Toxoplasma gondii*.

A. Micrografía de corte fino, mostrando en su interior los diferentes organelos del parásito (tomada de Muñiz-Hernández, 2009) **B.** Micrografía del citoesqueleto de actina-miosina y la red subpelicular por la técnica de tinción negativa (tomada de Patrón et al; 2005) **C.** Esquema de la estructura de microtúbulos del parásito y sus membranas (tomada de Nichols and Chiapino, 1987). Conoide (c), gránulos densos (gd), micronemos (mn), roptrias (r), retículo endoplasmico (re), núcleo (n) y mitocondria (mt), extremo apical (Ap), peliculo (p), conoide (c), microtubulos (m) y extremo posterior (Pp).

membrana plasmática, que recubre completamente el cuerpo del parásito; y por debajo de ésta se encuentra el complejo membranal interno (CMI), el cual está compuesto por una doble membrana, interrumpida tanto en el extremo apical como en el extremo posterior (Muñiz y Mondragón, 2009). El citoesqueleto lo componen 22 microtúbulos (m) que están anclados al anillo polar anterior, por de debajo del conoide, los cuales recorren 2/3 partes del cuerpo del parásito (Nichols y Chiappino, 1987). Entre las dos membranas del CMI se localiza una red subpelicular, formada por actina y proteínas asociadas a actina, como profilina y miosina, principalmente (Figura 3B) (Patrón et al., 2005). El conoide, se encuentra en la región apical del taquizoito, es un organelo retráctil constituido por

subunidades de α -tubulina, que característicamente presentan una espiral en sentido contrario a las manecillas del reloj. El conoide es fundamental en el proceso de invasión debido a que se proyecta contra la membrana plasmática de la célula hospedera para sensar el sitio de entrada y permitir su internalización (Figura 3C) (Nichols y Chiappino, 1987; Smith, 1995).

I.3. Procesos de Invasión del taquizoíto de *T. gondii*.

El taquizoíto de toxoplasma es la forma parasitaria que se encarga de la diseminación tisular en el organismo hospedero, carece de órganos de locomoción; sin embargo, posee un citoesqueleto de actina-miosina en el cual se apoya para realizar una serie movimientos giratorios sobre su superficie celular (Galván y Mondragón, 2001). Es capaz de invadir células tanto fagocíticas como no fagocíticas. Por lo cual exhibe dos mecanismos diferentes de invasión.

I.3.1. Invasión Activa.

El proceso de invasión activa (Figura 4) involucra la participación de los organelos secretores propios del parásito. En este proceso la célula efectora es el propio parásito, es un proceso rápido que puede completarse en un tiempo de 25 a 40 seg (Morisaki *et al.*, 1995).

El proceso de penetración activa comprende las siguientes fases:

1. **Reconocimiento y Adhesión**, el taquizoíto entra en contacto con la membrana plasmática de la célula hospedera, libera el contenido de los micronemos, que en su mayoría son proteínas de tipo adhesina, permitiendo el deslizamiento del parásito y extruyendo el conoide presionándolo sobre la membrana celular y, sensando el sitio de entrada a la célula (Figura 4A-B).
2. **Internalización**, inicia cuando el parásito vacía el contenido de las roptrías sobre la membrana plasmática de la célula, desestabilizándola. Las proteínas de roptrías forman un sello entre ambas membranas (célula-parásito), y el parásito constriñe su

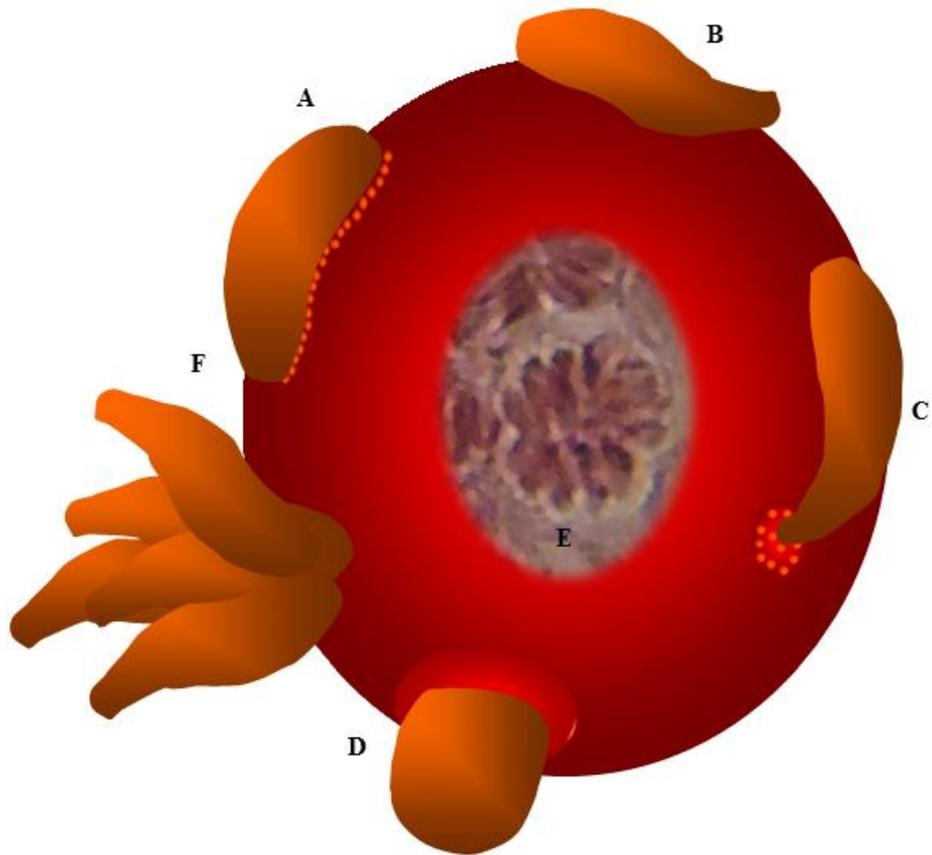


Figura 4. Invasión Activa representada en un eritrocito.

Pasos de la invasión activa. **A.** Adhesión, **B.** Deslizamiento, **C.** Extrusión del conoide, **D.** Internalización, **E.** Replicación. **F.** Lisis de la célula hospedera (modificada de Muñiz-Hernández, 2009).

cuerpo conforme se internaliza mediante un movimiento tipo tornillo, secretando el contenido de los gránulos densos para formar la VP (Figura 4C-D).

3. **Replicación**, la VP se forma por componentes tanto de la célula hospedera como del parásito, esto la modifica y la convierte en un nicho idóneo para su replicación. El taquizoíto intracelular se multiplica asexualmente por medio de un proceso llamado endodiogenia (Figura 4E).
4. **Exteriorización**. Después de varios ciclos de replicación intracelular el parásito sale de su célula hospedera, mediante un proceso que comprende prácticamente las mismas fases que la invasión, pero a la inversa (Figura 4F). La extrusión de los taquizoítos ocasiona la lisis de sus células hospederas, los parásitos salen en forma

activa y pueden invadir inmediatamente otra célula hospedera en el microambiente inmediato.

La endodiogenia es un proceso mediante el cual una célula madre da origen en su interior a dos células hijas; diferentes estudios han mostrado que el tiempo de replicación *in vitro* comprende aproximadamente 6 – 8 horas (Black y Boothroyd, 2000).

I.3.2. Invasión Pasiva

La invasión pasiva se lleva a cabo en todas las células fagocíticas, en este proceso la célula fagocítica actúa como efectora (Figura 5A El parásito adherido a una célula activa, es rodeado por elongaciones de la membrana plasmática de la propia célula (Figura 5B) y es internalizado en una vacuola fagocítica hacia el citoplasma celular. El parásito no se reorienta y el proceso es lento (2-4 min) comparado con la invasión activa (25-40 seg) (Morisaki et al., 1995).

A la fecha se desconoce la forma en que el parásito evade la fusión lisosomal dentro de la célula fagocítica, para de esta manera evitar ser degradado (Black y Boothroyd, 2000, Galván y Mondragón, 2001). Existen dos hipótesis que explican como el parásito evita la fusión con los lisosomas; la primera sugiere que cuando el parásito se encuentra en el fagosoma, el taquizoíto libera el contenido de organelos propios lo que modifica el fagosoma convirtiéndolo en su vacuola parasitófora (Figura 5C). La segunda hipótesis plantea que el parásito escapa del fagosoma y forma *de novo* su propia VP. Independientemente del mecanismo de evasión, el parásito una vez que se establece dentro de su VP prolifera exitosamente (Figura 5E). Después de varios ciclos de replicación, emerge de manera activa, destruyendo a su célula hospedera y con la capacidad de invadir nuevas células (Figura 5F).

Una característica notable del proceso de replicación y de forma independiente del mecanismo a través del cual entra a su célula, el taquizoíto de toxoplasma nunca está en contacto con el contenido citoplásmico.

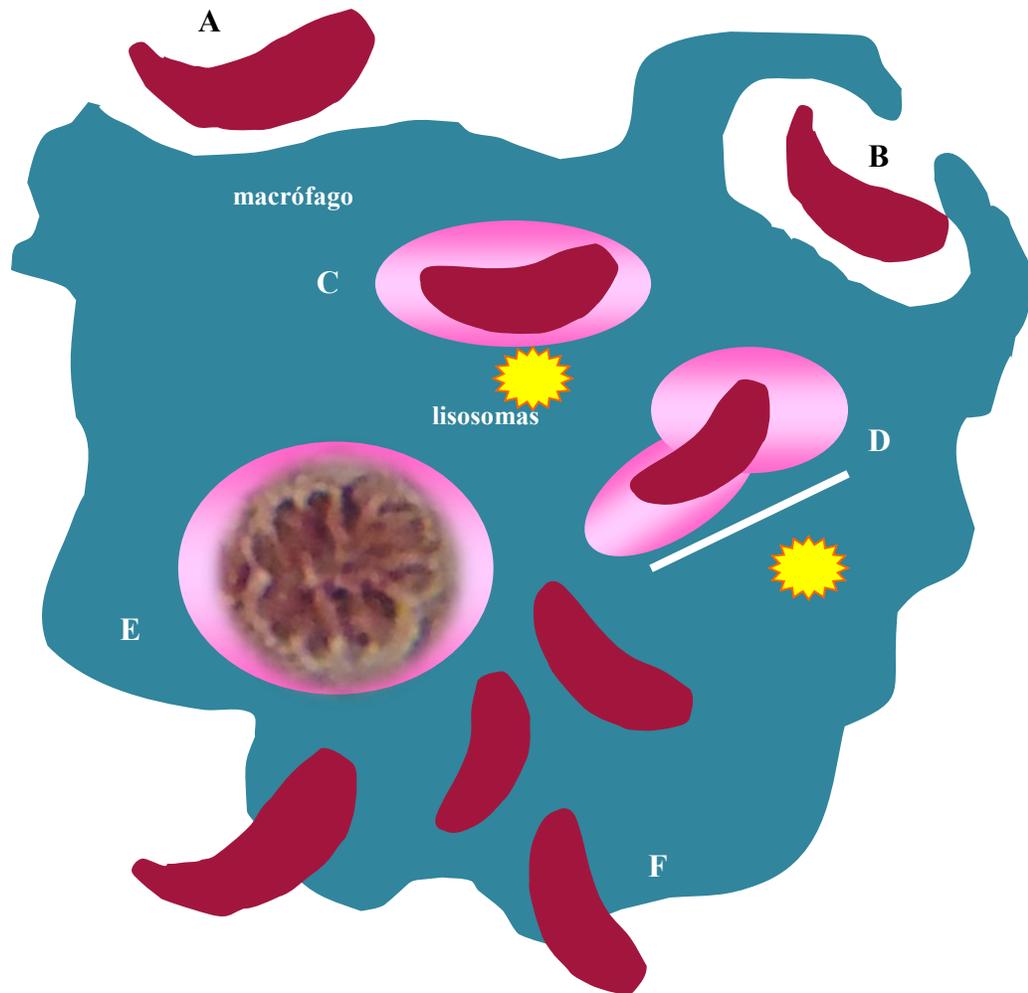


Figura 5. Representación esquemática del proceso de Invasión Pasiva.

El proceso pasivo se lleva a cabo en células fagocíticas mediante la maquinaria propia de la célula. A. Adhesión. B. Internalización por medio de elongaciones citoplásmicas. C. Modificación de vacuola fagosomal. D. Formación de vacuola parasitófora *de novo*. E. Replicación. F. Externalización. (Luna-Nophal, 2016).

I.4. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una zoonosis, provocada por el parásito *T. gondii*, que puede afectar a todos los animales de homeotermos, como son las aves y los mamíferos, incluyendo el hombre (Suárez-Hernández et al., 2005; Ferguson, 2009). Esta zoonosis tiene una prevalencia a nivel mundial del 30-50%; sin embargo, pueden observarse variaciones tanto entre regiones como entre países (Muñiz y Mondragón, 2009). Estudios

epidemiológicos han reportado, que mientras para Europa la prevalencia va de un 9 hasta un 67%, en países asiáticos se muestran prevalencias mucho menores. En general, Corea tiene una tasa de prevalencia del 0.8% y Vietnam del 11.2%. En el continente Americano, Brasil y Cuba reportan las tasas más altas de prevalencia en mujeres embarazadas, 74.5% y 70.9%, respectivamente (Muñiz y Mondragón, 2009). En la provincia de Ciego de Ávila, Cuba, la seroprevalencia en personas con su sistema inmune competente está reportado en 24% (Suárez-Hernández et al., 2005). En la Cd. Río Cuarto, Argentina, la seroprevalencia reportada es en promedio del 51.75% en niños de 0 - 15 años de edad (Chiaretta *et al.*, 2003).

Un estudio realizado en Estados Unidos sugiere que la seroprevalencia de la toxoplasmosis aumenta de manera proporcional a la edad de los individuos (>70 años, 40 a 46%), además no muestra diferencia significativa con respecto al género (Figura 6) (Jones et al., 2001).

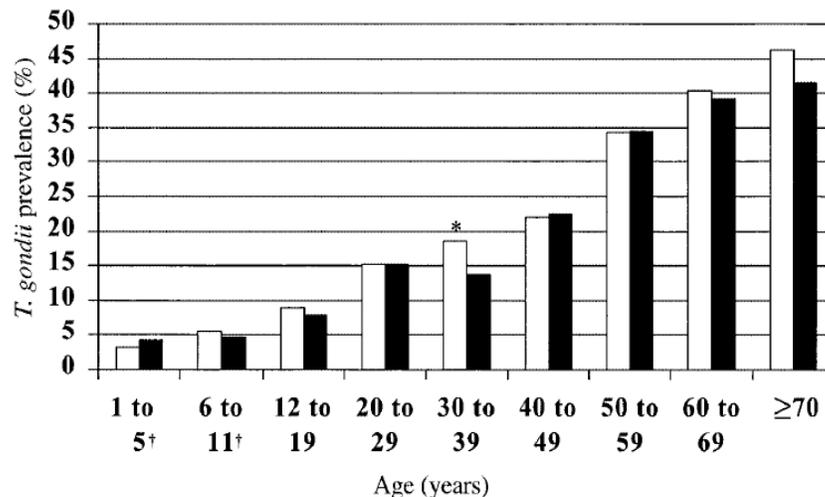


Figura 6. La seroprevalencia aumenta conforma aumenta la edad de los individuos.

En 2001 un estudio pone de manifiesto que la seroprevalencia aumenta con la edad de los individuos y que no existe diferencia significativa entre géneros. Barra blanca: hombres. Barra negra: mujeres (tomado de Jones *et al.*; 2001).

Debido a que la toxoplasmosis en México es una enfermedad subestimada, no se llevan a cabo estudios de forma periódica para tener conocimiento de su estatus y distribución en el país. En 1992, un estudio realizado con muestras y datos obtenidos de la encuesta nacional de salud pública, reportó la seroprevalencia por estado. Los estados con mayor seroprevalencia, entre 30 – 65%, fueron Tabasco, Veracruz y Campeche, todos estos en la franja costera. Mientras que estados de la región norte del país como Sonora, Coahuila y Durango, mostraron prevalencias por debajo del 13% (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992). Dos décadas después, un estudio comparativo reportó un aumento del 32% en la seroprevalencia en el periodo comprendido de 1987 a 2006 (Figura 7) (Caballero-Ortega *et al.*, 2012). En el 2005 utilizando un banco de muestras de recién nacidos, se midieron niveles de anticuerpos anti-*Toxoplasma* y encontraron una frecuencia de 2/1,000 recién nacidos que presentan infección congénita; los datos obtenidos reflejan el grado de prevalencia existente en la zona metropolitana y conurbada del Distrito Federal y Estados incluidos en la Red de Hospitales de Pediatría de México (Vela-Amieva, *et al.*, 2005).

La toxoplasmosis humana se considera una enfermedad asintomática en personas que tienen su sistema inmune competente; aunque esporádicamente se presentan algunos como son adenopatías, fiebre y oftalmopatías (Suárez-Hernández *et al.*, 2005), las cuales pueden llevar a un diagnóstico erróneo. Sin embargo, en personas con su sistema inmune comprometido, como lo portadores del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y/o los que están bajo terapias inmunosupresivas (por trasplantes de órganos o cáncer), se desarrollan diversas lesiones, como linfadenopatías, cefaleas, miocarditis, hepatitis; y en casos severos de infección pueden conducir a la muerte (Muñiz y Mondragón, 2009). *T. gondii* tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria e infectar al feto, desarrollándose así un cuadro de toxoplasmosis congénita (OZ, 2014). Dependiendo del tercio de gestación del embarazo, la infección por toxoplasma puede causar en el feto hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones intracraneales, sordera, daños en la retina (coriorretinitis), retraso mental o muerte neonatal (Rosso *et al.*, 2007; Muñiz y Mondragón, 2009). En un estudio se sugirió que las infecciones con este parásito en etapas tempranas del desarrollo fetal inducen cambios conductuales, que se presentan hasta 30 años después

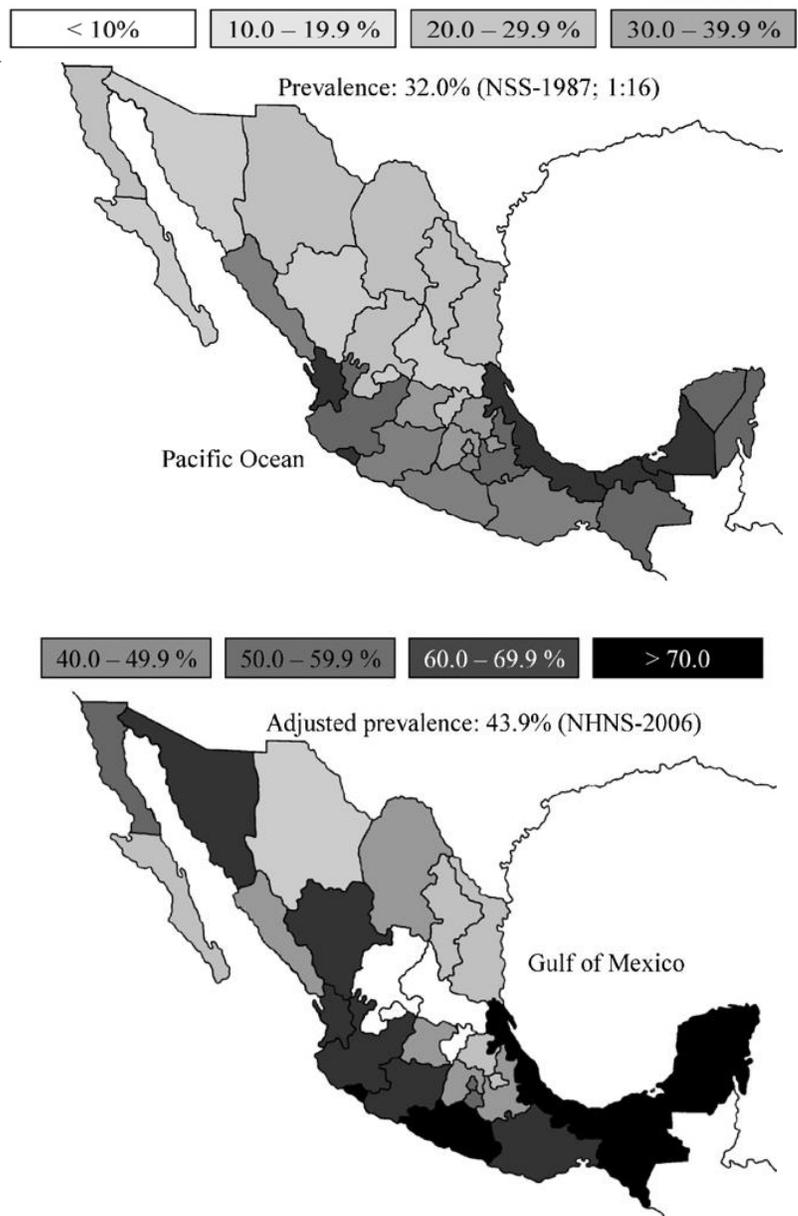


Figura 7. Seroprevalencia de la toxoplasmosis en México.

El último estudio de seroprevalencia en México fue realizado a partir de la encuesta nacional de salud del 2000 y de la encuesta nacional de salud y nutrición del 2006, en donde la seroprevalencia a nivel nacional tuvo un incremento en promedio del de 32% a 43.9%; comparado con el año de 1992, mostrando variaciones entre estados (Tomado de Caballero-Ortega *et al*; 2012).

(Costa da Silva y Langoni, 2009). Si la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo puede inducir aborto (Rosso et al., 2007).

La toxoplasmosis humana presenta dos fases la aguda y la crónica. La fase aguda de la toxoplasmosis se caracteriza por la diseminación de la forma de taquizoíto y su replicación dentro de las células nucleadas en cualquier tejido del hospedero, la replicación del parásito conduce a una muerte celular y una rápida invasión de células adyacentes; además de generar una respuesta inmunológica (Black y Boothroyd, 2000). Los taquizoítos se diferencian en bradizoítos, con lo cual comienza la formación de quistes tisulares que aparecen de 7 a 10 días post infección (Galván y Mondragón, 2001). El desarrollo de quistes en los tejidos a través del tiempo es lo que define la forma de infección crónica, el quiste tisular puede permanecer de por vida en el hospedero sin que en este se desarrolle alguna patología (Black y Boothroyd, 2000).

I.5. Tratamiento convencional de la toxoplasmosis

Los medicamentos empleados en el tratamiento de la toxoplasmosis incluyen a la pirimetamina (un antipalúdico) y a la sulfadiazina (un antibiótico), ésta es una enfermedad que no requiere de medidas de aislamiento especial para el manejo de los pacientes. La terapia combinada de sulfadiazina con pirimetamina fue establecida a principios de los 50's y desde entonces poco o nada se ha avanzado sobre el tratamiento de la toxoplasmosis (Eyles and Coleman, 1953; Eyles and Coleman, 1955). La espiramicina es otro fármaco que posee un efecto importante sobre el parásito, este es administrado profilácticamente en mujeres durante el embarazo; debido a que no es teratogénico y no cruza la placenta, por lo que al ser administrado en una mujer embarazada con diagnóstico de toxoplasmosis reduce el riesgo de transmisión de la madre al feto (Rosso et al, 2007). A pesar de los avances en el área de la farmacología, esas tres drogas continúan siendo consideradas como el estándar en el tratamiento de la toxoplasmosis (Hill y Dubey, 2002).

El descubrimiento de la actividad antitoxoplásmica de la clindamicina llevó a considerarla otro medicamento para tratar la infección, especialmente en pacientes alérgicos a las sulfamidas (Dubey, 2008). Se sabe que la sulfadiazina y la pirimetamina presentan un modo de acción sinérgico; sin embargo, presentan diversos efectos adversos

(Rosso et al., 2007). La pirimetamina, es inhibidor del ácido fólico y depresor de la médula ósea por lo que puede ocasionar aplasia medular, plaquetopenia, neutropenia y anemia megaloblástica; debido a esto la terapia se suplementa con ácido fólico; por otro lado, la sulfadiazina induce reacciones alérgicas hasta en un 20% de la población (Caumes, 1995; Wei *et al.*, 2015).

Los fármacos que actualmente se utilizan como tratamiento anti-toxoplásmico, están dirigidas contra una de las formas infectivas, el taquizoíto en estado extracelular, por lo que una vez que se internaliza en su célula hospedera y se localiza en la vacuola parasitófora, dichos fármacos no tienen efecto parasiticida. En la Cuadro 1 se enumeran algunos de los tratamientos empleados para tratar la toxoplasmosis, lo que depende de condiciones específicas, como por ejemplo, el estado de inmunosupresión del individuo, la edad y la sensibilidad a los fármacos (Rosso et al., 2007).

Las desventajas que presenta el tratamiento actual contra la toxoplasmosis, ha propiciado la búsqueda de fármacos o moléculas alternativas que muestren mayor eficacia y presenten menores o nulos efectos adversos.

Cuadro 1. Tratamientos contra la toxoplasmosis

Diferentes fármacos empleados para tratar la toxoplasmosis y su esquema de administración dependiendo de condiciones específicas de inmunosupresión.

Condición	Fármaco	Dosis	Duración
Embarazada infectada en las primeras 18 semanas	Espiramicina	1 g c/8 h no dar con comidas	Todo el embarazo
Embarazadas con infección fetal después de la semana 18 y en las gestantes infectadas después de la semana 24	Pirimetamina	50 mg c/12 h/2 días 50 mg/24 h	Hasta el parto
	Sulfadiazina	37.5 mg/kg c/12 h/2 días 50 mg c/12 h 2g c/12 h	Hasta el parto
	Ácido fólico	10-20 mg c/24 h	Durante y por una semana después de la terapia de pirimetamina
Recién nacido con infección congénita sintomática	Pirimetamina	2 mg/kg c/24 h/2 días 1 mg/kg c/24 h/2 ó 6 meses 1 mg/kg/ tres veces por sem	1 año
	Sulfadiazina	50 mg/kg c/12 h	1 año

	Ácido fólico	5-10 mg tres veces por sem	Durante y por una semana después de la terapia de pirimetamina
Infección congénita con coriorretinitis activa y proteínas en líquido cefalorraquídeo > 1 g/dl	Tratamiento anterior + Prednisona	0.5 mg/kg c/12 h	Hasta la resolución de la coriorretinitis activa y los niveles de proteínas en el líquido cefalorraquídeo
Infección congénita asintomática	Pirimetamina Sulfadiazina Ácido fólico	2 mg/kg c/24 h/2 días 1 mg/kg c/24 h/2 ó 6 meses 1 mg/kg/ tres veces por sem 50 mg/kg c/12 h 5-10 mg tres veces por sem	1 año
Infección dudosa en el recién nacido	Pirimetamina Sulfadiazina Ácido fólico	2 mg/kg c/24 h/2 días 1 mg/kg c/24 h/2 ó 6 meses 1 mg/kg/ tres veces por sem 50 mg/kg c/12 h 5-10 mg tres veces por sem	Se mantendrá hasta descartar la infección por seguimiento de IgG. De confirmarse administrar durante 1 año
Encefalitis toxoplásmica CD4<100 X 10 ⁶ /litro Anticuerpos antitoxoplasma IgG	Trimetoprima-sulfametoxazole Dapsona Pirimetamina Dapsona Pirimetamina Leucovorin	1 tableta doble potencia c/12 h 2 tabletas doble potencia 100 mg 25 mg 50 mg c/24 h 50 mg 25 mg	2 veces por semana 3 veces por semana 1 vez por semana 1 vez por semana 1 vez por semana 1 vez por semana
Toxoplasmosis adquirida en niños	Pirimetamina + Sulfadiazina Fansidar (pirimetamina con sulfadoxina) Ácido folínico Espiramicina Clindamicina	2 mg/kg/día por 2 días 1 mg/kg/día 25-50 mg/kg c/12 h 1 tableta por 20 kg de peso 5-10 mg 150-300 mil UI/kg/día en 2 o 3 dosis 20-30 mg/kg/día en 4 dosis	1 mes 1 vez a la semana 3 veces por semana
Toxoplasmosis adquirida	Pirimetamina	100 mg c/24 h por 2 días	Fin de síntomas

en adultos	+	50 mg c/24 h	1 vez por semana
	Sulfadiazina	1.5 g c/12 h	
	Fansidar (pirimetamina con sulfadoxina)	2 tabletas	
	Ácido folínico	5-20 mg	
	Espiramicina	3 millones de UI c/8 h	
Toxoplasmosis ocular	Clindamicina	600 mg c/6 h	3 semanas o hasta la resolución de las lesiones reactivadas
	Trimetroprima-sulfametoxazole	160/800 mg c/24 h	
	Clindamicina	300 mg c/6 h	
	Prednisona	Pequeñas dosis	
Segundo episodio de toxoplasmosis ocular	Pirimetamina	50 mg c/24 h	6 semanas
	Sulfadiazina	1g c/6 h	
	Ácido folínico	20 mg c/24 h	
	Prednisona	Pequeñas dosis	
Tratamiento para prevenir recurrencias en la toxoplasmosis congénita	Trimetroprima-sulfametoxazole	160/800 mg c/24 h	1-2 años

Modificado de : Rosso *et al.*, 2007, Baquero-Artigao *et al.*, 2013, Cheever *et al.*, 1996; Milewska-Bobula *et al.*, 2015 y Kopec *et al.*, 2003.

I.5.1 Alternativas terapéuticas contra la toxoplasmosis

Diversos grupos de investigación, han dirigido sus esfuerzos a establecer alternativas de tratamiento y/o posibles vacunas contra la toxoplasmosis (Nakayama, 1965, Sayles and Johnson, 1996, Naserifar *et al.*, 201). Uno de los primeros estudios fue en 1986, dónde se indujo la atenuación de la cepa virulenta RH del genotipo I de *T. gondii* para probar su posible uso como vacuna; sin embargo, no hay literatura del grupo al respecto después de este trabajo (Yano and Nakabayashi, 1986).

Ovilis Toxovax, es la única vacuna aprobada hoy en día, para evitar la infección por toxoplasma en el ganado ovino. Esta vacuna fue desarrollada en la década de los 90's, para limitar las pérdidas económicas generadas a partir de los abortos inducidos por la infección con el parásito. La vacuna se elaboró a partir de la cepa incompleta S48 de *T. gondii*, la cual es administrada en una única dosis. La eficacia de esta cepa como vacuna fue probada en un estudio realizado en 1991; en donde se encontró que hasta el 80.8% de los fetos de

cordero resultaron viables, después de la vacunación. Aun cuando la vacuna no protege al 100% contra la infección con *T. gondii* se sigue usando debido a que aumenta las posibilidades de vida de la descendencia. Aunque los fetos se infectan en el útero estos tienen características de peso y tamaño normales al nacer (Buxton *et al.*, 1991).

Del año 2000 a la fecha, los intentos por desarrollar vacunas han dado mejores resultados. La cepa knock-out (KO) mic1-mic3 de *T. gondii* se evaluó como posible vacuna, en un modelo de infección crónica y uno congénito; los resultados mostraron que ratones sanos previamente inmunizados con esta cepa y posteriormente infectados con la cepa 76K de *T. gondii*, presentaron hasta 96% menos formación de quistes en el cerebro. Con respecto al modelo congénito de infección, encontraron una reducción del 29% de infección en los fetos, comparado con los ratones no inmunizados (Ismael, *et al.*, 2006). En un estudio posterior se utilizó la cepa KO mic1-3 para determinar su eficacia en ovejas de tres diferentes cepas (Mévélec, *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos mostraron que la inmunización con la vacuna comercial y la cepa KO a la misma dosis, indujeron un 65% de protección en ovejas Romanov; además que en ovejas Solognot utilizando la misma dosis tuvo mejor efecto al ser administrada de manera intraperitoneal (vs subcutánea), con un 92% de eficacia al inhibir la inducción de abortos (Mévélec, *et al.*, 2010). Se han utilizado antígenos de secreción-excreción, proteínas de roptrías y de superficie, como blancos de posibles vacunas, sin que alguno haya mostrado eficacias aceptables (Hedhi *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2015, Pinzan, 2015). A pesar de los esfuerzos por desarrollar vacunas que prevengan la infección en humanos; en la actualidad no existen vacunas dirigidas contra infecciones humanas.

Por otro lado, en nuestro país existen grupos de investigación enfocados al desarrollo de nuevos fármacos con efecto parasiticida. Nuestro grupo ha orientado parte de sus investigaciones a estudiar el efecto de las hormonas esteroideas sexuales (Figura 8) sobre la respuesta inmune a diferentes infecciones parasitarias; además de analizar el posible papel parasiticida de hormonas sexuales como la testosterona, el estradiol y la dehidroepiandrosterona (DHEA).

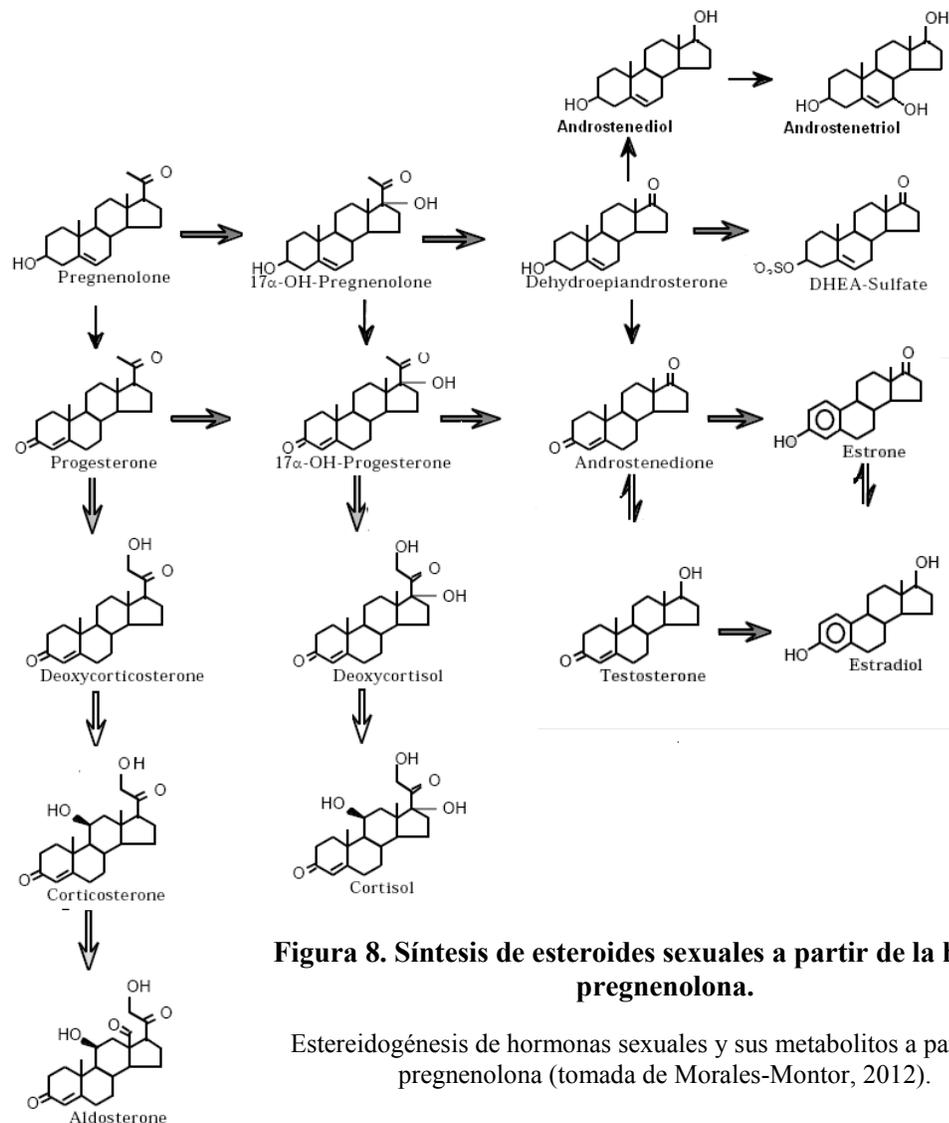


Figura 8. Síntesis de esteroides sexuales a partir de la hormona pregnenolona.

Esteroidogénesis de hormonas sexuales y sus metabolitos a partir de la pregnenolona (tomada de Morales-Montor, 2012).

I.5.2 Dehidroepiandrosterona (DHEA)

La DHEA es una hormona esteroidea producida por las glándulas adrenales, las gónadas y el cerebro a partir del colesterol y sintetizada a partir de la pregnenolona por acción de la enzima 17, 20 desmolasa (Fardella, 2001). Es la hormona más abundante en los mamíferos, y es precursor de esteroides sexuales (Figura 9) (Zapata, 2004, Mendivil y Borges, 2009).

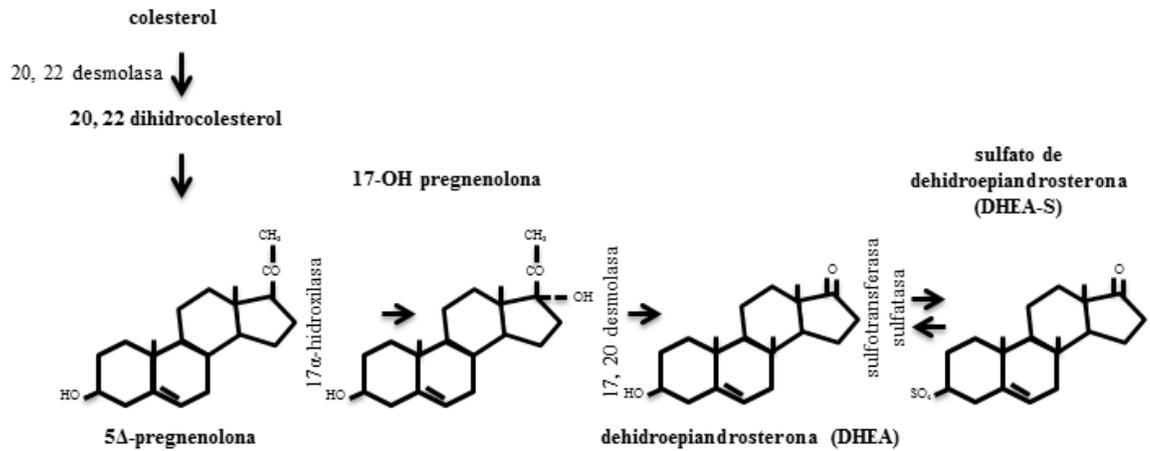


Figura 9. Síntesis de la Dehidroepiandrosterona (DHEA).

La DHEA se sintetiza a partir del colesterol por acción consecutiva de diferentes enzimas, las cuales sintetizan diferentes compuestos hasta transformar el colesterol a 17-OH Pregnenolona, la que por acción de la enzima 17, 20 desmolasa es sintetizada finalmente en Dehidroepiandrosterona (DHEA) (Luna-Nophal, 2016).

La DHEA (3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona) es conocida como la hormona de la juventud, debido a la amplia gama de funciones biológicas que posee y a que las concentraciones de esta hormona en el organismo disminuyen conforme aumenta la edad del individuo (Zapata, 2004). En el feto se sintetiza una cantidad elevada, la cual decrece bruscamente tras el nacimiento, para volver a aumentar de forma rápida entre los 6 - 8 años de vida, de los 25 - 30 años alcanza la máxima concentración; a partir de los 60 años se produce una caída en los niveles hasta llegar a un 10-20% de los valores máximos (Cuadro 2) (Mendivil and Borges, 2009).

Cuadro 2. Concentraciones normales de DHEA en humanos

Edad (años)	Valores de DHEA (ug/L)
1 - 4*	0.2 - 0.4
4 - 8*	0.1 - 1.9
8 - 10*	0.2 - 2.9
10 - 12*	0.5 - 9.2
12 - 14*	0.9 - 20
14 - 16*	2.5 - 20
10 - 19§	2.8
20 - 29§	6.5
30 - 49§	5.5
50 - 59§	4
60 - 84§	1
Mujeres premenopáusicas *	2 - 15
Mujeres 25 - 52 ^Φ	1583 ± 690
Hombres 30 - 60 ^Φ	2516 ± 1020
Hombres*	0.8 - 10

Tomado de: *López-Mato *et al.*, 1999, §Galindo-Sevilla *et al.*, 2007, ^ΦCárdenas *et al.*, 2012

En humanos, la forma de la DHEA que se encuentra en mayor concentración en la circulación sanguínea es la forma sulfatada (DHEA-S), mientras que la forma libre se encuentra entre el 3 - 5 % de su concentración total. La DHEA es la forma activa de la hormona, es metabolizada principalmente en el hígado donde se convierte a androstendiona (Zapata, 2004). La DHEA ha sido utilizada ampliamente con fines terapéuticos, para aumentar el vigor sexual y la masa muscular. También tiene efectos en el sistema nervioso central (SNC) ya que es un antagonista del receptor del ácido gamma amino butírico (GABA), inhibidor de la neurotransmisión, y un agonista del efecto neurotransmisor del glutamato (Mendivil y Borges, 2009). En el sistema inmune, la DHEA actúa como agente antigluco corticoideo y regula la síntesis de interleucinas pro-inflamatorias como la IL-6. En el metabolismo controla los lípidos por disminución de colesterol y triglicéridos. En el músculo propicia la glucogenólisis (proceso de síntesis de glucosa a partir de glucógeno), mientras que en la piel controla el crecimiento piloso y secreción seboreica. Se ha

reportado que en hueso aumenta la densidad ósea (López-Mato et al., 1999, Hazeldine *et al.*, 2010, Traish *et al.*, 2011).

I.5.3. Usos de la DHEA como parasiticida

La DHEA es una molécula propia del organismo, que se ha postulado para ser utilizada como un agente terapéutico en el tratamiento de una amplia gama de parasitosis. En un estudio *in vitro* realizado con trofozoítos de *Entamoeba histolytica* se observó que la DHEA inhibe la proliferación, la adherencia y la motilidad a concentraciones menores de 1 $\mu\text{g/mL}$; mientras que dosis superiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ induce la lisis de los trofozoítos (Carrero et al., 2006). Se evaluó el efecto de la DHEA (250 $\mu\text{g/mL}$) administrada pre-infección; en ratones infectados con metacestodos de *Taenia crassiceps*, la carga parasitaria se redujo en un 50%. En el mismo estudio, observaron que en condiciones *in vitro* la DHEA induce una reducción del 75% de la reproducción de cisticercos de *Taenia crassiceps* cuando son expuestos a 7 μM de DHEA (Vargas-Villavicencio et al., 2008). Otro parásito donde se ha evaluado el efecto de la DHEA fue sobre *Schistosoma mansoni*, esta hormona se utilizó en condiciones *in vitro* sobre la forma de cercaria, esquistosómula y gusano adulto. El 100% de mortalidad se obtuvo en la forma de cercaria y esquistosómula después de 48 h de cultivo con 4.5 $\mu\text{g/mL}$ de DHEA, mientras que en el gusano adulto hembra se obtuvo a los 5 días de cultivo, y en los machos se observó a los 4 días (Morales-Montor et al., 2001).

El empleo de hormonas sexuales como tratamiento en enfermedades parasitarias o de otra índole, presenta desventajas asociadas a las funciones propias de las hormonas en el organismo. El estudio del efecto de las hormonas diversas enfermedades parasitarias tiene como objetivo el desarrollo de compuestos análogos que mantengan dicho efecto, pero evitando los efectos estereoidogénicos.

A la fecha existe un estudio donde se evaluó el efecto parasiticida de la DHEA sobre toxoplasma, la DHEA se administró 1) pre- y 2) post-infección, en ratones a los cuales indujeron inmunosupresión con ciclosfosfamida, y se observó una reducción de la mortalidad comparado con el grupo sin tratamiento (30%), de 10% en el grupo de administración antes de la infección y 15% en el grupo de administración después de la infección. Adicionalmente, a nivel morfológico observaron una degradación en la pared de

los quistes, presentes en el cerebro de los ratones administrados con DHEA; por otra parte, el número de quistes se redujo de 95 en el grupo sin tratamiento a 10 en el grupo donde se administró la DHEA antes de la infección y 39 quistes en el grupo donde se administró la DHEA después de la infección (Khalifa *et al.*, 2000). En un estudio realizado en población con toxoplasmosis ocular en Colombia, se midieron los niveles de DHEA-S en suero, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos de estudio (con infección crónica o aguda, sintomática o asintomática) (de-la-Torre *et al.* 2012). Este estudio concluye que los niveles de DHEA-S no son útiles en el diagnóstico de la toxoplasmosis ocular, debido a que no se modifican durante el padecimiento.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La toxoplasmosis es un importante problema de salud pública tanto veterinaria como humana, debido a que la infección sintomática ocasiona un gran número de muertes. Estas relacionadas principalmente a la encefalitis toxoplásmica en pacientes con VIH, o relacionadas con abortos. A la fecha la terapia basada en sulfadiazina – pirimetamina, presenta algunas desventajas sobre el individuo infectado; como es la inducción de diferentes eventos adversos. Además, una de las principales desventajas es su efectividad limitada a la fase aguda, donde los taquizoítos diseminan por el hospedero, mientras que en la fase crónica de la infección, carece de cualquier efecto. La búsqueda de fármacos que presenten mayor eficacia y menores efectos adversos, es un campo de estudio extenso con importancia en diferentes sectores.

En años recientes se ha generado un interés por encontrar aplicaciones alternativas a moléculas endógenas del organismo, en ese sentido, diversos estudios realizados por nuestro grupo y otros han demostrado que el tratamiento con DHEA sobre diversos parásitos de vida libre, tiene un efecto parasiticida en condiciones *in vitro*. Sin embargo, a la fecha no existe información del probable efecto que esta molécula pudiera tener sobre parásitos intracelulares obligado, como *Toxoplasma gondii*.

En el presente trabajo se analizó como primera aproximación, el efecto *in vitro* de la DHEA sobre la forma del taquizoíto de *T. gondii*.

III. HIPÓTESIS

La DHEA tiene un efecto parasiticida sobre el taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la DHEA sobre el taquizoíto de *Toxoplasma gondii* y sobre su capacidad de invasión y proliferación.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de la DHEA sobre la viabilidad de los taquizoítos extracelulares, por la técnica de exclusión con azul tripano.
2. Evaluar a nivel ultraestructural el efecto de la DHEA en taquizoítos extracelulares, por microscopia electrónica de transmisión.
3. Analizar el patrón proteico de parásitos extracelulares expuestos a la DHEA, mediante la técnica de PAGE-SDS y 2D PAGE-SDS.
4. Evaluar el efecto de la DHEA sobre la capacidad de invasión y proliferación de taquizoítos en un cultivo primario de macrófagos murinos y la línea celular HEp-2.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. de taquizoítos de *T. gondii*

Los taquizoítos (tk's) de la cepa RH de *T. gondii* se mantuvieron mediante pases seriales en ratones machos Balb-cAnN, de 6 a 8 semanas de edad. Los parásitos se inocularon mediante inyección en el peritoneo, 300×10^3 tk's/ratón, y se dejó transcurrir la infección durante 4-5 días. Los ratones infectados se eutanasiaron por dislocación cervical, se extrajo el exudado peritoneal conteniendo los tk's libres, se centrifugó a 1,800 rpm por 15 min. La pastilla conteniendo los tk's libres se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X, los taquizoítos se purificaron pasando la suspensión a través de un filtro de policarbonato con poro de 5 μ M (cat. TMTP 02500, Merck Millipore Co. Cork, Ireland). Los tk's purificados se contaron en una cámara de Neubauer, para su uso en los diferentes ensayos experimentales.

El uso de los ratones para este trabajo de investigación fue avalado por el comité institucional para el cuidado y uso de los animales de experimentación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (CICUAE-FMVZ/UNAM).

VI.2. Ensayos *in vitro*

VI.2.1 Supervivencia de taquizoítos expuestos a la DHEA

Para determinar el efecto parasiticida de la DHEA sobre los taquizoítos extracelulares, 6×10^6 de taquizoítos en un volumen final de 100 μ l de DHEA en PBS se expusieron por 30 y 120 min a temperatura ambiente (TA), en agitación suave. Las concentraciones utilizadas fueron 1, 10 y 100 nM; 1, 10, 20, 50, 80, 100, 200, 400 y 600 μ M. La DHEA fue solubilizada en etanol anhidro.

La sulfadiazina-pirimetamina (S-P) se obtuvo en su formulación comercial (concentración, marca), se disolvió en PBS 1X. Se utilizó como control positivo a las siguientes concentraciones: 80, 200, 400, 600 y 800 μ M. Adicionalmente se utilizó un esquema de tratamiento combinado, con las siguientes relaciones DHEA/S-P: 80/80, 200/200, 400/400, 600/600, 600/800, 10/600 y 10/800 μ M.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante el empleo de la técnica de exclusión con azul tripano, se contaron 300 parásitos por triplicado, por cada muestra en al menos tres experimentos independientes.

VI.3. Ensayos *ex vivo*

VI.3.1. Cultivo de macrófagos murinos

Para analizar el efecto de la DHEA sobre el proceso de invasión pasiva, se utilizaron cultivos primarios de macrófagos murinos. Los macrófagos se indujeron administrando 1 mL de aceite mineral estéril en el peritoneo de ratones machos (cepa Balb-cAnN); se permitió la diferenciación celular durante cinco días. Los ratones se eutanasiaron por dislocación cervical, se inyectaron 5 mL de una solución de glucosa al 1% en PBS 1X, se centrifugó a 1, 800 rpm por 15 min. El botón conteniendo los macrófagos se resuspendió en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) al 8% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina (PES). Los macrófagos purificados se sembraron sobre cubreobjetos previamente esterilizados, a una relación de $250 \times 10^3/\text{cm}^2$; se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

VI.3.2. Activación de macrófagos *ex vivo*

Veinticuatro horas después de plaqueados, los macrófagos se lavaron con medio fresco y se les adicionó lipopolisacáridos (LPS, Sigma Cat. L3137) a una concentración final de 30 ng/mL, para su activación. Después de 1 h de activación se infectaron con los taquizoítos de acuerdo a las diferentes condiciones experimentales.

VI.3.3. Invasión y Proliferación en macrófagos murinos de taquizoítos pretratados con DHEA.

Se expusieron 6×10^6 tk's se trataron de acuerdo a las concentraciones descritas en el ensayo *in vitro*.

Para los ensayos de invasión; al terminar los tiempos de exposición se permitió la interacción de los tk's tratados con los cultivos de macrófagos recién activados por un tiempo de 2 h. Las monocapas se lavaron con PBS 1X y se fijaron con formaldehído al 10%

en PBS por 30 min. El proceso de invasión se evaluó contando 300 células totales, considerando como células invadidas aquellas que presentaron al menos una vacuola parasitófora en su citoplasma (Figura 10).

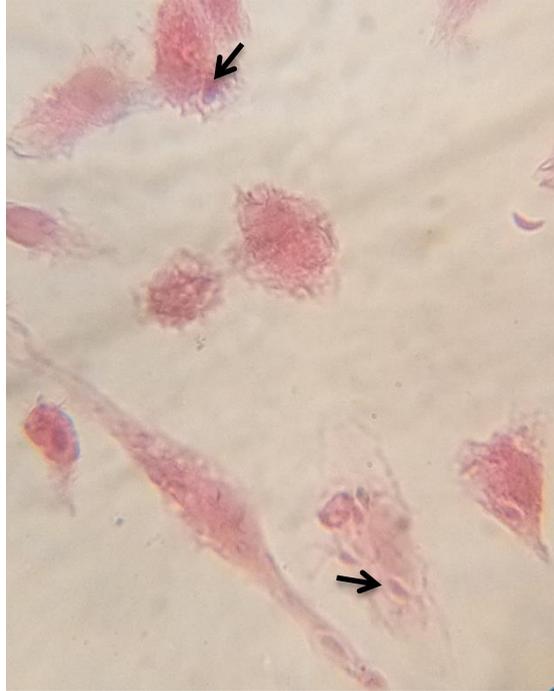


Figura 10. Invasión en macrófagos murinos.

Fotografía que muestra macrófagos murinos en cultivo invadidos con *T. gondii*. Las flechas indican como se observa un tk's dentro de su vacuola parasitófora (Luna-Nophal, 2016).

Para medir la capacidad de proliferación, se permitió la interacción de los parásito con la monocapa celular de macrófagos por 24 h; una vez transcurrido este tiempo las monocapas se lavaron y se fijaron con formaldehído al 10% en PBS por 30 min La proliferación se evaluó contando 300 células totales, se consideraron células proliferadas aquellas que presentaron en su citoplasma VP's conteniendo al menos ocho parásitos en su interior (Figura 11).

Los ensayos de invasión y proliferación se realizaron por triplicado, en ensayos independientes.

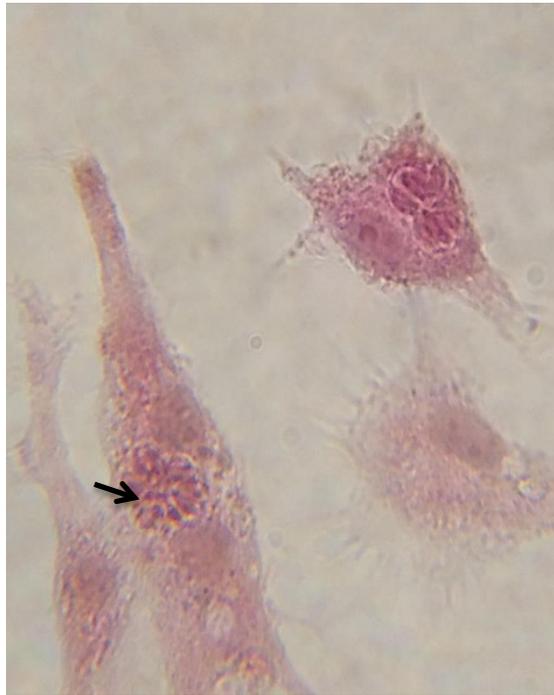


Figura 11. Proliferación en macrófagos murinos.

Fotografía que muestra macrófagos murinos en cultivo 24 horas después de la invasión con *T. gondii*. Las flechas indican como se observa un parásito después de varios ciclos de replicación (rosetas) dentro de su vacuola parasitófora (Luna-Nophal, 2016).

VI.3.4. Tinción de contraste

Después de fijar las muestras, se procesaron para su análisis por microscopía óptica por medio de una tinción de contraste con hematoxilina-eosina (H-E). Brevemente, las monocapas se lavaron exhaustivamente con PBS 1X y se permeabilizaron por 5 min con tritón-x-100 0.1%/PBS. Después de lavar, se colocó hematoxilina según Harris (MERCK Cat. HX616069) durante 10 min; se lavaron con etanol al 50% y se colocó solución de eosina (Golden Bell Cat. 36720) durante 5 min. Enseguida de la tinción, las monocapas se lavaron rápidamente con etanol al 50% y finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos con una solución PBS 1X-Glicerol (1:1).

Para el análisis de las laminillas se empleó un microscopio óptico Zeiss Axio, Observer A.1. 1024312266 SN: 3832002123. Con un objetivo 63X.

VI.3.5. Cultivo de células HEp-2

La línea celular HEp-2 (ATCC[®] CCL-23[™]) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, EU). Las células se mantuvieron en cultivo en medio mínimo esencial (MEM) suplementado al 8% con SFB y 1% de PES, en una incubadora a 37 ° C, con una atmósfera controlada (al 5% de CO₂) (De acuerdo a los protocolos de la ATCC). La línea celular se utilizó como modelo de célula no fagocítica para evaluar la invasión y proliferación de tk's expuestos a los diferentes tratamientos (Ver punto 3.3).

Se cultivaron 75x 10³ células/cm² en cubreobjetos estériles contenidos en placas de 24 pozos, se incubaron en condiciones normales de cultivo. Veinticuatro horas después, las monocapas fueron infectadas con los tk's expuestos a los diferentes tratamientos y a los dos tiempos de incubación (30 y 2 horas). El desarrollo experimental, procesamiento y análisis de las muestras, se realizó de la manera ya descrita en el punto 3.3 y 3.3.1.

VI.4. Obtención de proteínas totales de taquizoítos de *T. gondii* expuestos a los diferentes tratamientos.

La obtención de las proteínas totales se realizó utilizando un buffer de lisis (β -mercaptoetanol 2%, TRIS-HCl 2 mM pH 7.5, SDS 1%, EGTA 20 mM más inhibidores de proteasas (Complete, Roche Cat. 04693132001). Los taquizoítos purificados, se contaron en cámara de Neubauer, se tomaron 20 x10⁶ tk's pre-tratados por 30 y 120 min, de acuerdo a los diferentes esquemas descritos en el punto 2.1, se colocaron en buffer de lisis hasta que se disolvió el pellet de tk's, después se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto; se separó la porción soluble y se cuantificó mediante espectrometría con Nanodrop[™] 2000 (Thermo Scientific) a 280 nm. El extracto total se guardó a -20 °C hasta su uso.

VI.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en una dimensión (separación por peso molecular) de 10 ug de proteína total se hizo en geles de poliacrilamida a una concentración del 10% para separar las proteínas de peso molecular grande y al 15% para la separación de proteínas de peso molecular pequeño, y se corrieron a 80 volts en una cámara de electroforesis para proteína (Bio-Rad mini Protean[®] Tetra System); se utilizó marcador de peso molecular de 10 a 260

ó 40 a 300 Kda (Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad or High Range Protein Ladder Cat. 26634, Cat. 26626) para los geles al 10%; y marcador de peso molecular de 2 a 40 Kda (Thermo Scientific Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder Cat. 26628) para los geles al 15%.

Las bandas de proteínas presentes en las muestras se revelaron empleando una tinción con nitrato de plata.

VI.4.2. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Los geles se tiñeron con nitrato de plata para revelar las bandas de proteínas totales de los extractos de los tk's expuestos a los diferentes tratamientos, concentraciones y tiempos anteriormente descritos.

Una vez terminado el tiempo de la electroforesis los geles se extrajeron de la cámara y se colocaron en bandejas de plástico para proceder a realizar la tinción antes mencionada. Los geles se fijaron durante 24 horas en agitación a 4 °C en una solución fijadora (40% de metanol, 50% de formaldehído, en agua milli-Q) transcurrido el tiempo de fijado se hicieron dos lavados consecutivos con agua milli-Q de cinco minutos cada uno en agitación a TA, se colocó tiosulfato de sodio 0.2 g/mL durante un minuto, se hizo un lavado con agua milli-Q durante 20 segundos y se agregó por gel 25 mL de solución de nitrato de plata 0.1% durante 10 minutos en agitación suave a TA, a continuación se agregó la solución reveladora (3 % de carbonato de sodio, 0.0004 % de tiosulfato de sodio y 0.05 % de formaldehído, en agua milli-Q) aproximadamente 4 minutos o hasta que aparecieran las bandas; una vez que el revelado estaba terminado se le agregó una solución de ácido cítrico 2.3 M para detener el revelado durante 10 minutos en agitación suave a TA, los geles se lavaron con agua milli-Q durante 10 minutos y finalmente se les agregó la solución de secado de geles (10% de ETOH y 4 % de glicerol en agua milli-Q) durante 10 minutos en agitación suave a TA. Se tomaron fotografías a los geles con las bandas proteicas reveladas y finalmente los geles se secaron en un secador de geles a 70 °C por 3 horas para colocarlos en la bitácora de laboratorio.

El análisis de los geles en una dimensión se hizo de manera visual solamente comparando las imágenes de todos los geles; analizando las diferencias por tratamiento y concentración empleada y duración de la exposición de los tk's a los tratamientos.

VI.5. Electroforesis bidimensional: obtención de proteínas totales.

La obtención de las proteínas totales se realizó utilizando un buffer de lisis 8 M de urea más inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets. Roche Cat. 04693132001). Los taquizoítos purificados, se contaron en cámara de Neubauer, se tomaron 50×10^6 tk's pre-tratados por 30 y 120 min, con $10 \mu\text{M}$ de DHEA, $800 \mu\text{M}$ de S-P y $10/800 \mu\text{M}$ de DHEA/S-P. Los taquizoítos se colocaron en buffer de lisis hasta que se disolvió el pellet de tk's, después se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto; se separó la porción soluble y se cuantificó mediante espectrometría con Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) a 280 nm. El extracto total se guardó a -20°C hasta su uso.

VI.5.1. Separación por punto isoelectrónico

Para el isoelectroenfoque se emplearon tiras con inmovilizador de pH de 3 a 10 (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 7 cm. GE Healthcare, Cat. 17-6001-11), y se hidrataron con 125 μL de buffer de hidratación (urea 8 M, DTT 1 mg, CHAPS 2%, anfolinas 1.6% pH 3-10 y azul de bromofenol 0.8%), donde se solubilizó 100 μg de proteína total. Se colocaron las muestras en carriles diferentes de una placa de hidratación, gota a gota por todo lo largo y se colocó la tira con la parte del gel hacia abajo en contacto directo con la muestra, se dejó transcurrir una hora y después se colocaron 900 μL de aceite mineral (PlusOne DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare, Cat. 17-1335-01) sobre la tira para evitar la evaporación de la mezcla y se dejó rehidratar a temperatura ambiente toda la noche (16 – 18 horas). Transcurrido ese tiempo, en una bandeja de electroenfoque (Bio-Rad) se colocó sobre cada electrodo de cada carril un papel filtro hidratado con 30 μL de agua milli-Q. Posteriormente, se sacó la tira de la placa de hidratación, se dejó escurrir 5 segundos sobre papel absorbente y se colocó con el gel hacia abajo en el carril de la cámara de electroenfoque cerciorándose que el gel hiciera contacto con los papel filtro sobre los

electrodos. La cámara se colocó después en el equipo Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, Firmware Version: 1.80) y se agregaron 900 uL de aceite mineral (PlusOne DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare, Cat. 17-1335-01) sobre la tira, se colocó la tapa de la bandeja y se cerró la tapa del equipo. El isoelectroenfoque se realizó por un total de 10,000 V-hr en 4 pasos: 1. Aumento lineal del voltaje hasta llegar a 125 V por dos horas, 2. Aumento lineal del voltaje hasta llegar a 250 V en 20 minutos, 3. Aumento lineal del voltaje hasta llegar a 4000 V en 2 horas y 4. Aumento rápido del voltaje a 4000 V y manutención hasta acumular 10,000 V-hr. Una vez terminado el isoelectroenfoque, la tira fue extraída del equipo y se procedió a separar las proteínas en la segunda dimensión por peso molecular.

VI.5.2. Separación por peso molecular

Para la segunda dimensión las tiras fueron equilibradas con 2 mL de buffer de equilibrio (6M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% p/v SDS, 20% v/v glicerol) más 0.5% p/v de DTT en un tubo de ensaye y se incubó durante 10 minutos en agitación continua a TA. Después, la tira fue incubada con 2 mL de buffer de equilibrio más 2.5% p/v de iodoacetamida durante 10 minutos en agitación continua a TA. Después de la equilibración, la tira fue cargada en un gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN[®]TGX[™] Precast Gels 4 - 20%, Bio-Rad, Cat. 456 - 1093) y se sometió a electroforesis en una cámara para electroforesis de proteínas (Bio-Rad mini Protean[®] Tetra System) con corriente constante de 100 V y se empleó 2 uL de marcador de peso molecular de 250 a 10 Kda (Thermo Scientific instructions, Page Ruler[™] Plus Prestained Protein Ladder, Cat. 26619) por gel. Una vez hecha la separación, el gel se tiñó con nitrato de plata (ver punto 4.2) para revelar los spots de proteínas y se digitalizo en un escáner HP Scanjet G4050 en formato tiff a 300 dpi, manteniendo siempre los mismos valores del formato de la imagen: 35 iluminados, -69 sombreados, 0 tonos medios y 2.2 gamma. Las imágenes se analizaron en el programa PDQuest Advanced – 8.0.1 para determinar el número de spots y las diferencias entre los diferentes tratamientos y las distintas concentraciones (Fig. 12).

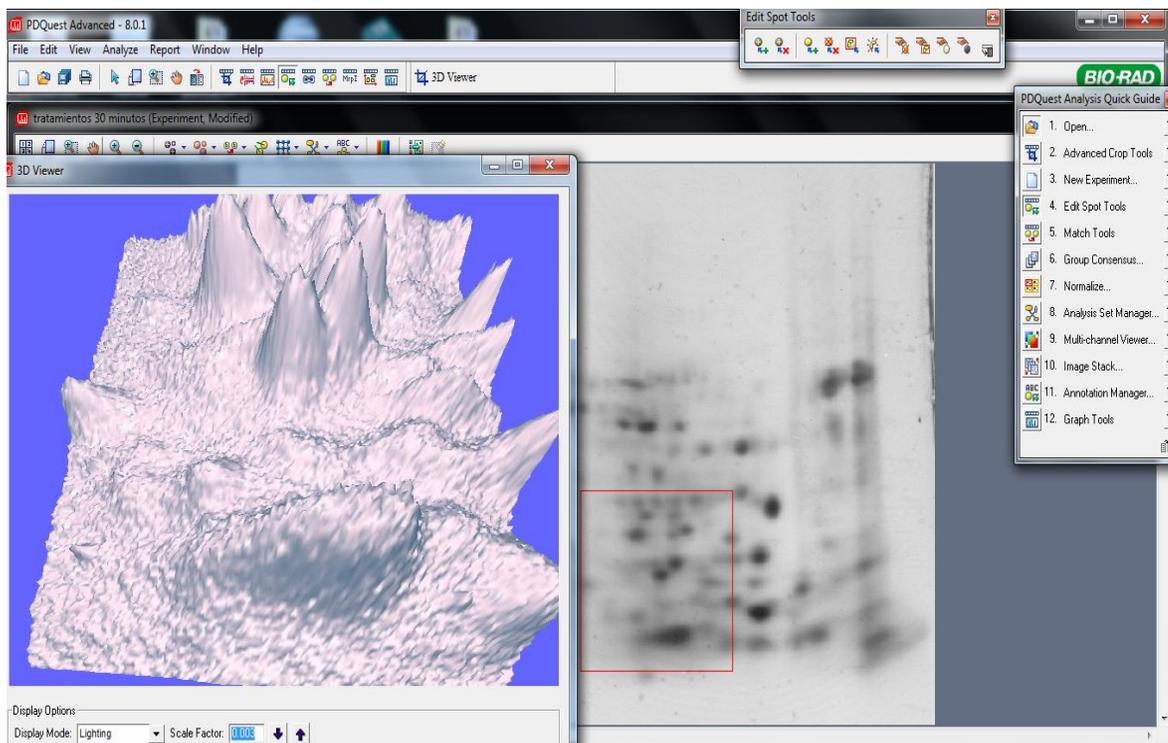


Figura 12. Análisis de spots de los geles en 2-D en el programa PDQuest.

El análisis de spots en imágenes digitalizadas de los extractos proteicos de *T. gondii* separados por punto isoeléctrico y peso molecular en el programa PDQuest Advanced – 8.0.1.

VI.6. Análisis ultraestructural del efecto de la DHEA sobre los taquizoítos extracelulares.

Los parásitos purificados fueron expuestos en forma extracelular por 30 y 120 min a los diferentes tratamientos (ver punto 3.1). Al término de los tratamientos, se centrifugaron a 1800 rpm, la pastilla conteniendo los tk's fue resuspendida en glutaraldehído 2.5%/PBS 1X y mantenida en agitación suave por 1 hr. Las muestras se lavaron con PBS 1X mediante centrifugación. En seguida las muestras se fijaron con Tetraóxido de Osmio (OsO_4) al 1% por 1 h. Se lavaron con agua destilada y se contrastaron con acetato de uranilo acuoso al 1% por 2 h. Las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (50-100 %), y se embebieron en concentraciones crecientes de resina LR White (London Resin, England). Las muestras embebidas se polimerizaron a 4 °C por 36 horas bajo luz UV. Los

bloques polimerizados se cortaron en un ultramicrotomo para su análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). El análisis se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM200CX 200KV. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el IPICYT, por la Dras. Araceli Patrón Soberano y Saé Muñíz-Hernández. El análisis y manejo de las imágenes se realizó en el programa Digital Micrograph (TM) 3.7.0 for GSM 1.2 by the Gatan Software Team.

VI.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, que nos permite determinar simultáneamente los efectos de dos variables (tratamiento y tiempo de exposición al tratamiento) con la prueba de comparación de tukey. Empleando el programa GraphPad Prism 6. Los análisis se consideraron significativamente diferentes cuando la $p < 0.05$.

VII. ESQUEMA EXPERIMENTAL

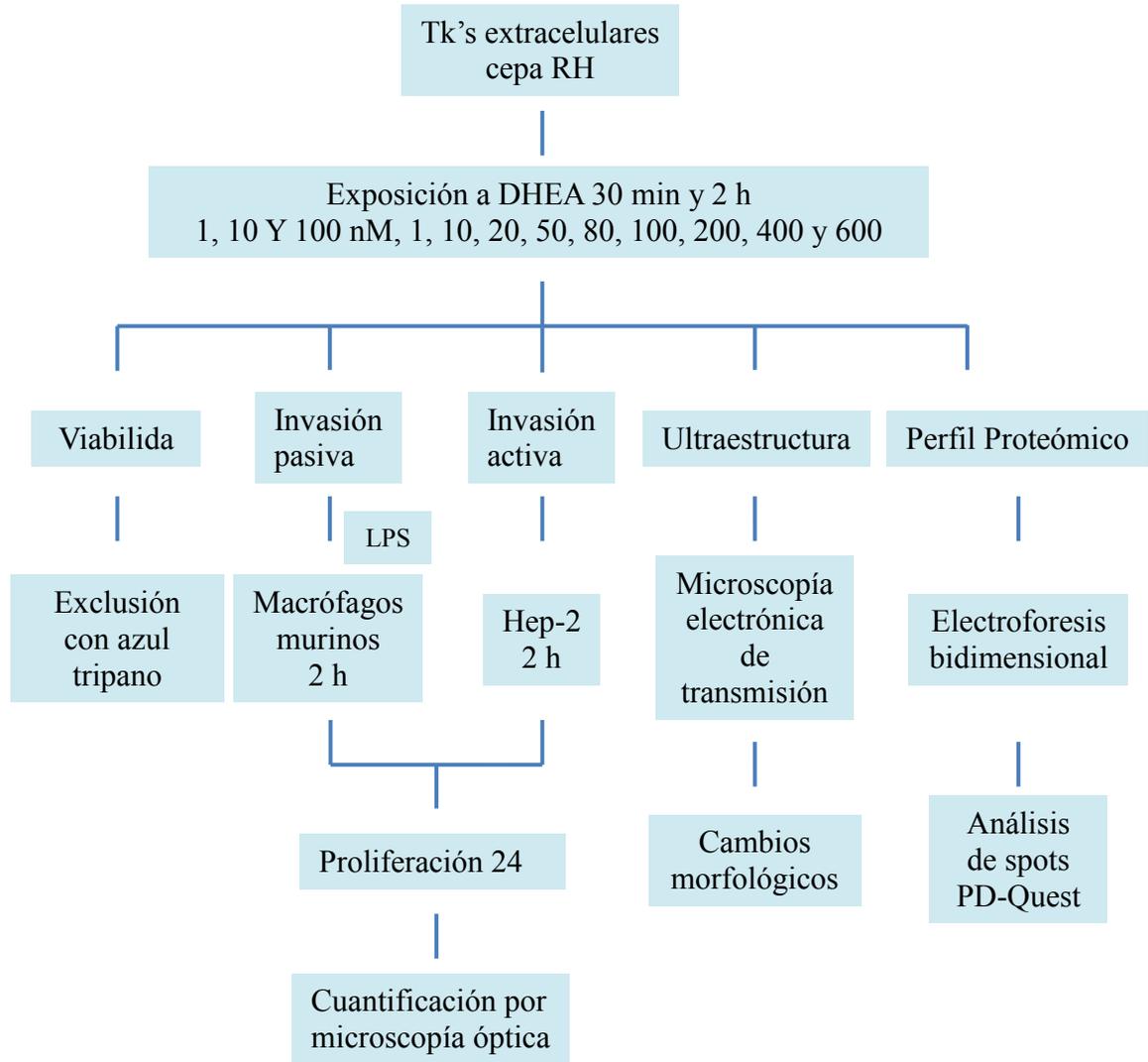


Fig. 13. Esquema experimental.

Se muestra el esquema experimental general seguido en la realización de los objetivos propuestos en este proyecto de investigación.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Efecto de la DHEA sobre taquizoítos extracelulares de *T. gondii*

Los taquizoítos se extrajeron de peritoneo de ratón y se purificaron por centrifugaciones repetidas. De acuerdo a reportes previos, donde se ha evaluado la DHEA (Khalifa, 2000, Morales-Montor, 2001, Carrero, 2006), dividimos nuestro rango de concentraciones en fisiológicas: 1, 10, 100 nM; 1, 10, 20 y 50 μ M; y farmacológicas: 80, 100, 200, 400 y 600 μ M. Los taquizoítos extracelulares recién purificados se expusieron a concentraciones crecientes de DHEA por 30 y 2 horas (Figura 14 A y B, respectivamente). A los 30 min de exposición, se observó una ligera disminución de la viabilidad, con diferencia estadística a partir de 1 y hasta 200 μ M (aprox. 30%); mientras que a 400 y 600 μ M, la viabilidad observada fue 63% y 48%, respectivamente (Asteriscos, Figura 14 A). A las dos horas de tratamiento con la DHEA el efecto parasiticida se observó desde 100 μ M hasta 600 μ M; con porcentajes de viabilidad alrededor del 50% (Figura 14 B).

Como ha mencionado anteriormente, la combinación de sulfadiazina con la pirimetamina (S-P), constituyen el régimen de tratamiento para la toxoplasmosis. Nosotros expusimos tk's extracelulares a concentraciones crecientes de S-P, que se tomaron en base a las dosis terapéuticas. La viabilidad encontrada a 800 μ M a 30 min y 2 h de exposición, con una viabilidad del 9.2% (Figura 15 A y B).

Se evaluó el efecto que podría tener la DHEA combinada con la S-P sobre la viabilidad de los taquizoítos extracelulares. En las gráficas obtenidas no es posible observar un mayor efecto (Figura 16 A-B); los porcentajes de viabilidad son muy cercanos a los obtenidas al utilizar únicamente DHEA, independientemente del tiempo de exposición (30 min/2 h). Adicionalmente, utilizamos 10 μ M de DHEA, concentración que mostró una disminución en la viabilidad de los tk's, y la combinamos con las concentraciones más altas y también de mayor efecto de S-P (Figura 17 A y B). Los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tk's no tratados; sin embargo, la viabilidad observada es de 74% a los 30 min y entre el 50 y 60% a las 2h (Figura 17 A y B).

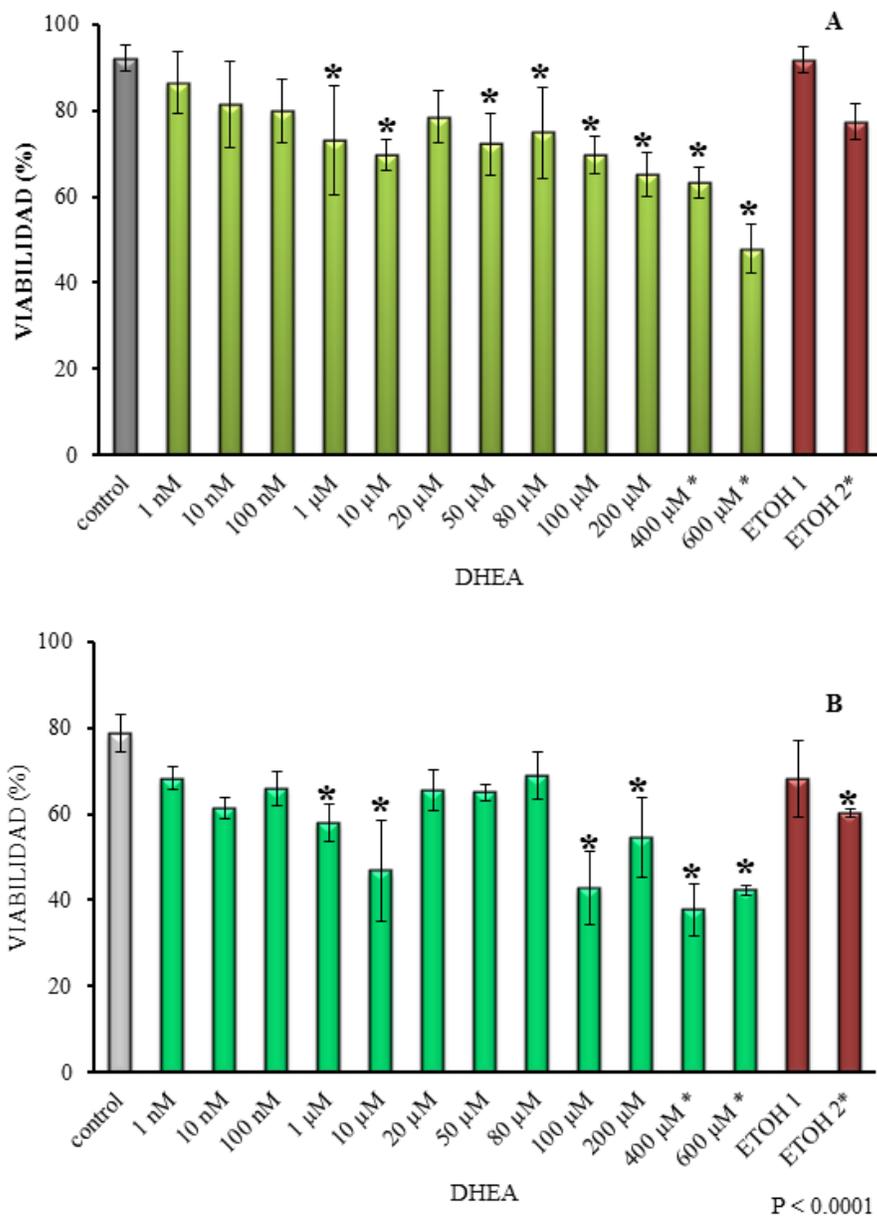


Figura 14. Curva dosis-respuesta de tachizoítos tratados con DHEA. Porcentaje de viabilidad de tachizoítos extracelulares de la cepa RH expuestos por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas a diferentes concentraciones de DHEA. Para cada barra se contaron 300 parásitos por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

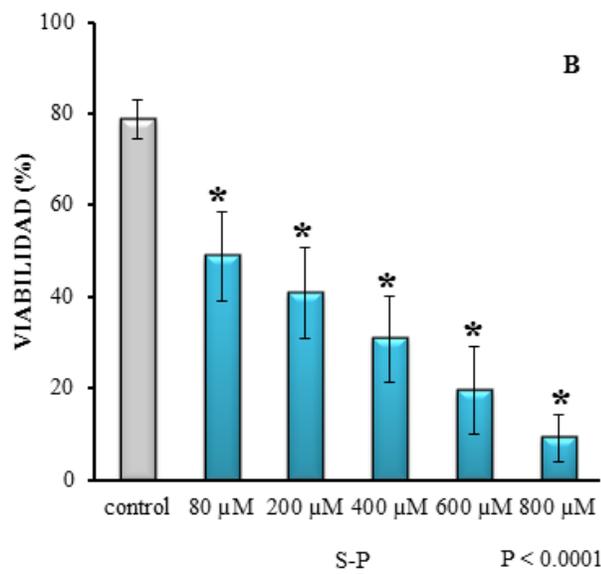
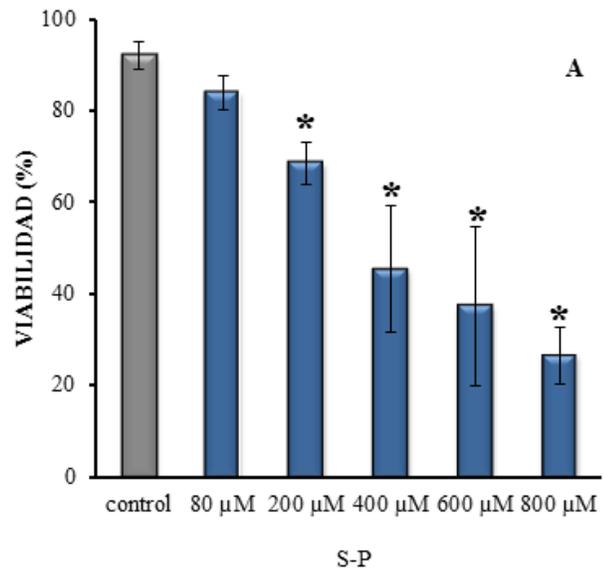
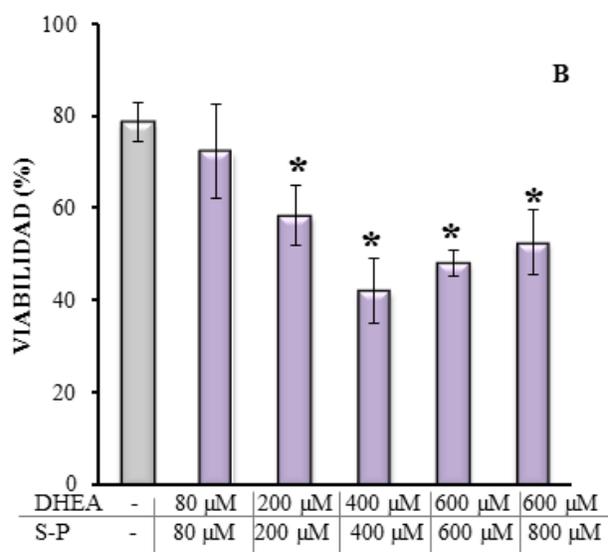
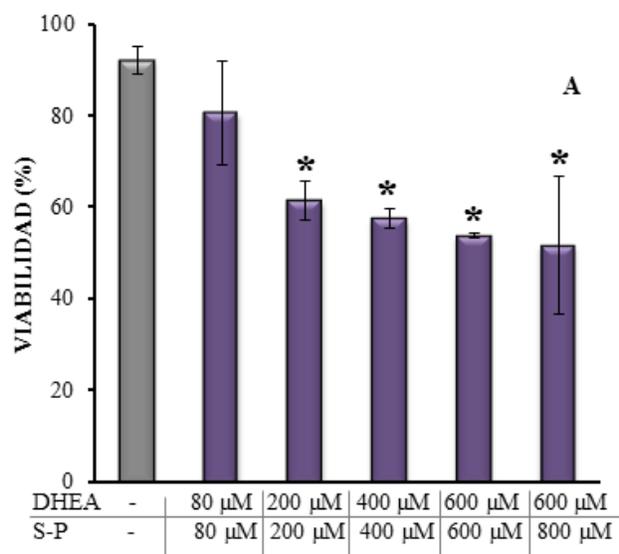


Figura 15. Curva dosis-respuesta de taquizoítos tratados con Sulfadiazina-Pirimetamina.

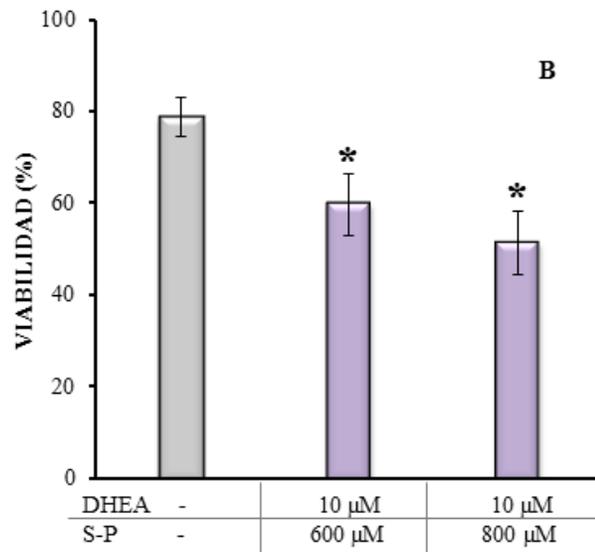
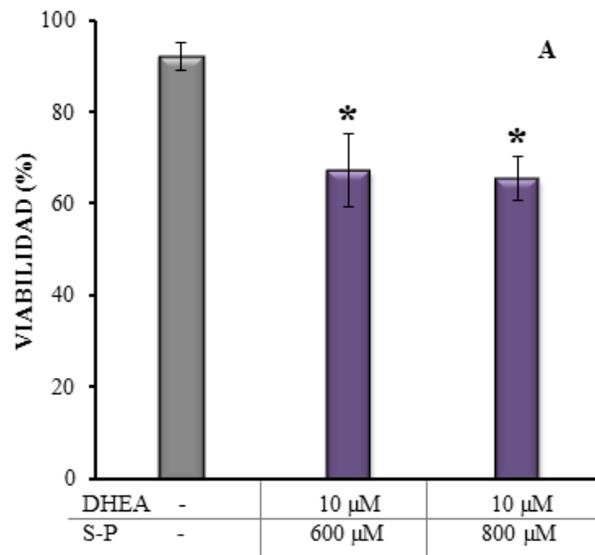
Porcentaje de sobrevivencia de taquizoítos extracelulares de la cepa RH expuestos por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas a diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 300 parásitos por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).



P < 0.0001

Figura 16. Curva dosis-respuesta de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos.

Porcentaje de sobrevivencia de taquizoítos extracelulares de la cepa RH expuestos por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas a diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 300 parásitos por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).



P < 0.0001

Figura 17. Curva dosis-respuesta de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos.

Porcentaje de sobrevivencia de taquizoítos extracelulares de la cepa RH expuestos por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas a diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 300 parásitos por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

VIII.2. Taquizoítos pretratados con DHEA no modifican el proceso de invasión pasiva, en cultivos primarios de macrófagos murinos

Para analizar el proceso de invasión pasiva, se obtuvieron macrófagos del peritoneo de ratones Balb-c; se mantuvieron en condiciones óptimas de cultivo por 24 horas y previo a su infección con los tk's, se activaron con 30 ng/mL de LPS. Taquizoítos previamente tratados se enfrentaron a las células fagocíticas en cultivo, a una relación 2:1. Los porcentajes de células invadidas se presentan en las figuras 18 – 22, de acuerdo al tratamiento de los taquizoítos. Aparentemente, la invasión de macrófagos activados por tk's tratados con DHEA muestran ligeras diferencias desde 1nM hasta 400 μ M (30 min y 2 h); a 600 μ M la diferencia se vuelve estadísticamente significativa, con respecto al control (Figura 18 A y B). Únicamente las dosis más elevadas de DHEA, tienen un efecto sobre los tk's tratados por 2h; resultando en porcentajes de invasión menores (Figura 18 B).

El porcentaje de invasión observado para los cultivos infectados con tk's tratados con S-P ó DHEA/S-P, no muestran diferencias con respecto al control de parásitos no tratados ni con respecto al tiempo de tratamiento (Figuras 19, 20 y 21).

Como control de la actividad fagocítica, utilizamos cultivos de macrófagos que no se les adicionó LPS, los cuales se consideraron macrófagos no activados, y que se enfrentaron a taquizoítos sin tratamiento previo. En la gráfica se observa que los macrófagos no activados muestran un menor porcentaje de células invadidas comparadas con los macrófagos activados (Figura 22).

De forma complementaria, cuantificamos el porcentaje de macrófagos que mostraban parásitos en su citoplasma (invadidos) después de 24h de haber realizado la infección. La finalidad fue determinar si los macrófagos fueron capaces de degradar al taquizoíto intracelular. Los resultados obtenidos muestran que a 24 hrs se obtienen un porcentaje de invasión menor, en los tk's tratados con DHEA a todas las concentraciones y en ambos tiempos de tratamiento (Figura 23 A y B). Los porcentajes de invasión en macrófagos infectados con taquizoítos tratados con S-P mostraron diferencias significativas en ambos tiempos de tratamiento (Figura 24 A y B). Mientras que el tratamiento con DHEA/S-P, sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en cultivos invadidos con parásitos tratados por 2 hrs (Figuras 25 B y 26 B)

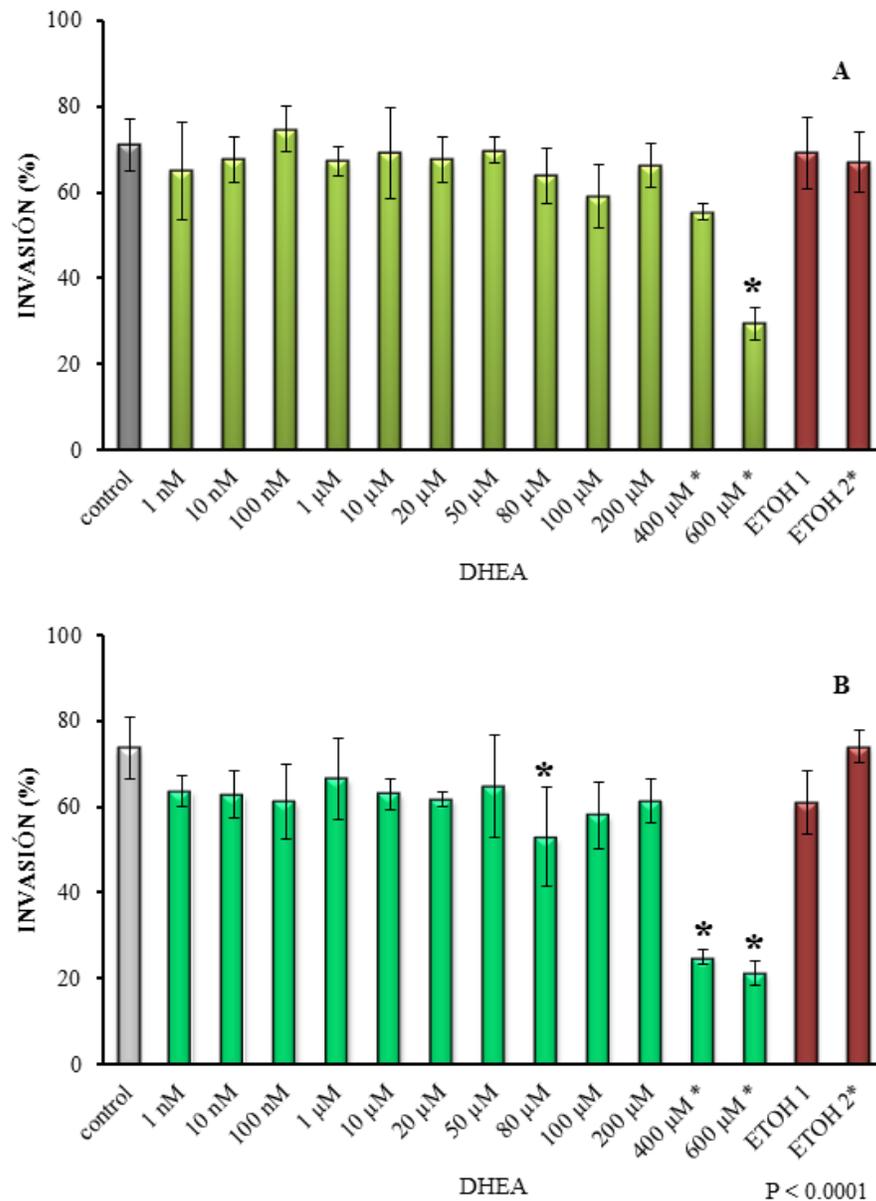


Figura 18. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA. Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron invadidos por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de DHEA. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

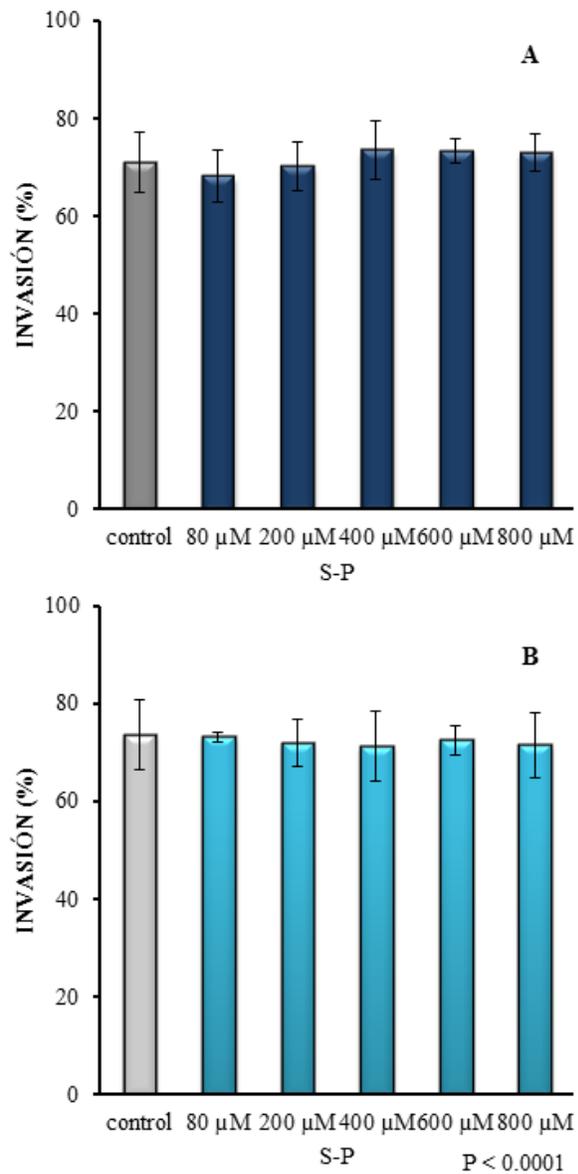
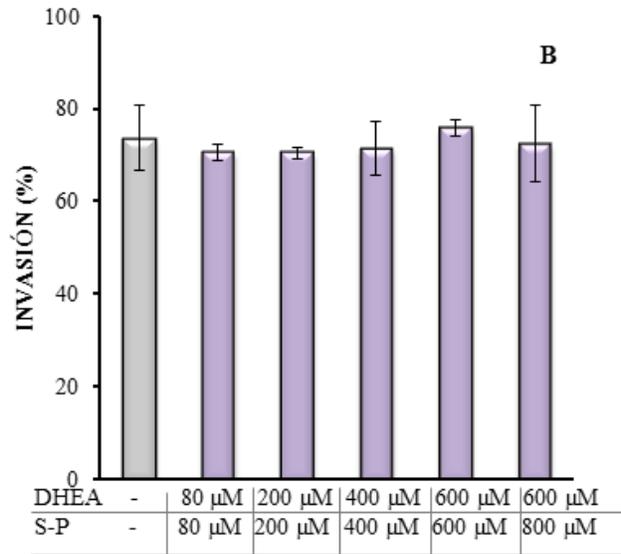
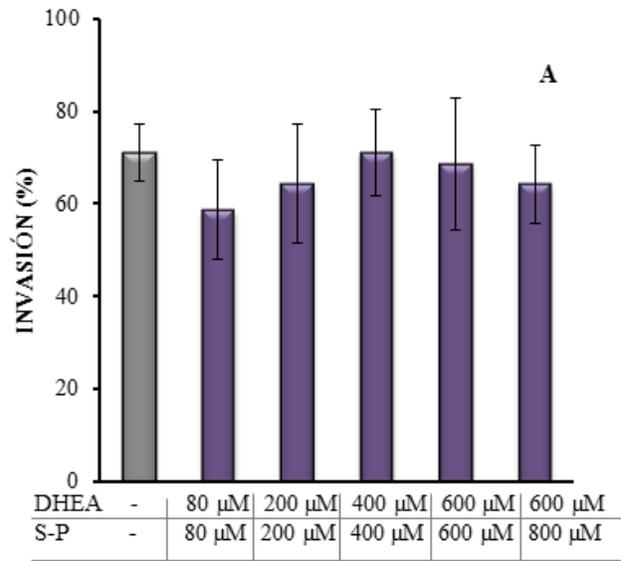


Figura 19. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Sulfadiazina-Pirimetamina.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron invadidos por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes.



P < 0.0001

Figura 20. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron invadidos por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes.

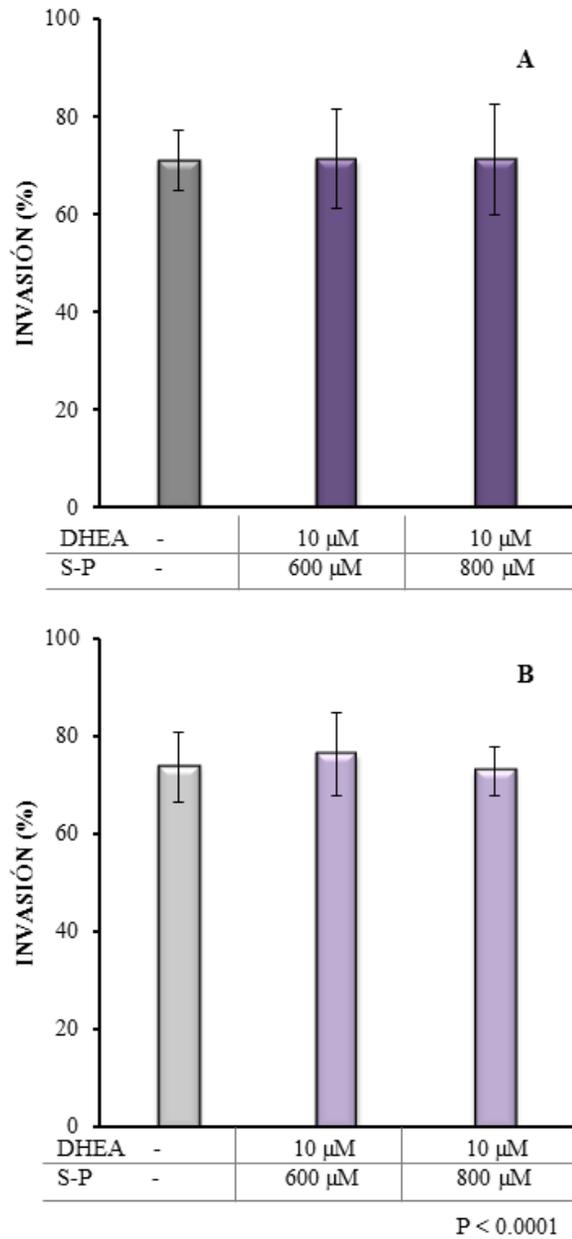


Figura 21. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron invadidos por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes.

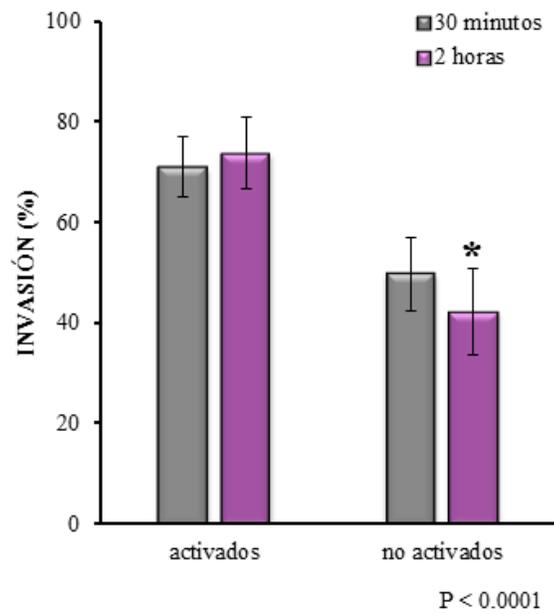


Figura 22. Invasión de macrófagos peritoneales.

Porcentaje de macrófagos peritoneales activados con LPS y no activados que se encontraron invadidos por uno o más tk's. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando macrófagos activados y no activados respecto al tiempo).

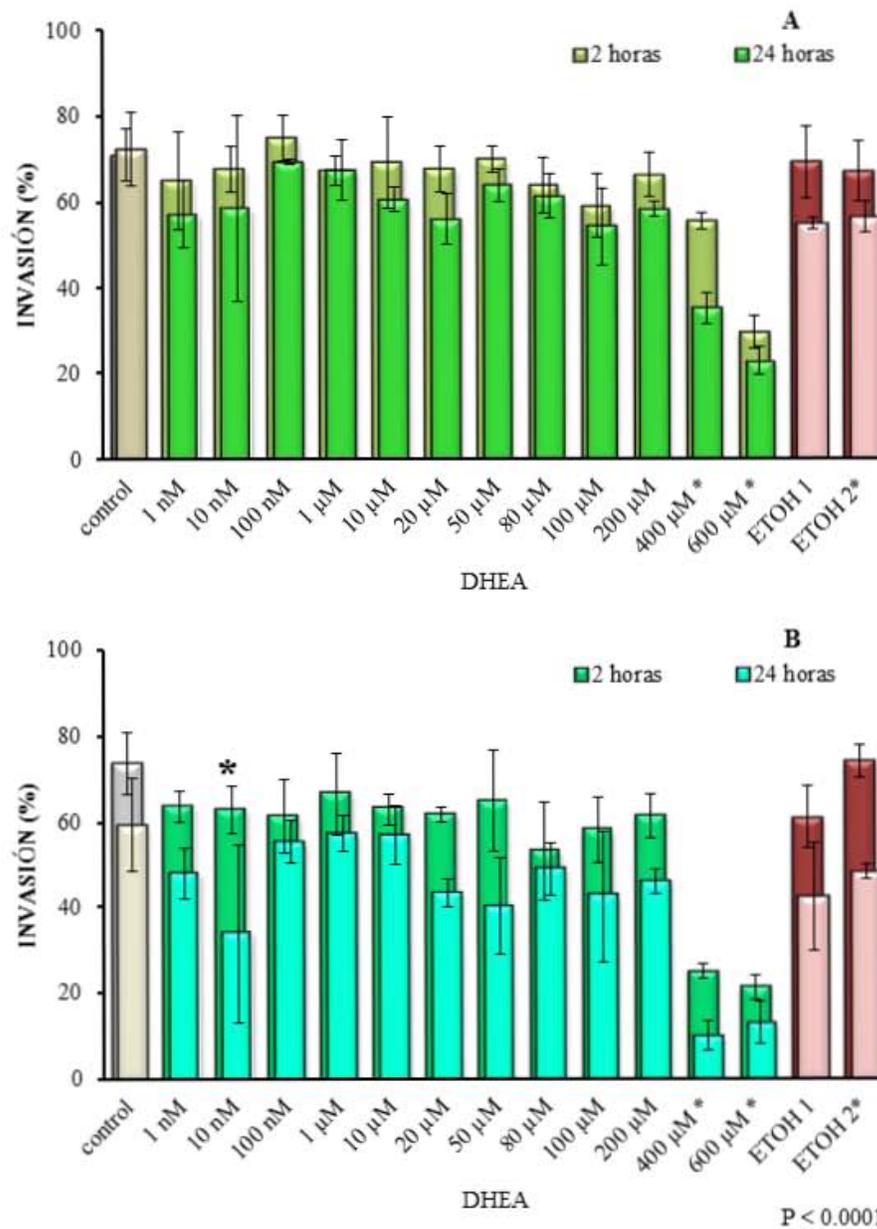


Figura 23. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA. Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos peritoneales murinos incubados 2 y 24 horas post infección, invadidos por taquizoítos tratados **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas con DHEA (Diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de DHEA).

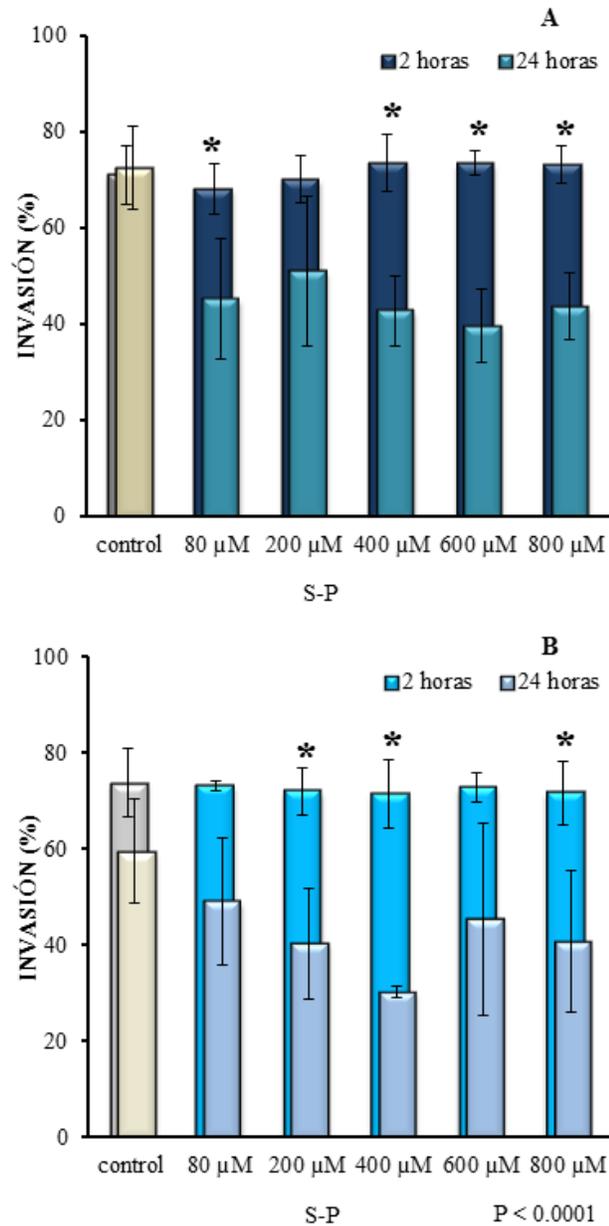
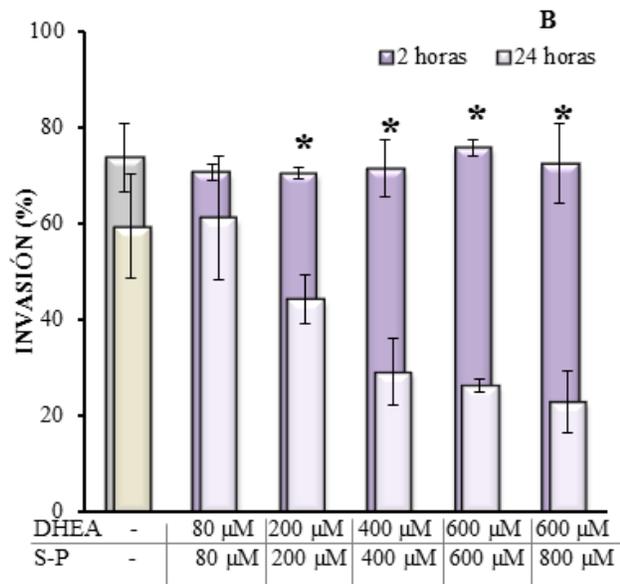
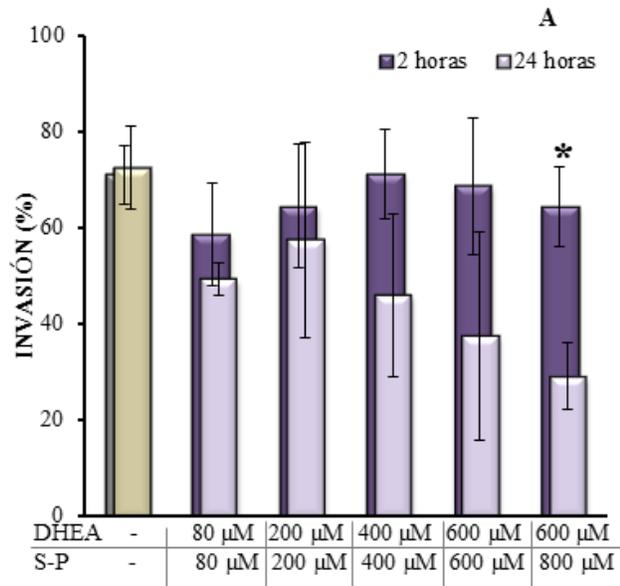


Figura 24. Invasión de macrófagos peritoneales por tachizoítos tratados con S-P. Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos peritoneales murinos incubados 2 y 24 horas post infección, invadidos por tachizoítos tratados **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas con S-P (Diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de S-P).



P < 0.0001

Figura 25. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA/S-P.

Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos peritoneales murinos incubados 2 y 24 horas post infección, invadidos por taquizoítos tratados **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas con DHEA/S-P (Diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de DHEA./S-P).

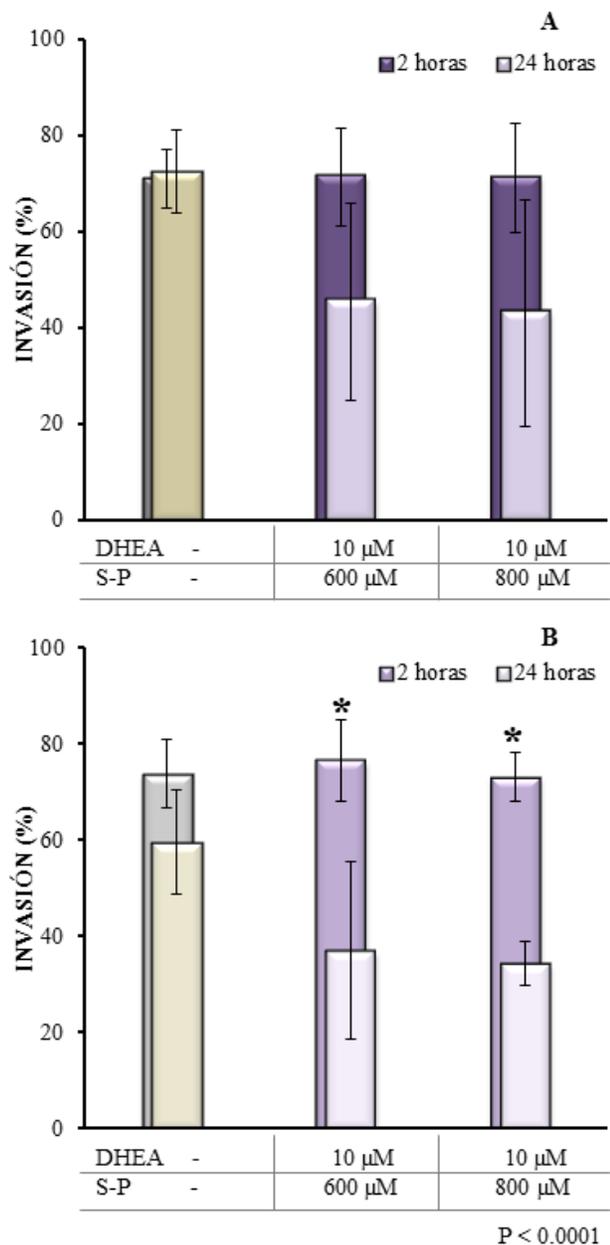


Figura 26. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con DHEA/S-P.

Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos peritoneales murinos incubados 2 y 24 horas post infección, invadidos por taquizoítos tratados **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas con DHEA/S-P (Diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de DHEA./S-P).

VIII.3. Efecto de la DHEA en la capacidad de proliferación de taquizoítos un cultivos primarios de macrófagos murinos

El taquizoíto de toxoplasma es capaz de evitar la degradación fagocítica y proliferar intracelularmente, en este tipo celular. Nosotros evaluamos la capacidad de proliferación de los tk's pretratados en macrófagos murinos, para ello infectamos los cultivos con taquizoítos previamente expuestos a concentraciones crecientes de DHEA, S-P y DHEA/S-P, mantuvimos el cultivo por 24 hrs más para permitir al menos 3 ciclos de replicación del parásito y contamos el número de células que presentaron en su citoplasma vacuolas parasitóforas conteniendo al menos 8 tk's en su interior. Las gráficas de las figuras 27 a la 30, muestran en porcentaje el total de células proliferadas. El tratamiento con DHEA a 400 y 600 μM (30 min y 2 h) de los tk's indujo una disminución en el porcentaje de proliferación intracelular (Figura 27 A y B). Aunque las concentraciones menores muestran una tendencia, el análisis estadístico no mostró diferencias (Figura 27). Al analizar el porcentaje de proliferación de taquizoítos pretratados con S-P y DHEA/S-P encontramos una inhibición cercana al 90% desde 200 hasta 800 μM en ambos tiempos de exposición del parásito (Figuras 28-30).

A diferencia de lo que observamos en el proceso de invasión, la adición de la DHEA al tratamiento de S-P mostró un mayor efecto, al inhibir la proliferación casi al 100%, cuando se emplearon las dosis más elevadas. Un resultado similar se obtuvo al exponer los tk's a 10 μM de DHEA más 600 y 800 μM de S-P (Figura 30 A y B). La proliferación de los tk's disminuyó hasta un 0.35 % (Figura 30 B).

VIII.4. Efecto de la DHEA sobre la capacidad de invasión de los taquizoítos pretratados en células HEp-2

Diversos reportes han demostrado la capacidad de invasión de los taquizoítos en células no fagocíticas. Nosotros empleamos la línea celular HEp-2 derivada a partir de un carcinoma epitelial, para analizar el efecto de la DHEA sobre la capacidad de invasión y proliferación del taquizoíto. El tratamiento por 30 min con DHEA desde 1 μM hasta 600 μM , indujeron una inhibición de la capacidad de invasión del taquizoíto hasta en un 50% comparado con el control (Figura 31 A). Cuando el tiempo de exposición se llevó hasta 2 h

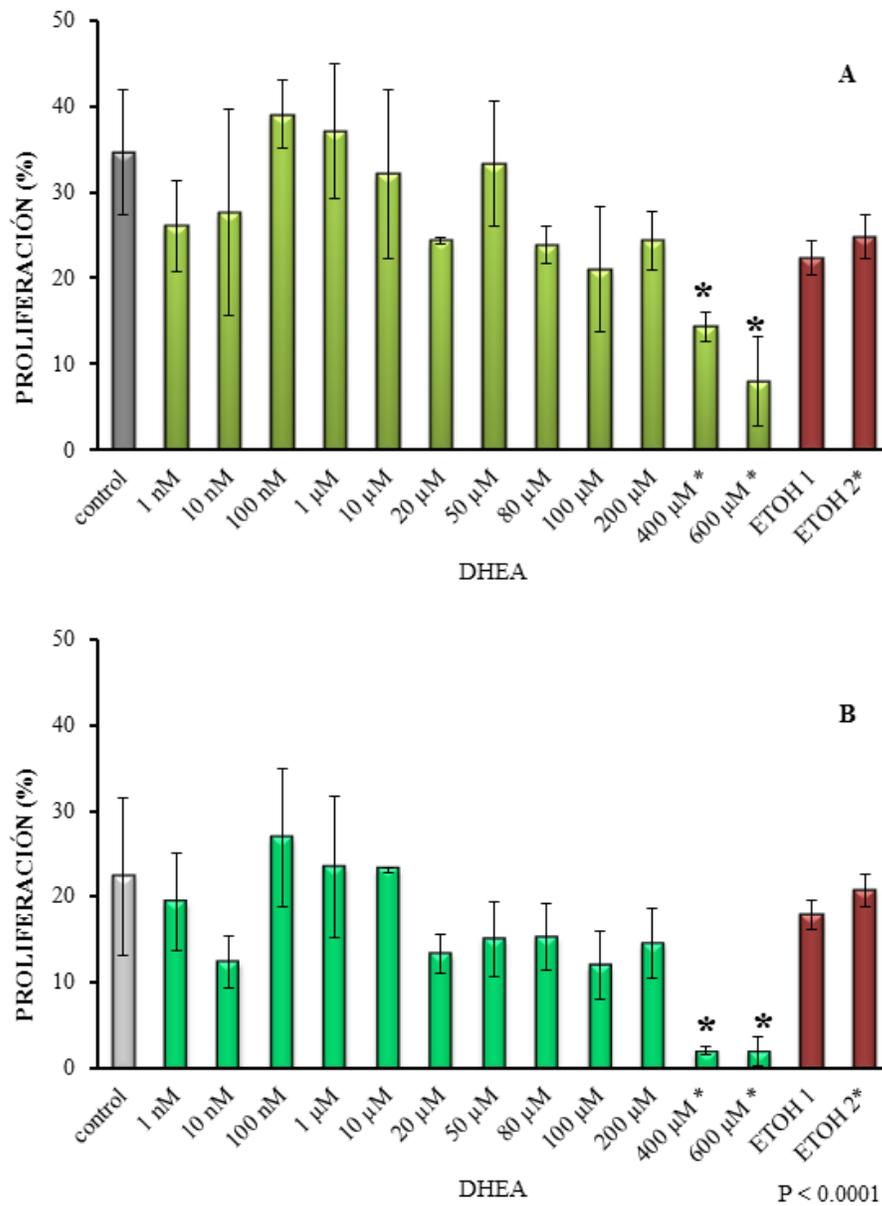


Figura 27. Proliferación de taquizoítos tratados con DHEA en macrófagos peritoneales. Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de DHEA. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

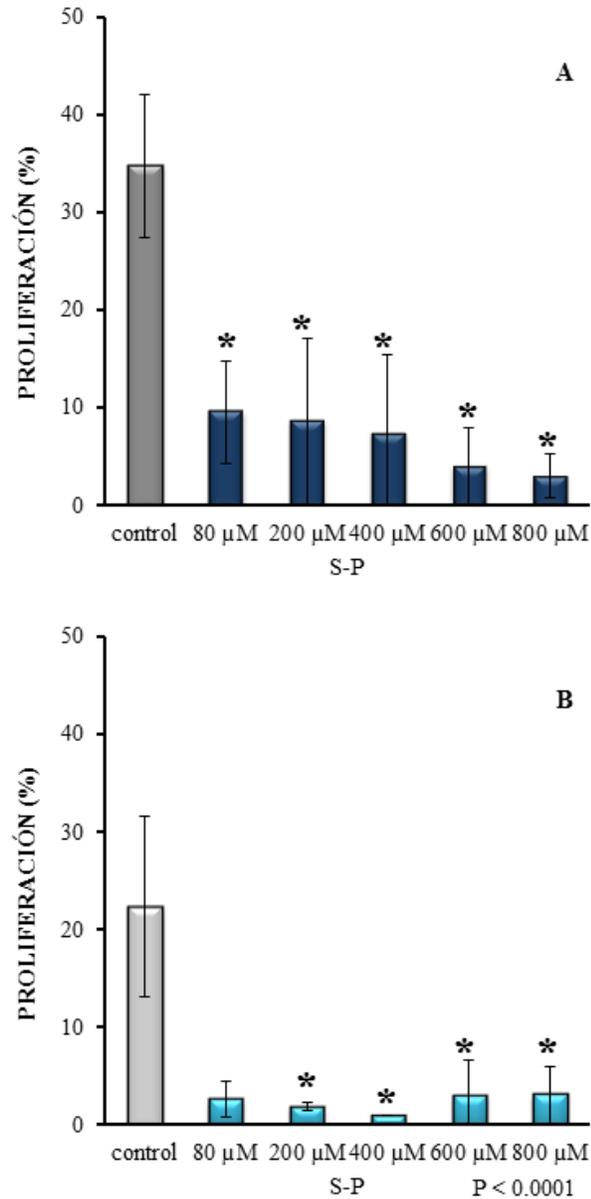
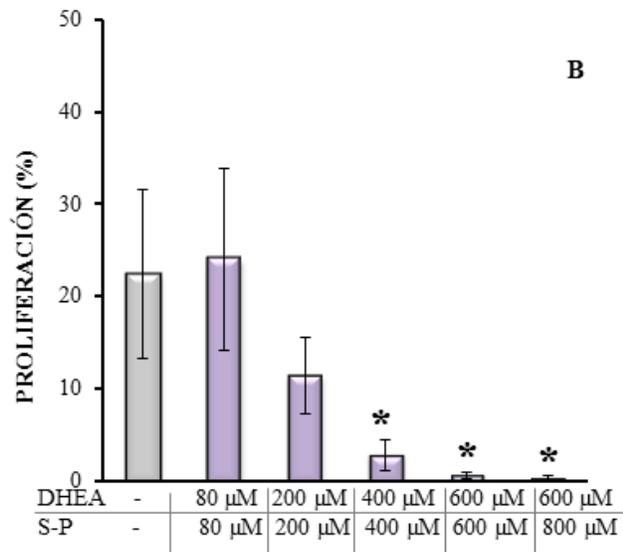
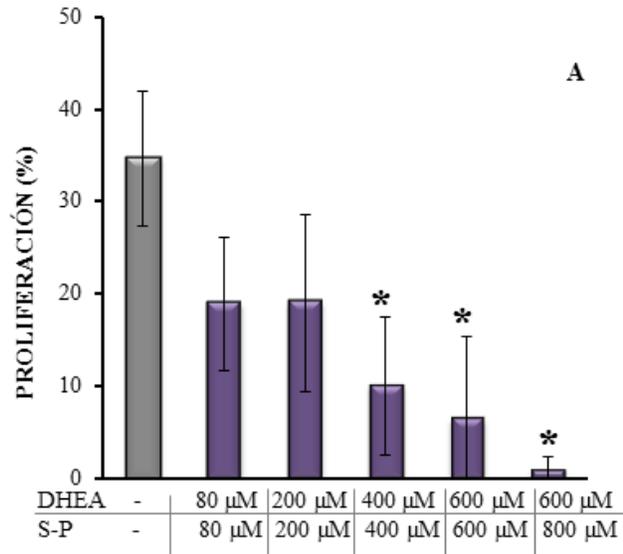


Figura 28. Proliferación de taquizoítos tratados con Sulfadiazina-Pirimetamina en macrófagos peritoneales.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).



P < 0.0001

Figura 29. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos en macrófagos peritoneales.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

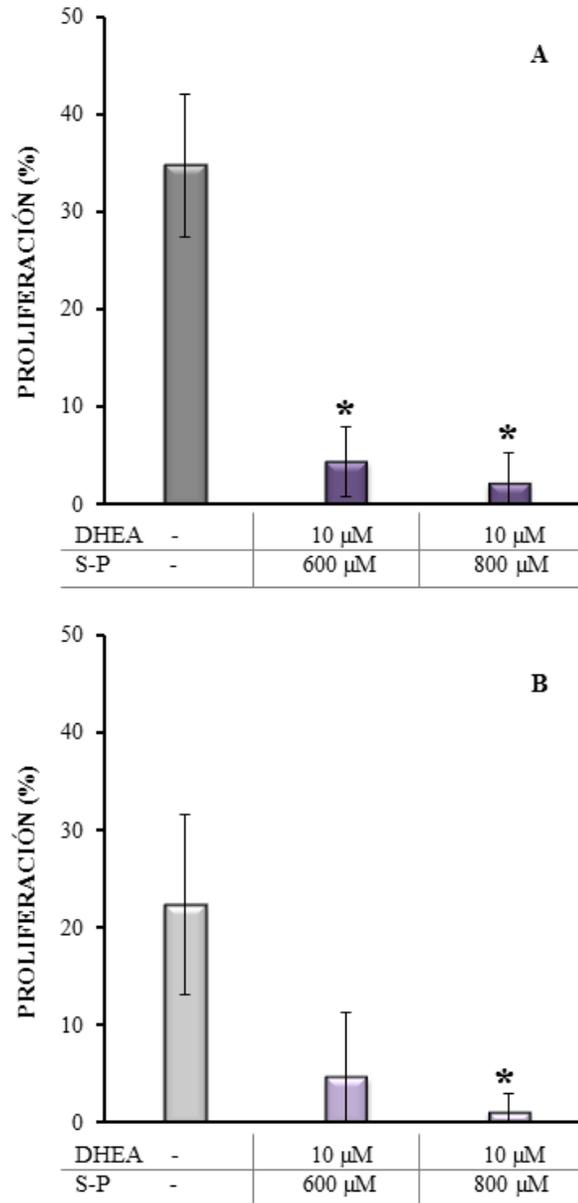


Figura 30. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos macrófagos peritoneales.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

la inhibición de la invasión fue de hasta un 90% en la concentración más elevada (Figura 31 B). El tratamiento con S-P no mostró diferencias significativas, a cualquier tiempo de exposición y en ninguna concentración empleada (Figura 32 A y B). De manera interesante encontramos que la combinación S-P con la DHEA parece contrarrestar el efecto inducido por esta última, debido a que no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de invasión a ninguna de las concentraciones empleadas (Figuras 33 A y B y 34 A y B).

VIII.5. Efecto de la DHEA sobre la capacidad de proliferación de taquizoítos en monocapas de células HEp-2

La maquinaria de proliferación del taquizoíto involucra tanto proteínas del citoesqueleto así como proteínas propias del phylum, como las de gránulos densos *T. gondii* se multiplica asexualmente mediante un proceso denominado endodiogenia, en el cual el parásito se divide en dos en su interior generando organelos *de novo*.

Nosotros evaluamos el efecto de la DHEA sobre el proceso de proliferación en tk's pretratados por 30 min y 2 horas. El análisis se realizó contando las células que mostraron en su citoplasma, vacuolas parasitóforas con al menos 8 parásitos en su interior. En la sección de métodos se describió el proceso de rehidratación de la DHEA, como solvente se empleó etanol. Motivo por el cual, como control interno de todos nuestros ensayos utilizamos las mismas concentraciones de etanol directamente sobre los taquizoítos. En este ensayo encontramos un efecto inhibitorio sobre la proliferación inducido por la concentración más alta de etanol. Debido a lo anterior, las concentraciones de 400 y 600 μM de DHEA, no fueron evaluadas. De acuerdo a nuestros resultados, únicamente a 200 μM de DHEA se observó una inhibición en el porcentaje de proliferación con respecto al control de tk's no tratados; de 15.1 a 2.6 % a los 30 min y de 15.85 a 2.2 % a las 2 h de tratamiento (Figura 35 A y B). El tratamiento convencional no modifica los porcentajes de proliferación de los taquizoítos tratados a cualquier concentración por 30 min (Figura 36 A); mientras que a 2h de tratamiento sólo a 800 μM , se observa una diferencia con significancia estadística (Figura 36 B; 15.8 control vs 4 %).

Al combinar los tratamientos DHEA y S-P, no pudimos observar algún efecto inhibitorio en el proceso de proliferación de manera independiente al tiempo de pretratamiento de los tk's (Figuras 37 y 38).

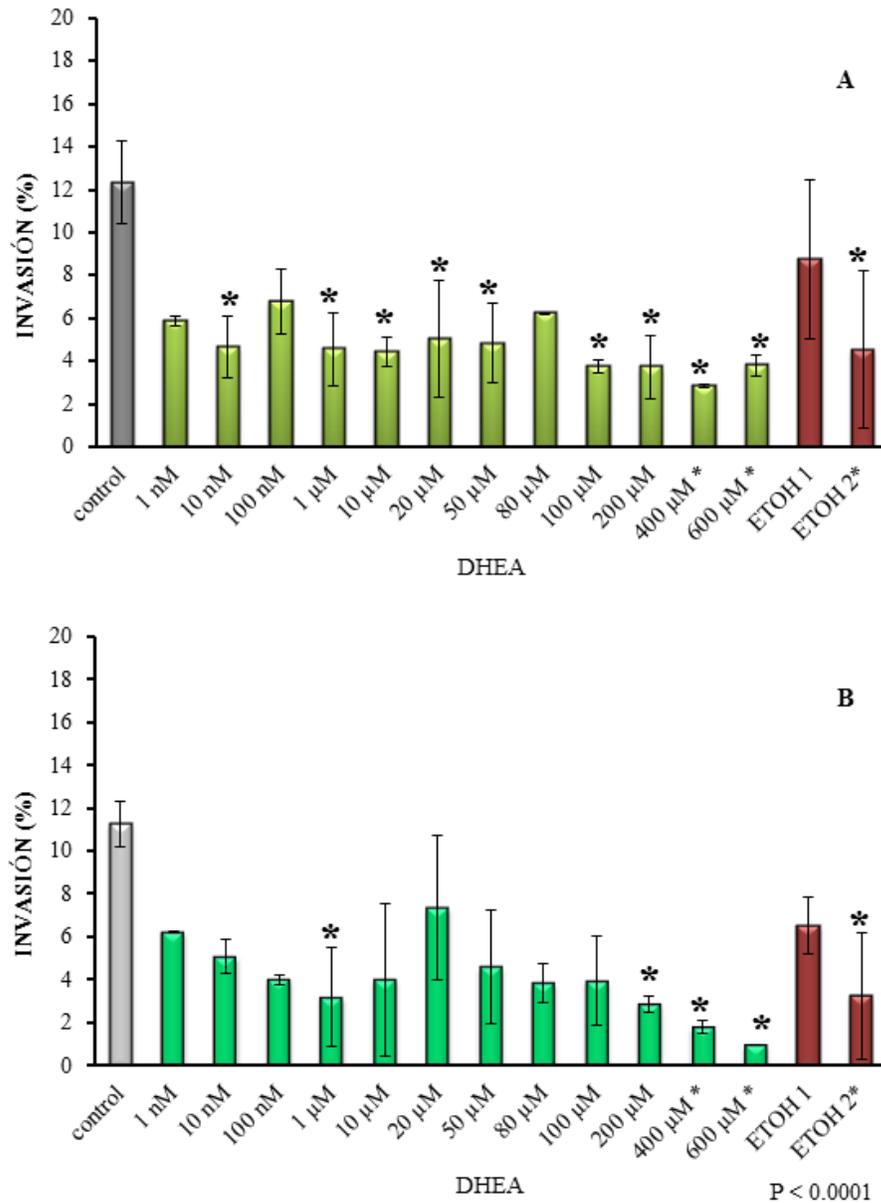


Figura 31. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con DHEA.

Porcentaje de células en cultivo que se encontraron invadidas por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de DHEA. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

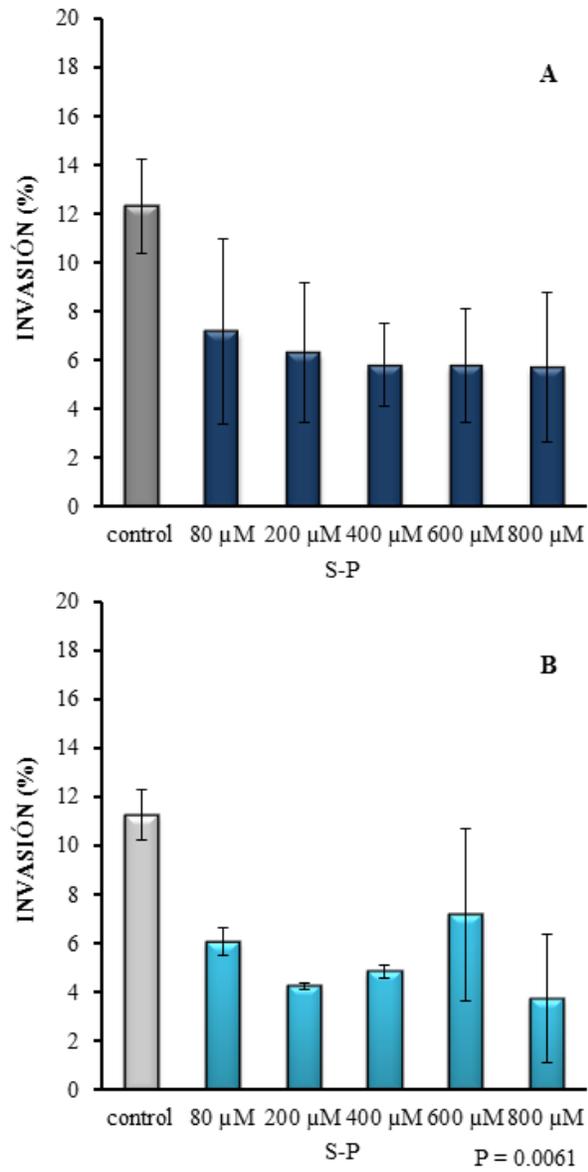
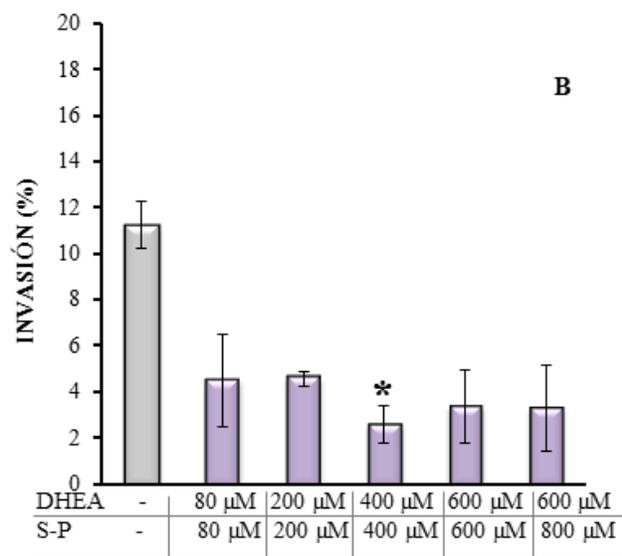
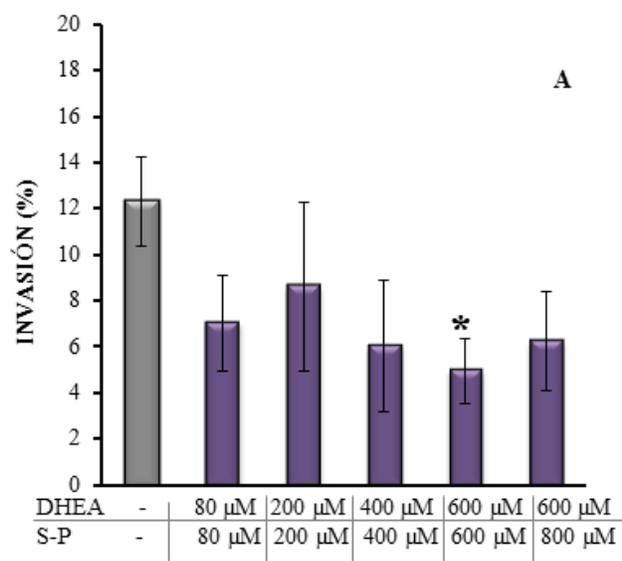


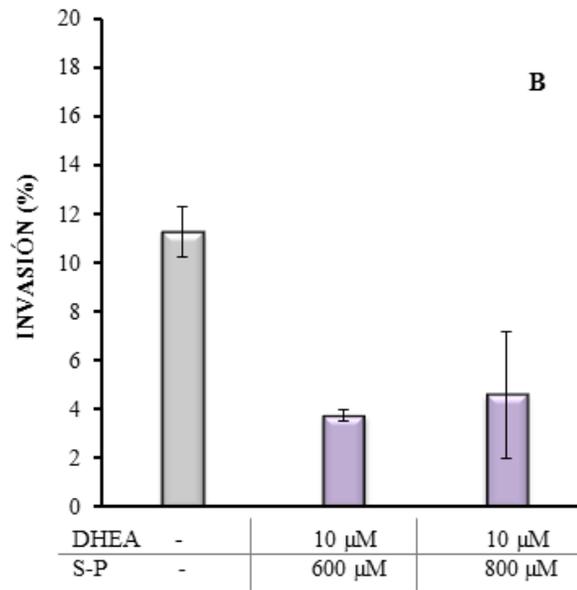
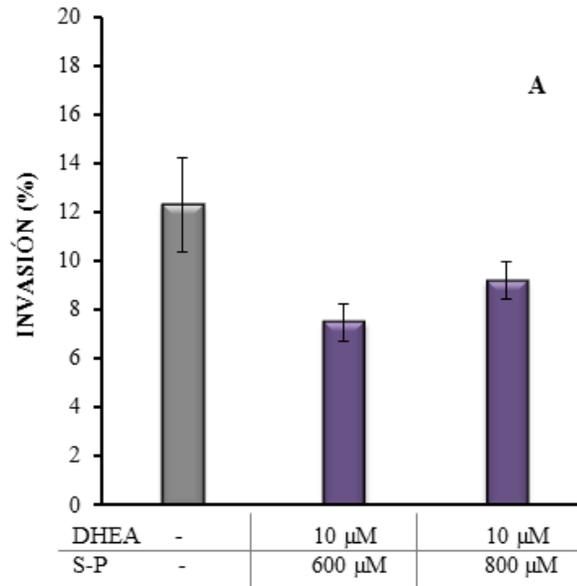
Figura 32. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con S-P. Porcentaje de células en cultivo que se encontraron invadidas por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes.



P = 0.0005

Figura 33. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos.

Porcentaje de células en cultivo que se encontraron invadidas por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).



P = 0.0005

Figura 34. Invasión de células Hep-2 por taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos.

Porcentaje de células en cultivo que se encontraron invadidas por uno o más tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, a diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes.

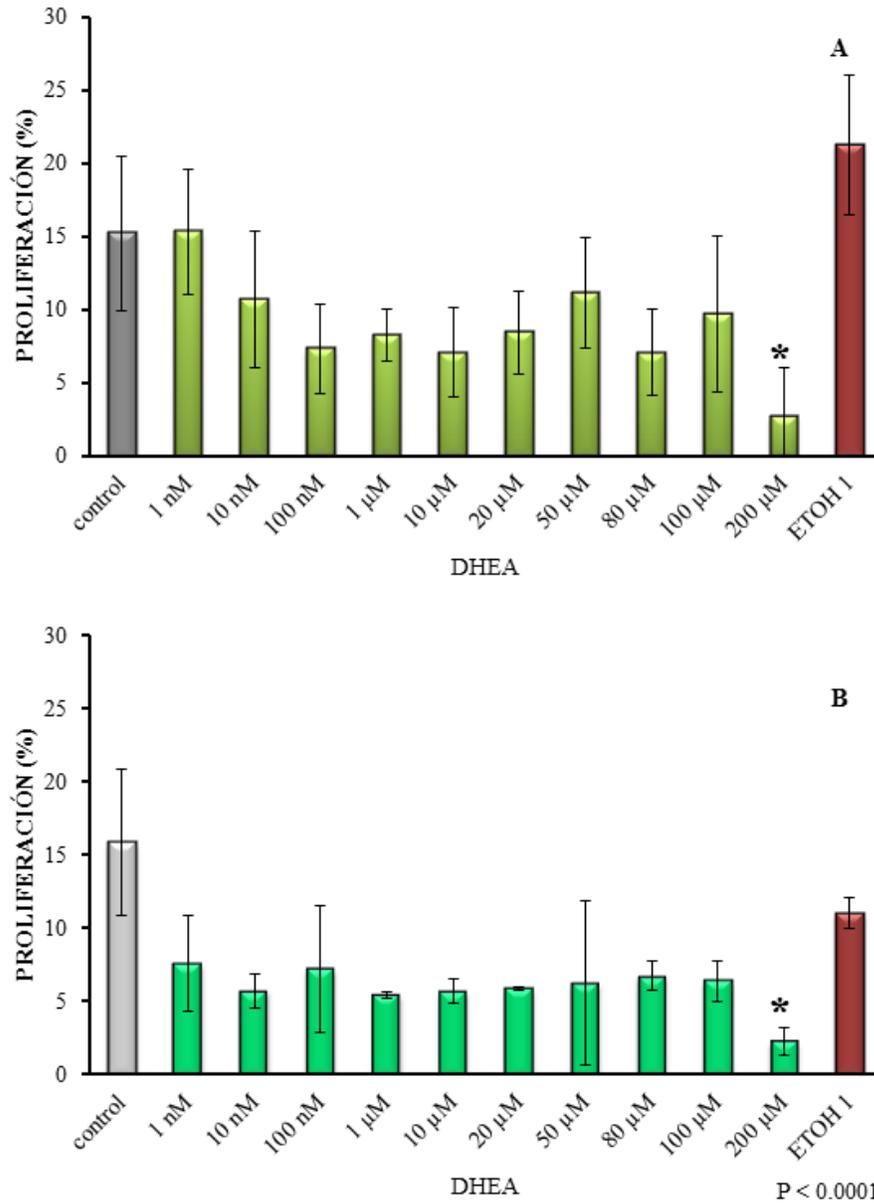


Figura 35. Proliferación de taquizoítos tratados con DHEA en células Hep-2.

Porcentaje de células en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de DHEA. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).

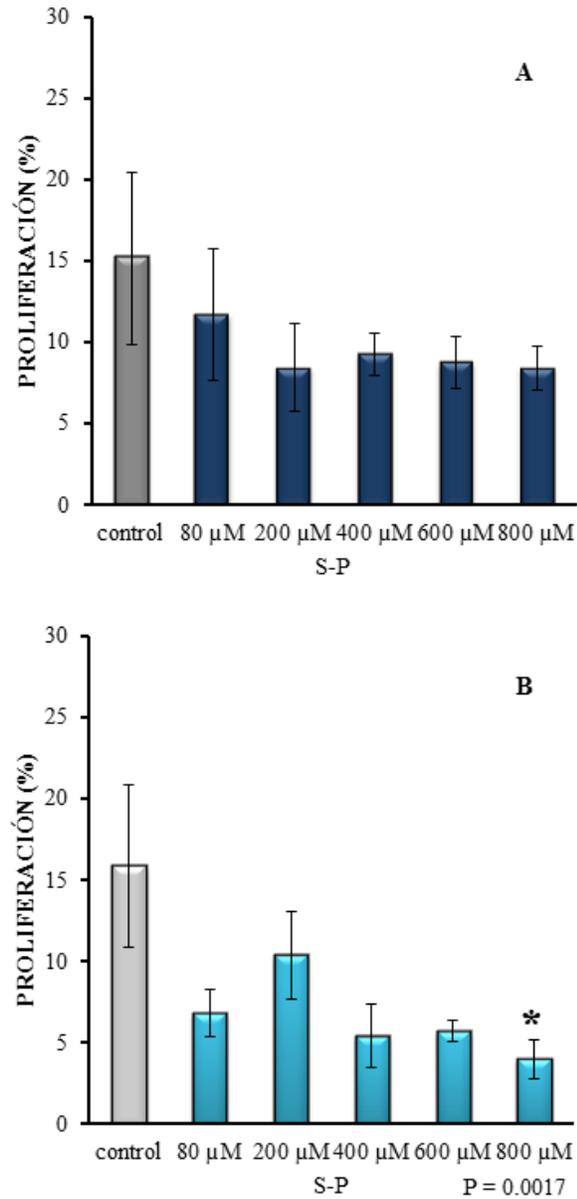
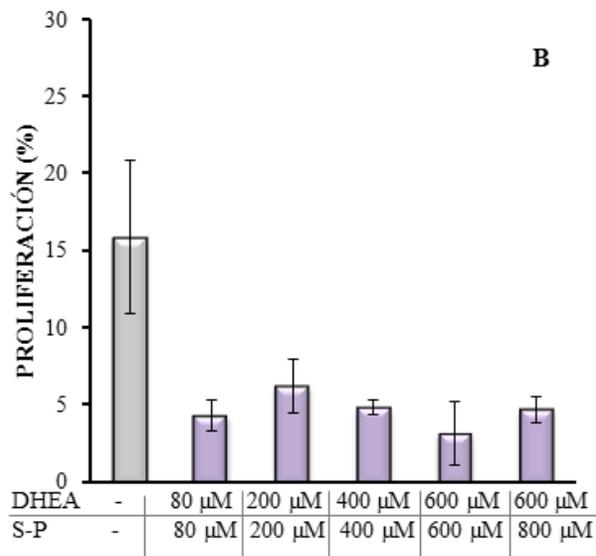
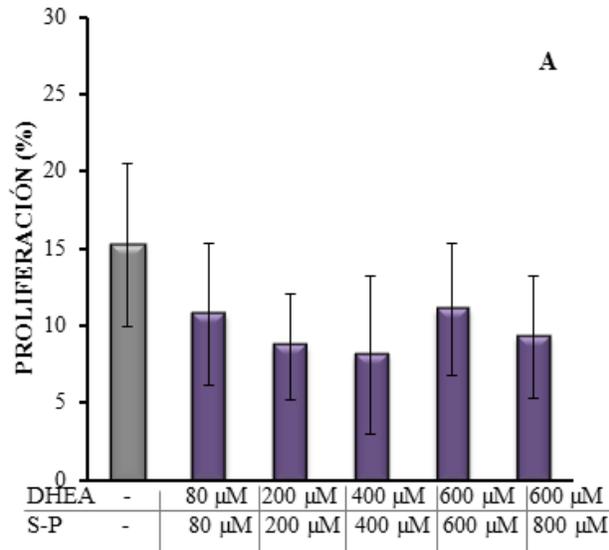


Figura 36. Proliferación de taquizoítos tratados con S-P en células Hep-2.

Porcentaje de células en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos por tiempo).



P = 0.01

Figura 37. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos en células Hep-2.

Porcentaje de células en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes.

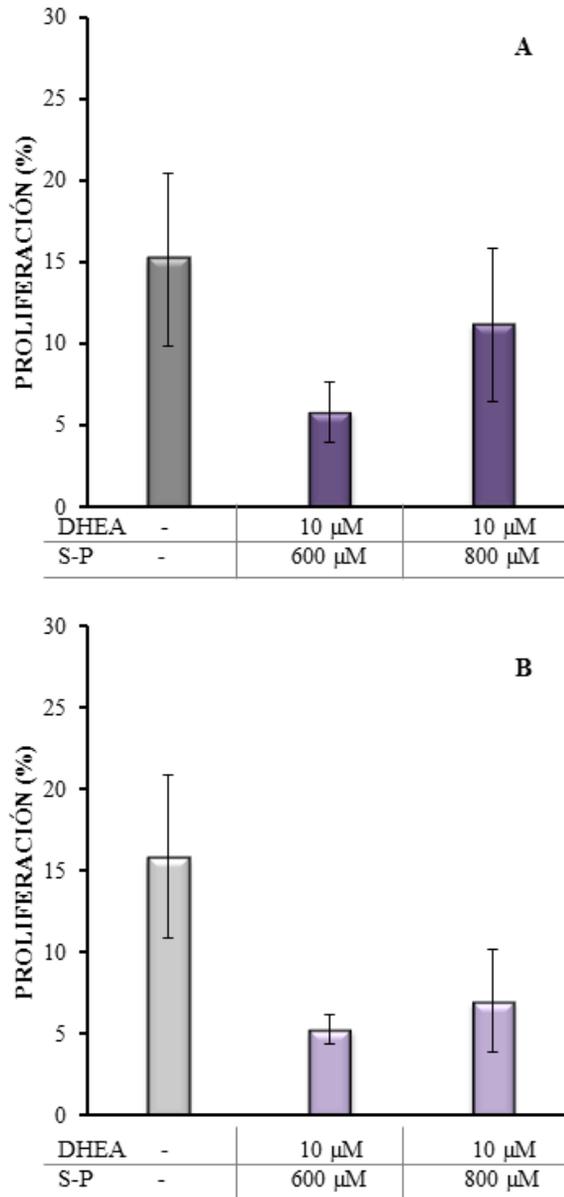


Figura 38. Proliferación de taquizoítos tratados con la combinación de ambos fármacos en células Hep-2.

Porcentaje de células en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas, con diferentes concentraciones de DHEA/S-P. Para cada barra se contaron 500 células por triplicado en experimentos independientes.

VIII.6. Modificaciones en el patrón proteico de taquizoítos extracelulares expuestos a la DHEA

VIII.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida de una dimensión.

Después de extraer, purificar y contar los taquizoítos, 20×10^6 parásitos fueron expuestos a las diferentes concentraciones de DHEA, S-P y DHEA/S-P, nuevamente por 30 min y 2 h. Al terminar el tiempo de exposición las muestras se centrifugaron, los pastillas de parásitos se resuspendieron en buffer de lisis celular y se obtuvo la proteína total de cada una de las muestras.

Realizamos geles de acrilamida al 10 y al 15 %, para poder observar el patrón de proteínas de alto y bajo peso molecular, respectivamente. Se colocaron 10 μ g de proteína total de cada muestra; y se corrieron en una cámara de electroforesis. Los geles resultantes se tiñeron con una solución de nitrato de plata, para revelar la presencia de las bandas correspondientes a las proteínas separadas por su peso molecular. La figura 39 muestra los corrimientos proteicos resultantes en geles al 10 % de acrilamida de tk's tratados con DHEA 30 min (Figura 39 A) y 2 h (Figura 39 B). A 30 min de exposición se pueden observar diferencias en el bandeo de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 260 y 50 kDa, se observa una pérdida en el número de bandas a medida que los tratamientos aumentan de concentración; finalmente se observan claras diferencias en el tratamiento combinado DHEA/S-P (Figuras 39 y 40).

VIII.6.2. Perfil proteómico por separación de proteínas en doble dimensión.

Se obtuvieron los perfiles proteómicos preliminares de los taquizoítos pretratados con DHEA 10 μ M, S-P 800 μ M y con ambos tratamientos 10/800 μ M de DHEA y S-P a los dos tiempos de incubación; ya que a estas molaridades fue donde se vieron cambios interesantes cuando se hizo la separación de proteínas por peso molecular. Los perfiles proteómicos muestran grandes diferencias comparándolos con el control en ambos tiempos de exposición, los spots que se obtuvieron de la proteína total extraída de taquizoítos tratados por 30 minutos muestran cambios en cada uno de los tratamientos (Figuras 41 y

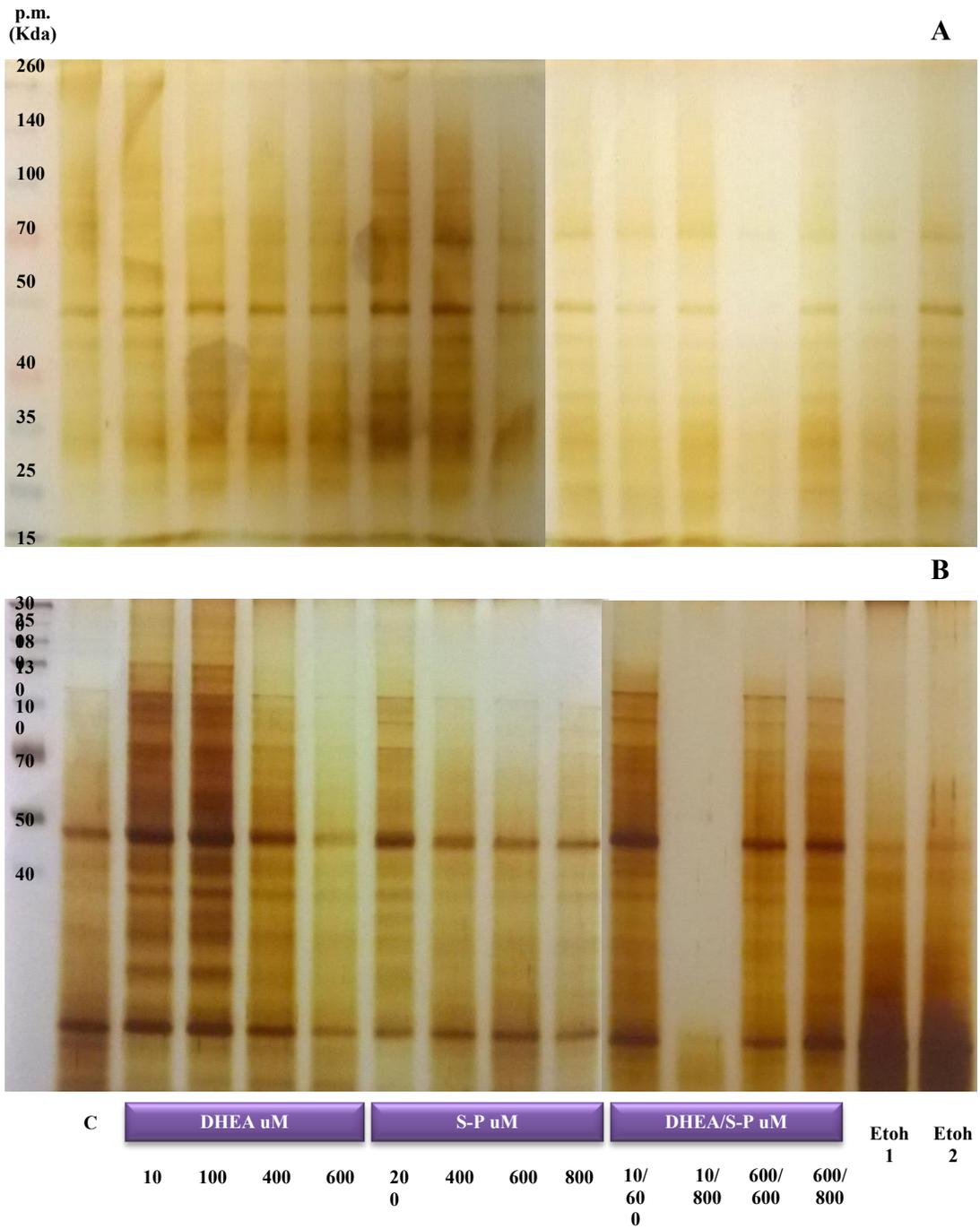


Figura 39. Perfil proteico del extracto total de tk's tratados en geles al 10%.
 Separación por peso molecular de proteínas totales de tk's tratados por **A.** 30 minutos y **B.** dos horas en geles de poliacrilamida al 10%.

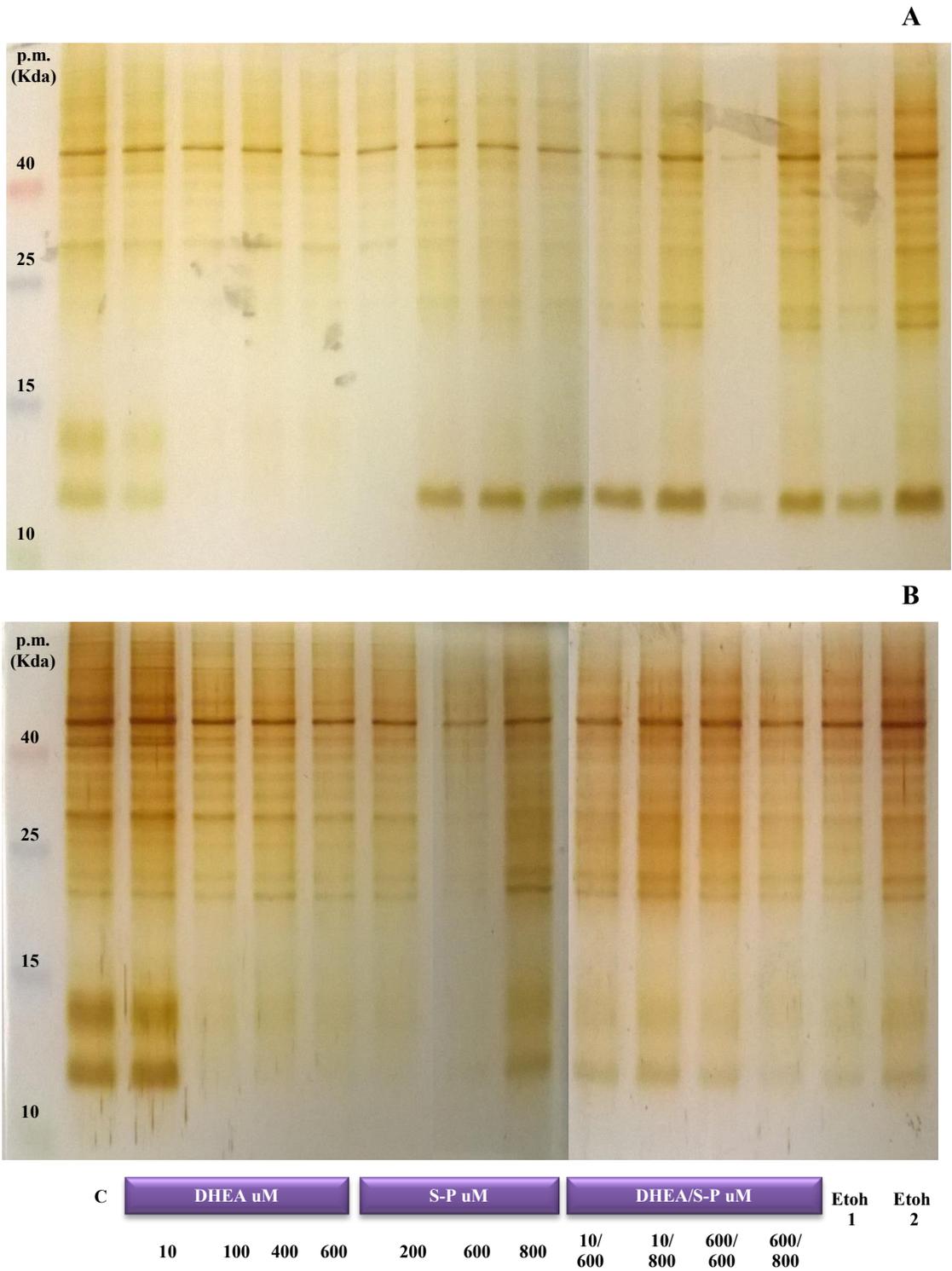


Figura 40. Perfil proteico del extracto total de tk's tratados en geles al 15%.
 Separación por peso molecular de proteínas totales de tk's tratados A. 30 minutos y B. dos horas en geles de poliacrilamida al 15%.

42) pero los spots que se obtuvieron de los extractos de taquizoítos tratados por dos horas muestran un cambio más drástico; se ve una disminución del número e intensidad de los spots (Figuras 43 y 44).

Las imágenes obtenidas de los geles de la separación por doble dimensión fueron analizadas en el programa PDQuest Advanced – 8.0.1 para determinar el número de spots (proteínas) y las diferencias entre los diferentes tratamientos y las distintas concentraciones. En el control de los taquizoítos tratados 30 minutos encontramos un total de 159 spots; mientras que en el tratamiento de 2 horas se encontraron 131, en forma general se observó que a las 2 horas en comparación a los 30 minutos el número de spots disminuyó en cada uno de los tratamientos así como en el control (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de spots obtenidos por extracto de taquizoítos pretratados 30 y 120 minutos

Tratamiento	Número de spots	
	30 minutos	120 minutos
Control	159	131
DHEA 10 μ M	165	130
S-P 800 μ M	126	89
DHEA/S-P 10/800 μ M	213	51

Cuando se realizó el análisis de los geles se elaboró un master en donde se incluyeron los spots de todos los tratamientos por tiempo de exposición (30 ó 2 horas), con el fin de analizar las diferencias en el perfil proteico de cada uno de los tratamientos en comparación con el control (Cuadro 4). A los 30 minutos, en el master con los spots de todos los tratamientos y del control, se encontró que del total de proteínas en el control 15 de estas se pierden cuando se pone el tratamiento con DHEA 10 μ M, S-P 800 μ M o la combinación de ambos; las cuáles se encuentran agrupadas en dos conjuntos, una con siete proteínas en su mayoría ácidas con pesos moleculares de 10 a 25 kda y 8 proteínas básicas con pesos moleculares de 20 a 100 kda (Figura 45 A). Para el caso del tratamiento a 2 horas fueron 34 proteínas las que se perdieron al exponer a los parásitos con cada uno de los tratamientos;

este conjunto de 34 proteínas se encontraron distribuidas en todo el universo de spots, con un pH de aproximadamente 4 a 9 y con pesos moleculares de 10 a 70 kda (Figura 45 B).

En general, todas las proteínas de los tk's tratados con cada uno de los tratamientos y tiempos de exposición mostraron perfiles proteómicos con pesos moleculares que van de los 10 a los 100 kda y con un pH de 3 a 10.

Cuadro 4. Diferencias en el número de spots de cada uno de los tk's tratados por 30 y 120 minutos en comparación con el control

Tratamiento	30 minutos		120 minutos	
	Spots iguales a control	Spots diferentes a control	Spots iguales a control	Spots diferentes a control
Control	159		131	
DHEA 10 uM	105	60	90	40
S-P 800 uM	99	27	32	57
DHEA/S-P 10/800 uM	113	100	11	40
Total de Spots	289	15	201	34

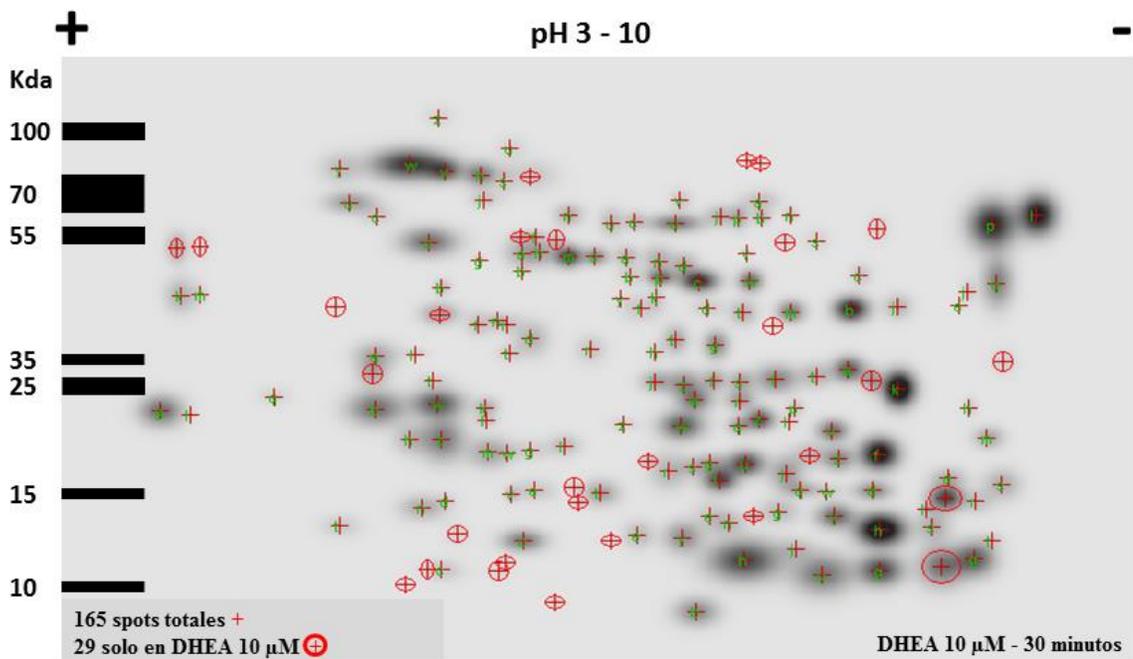
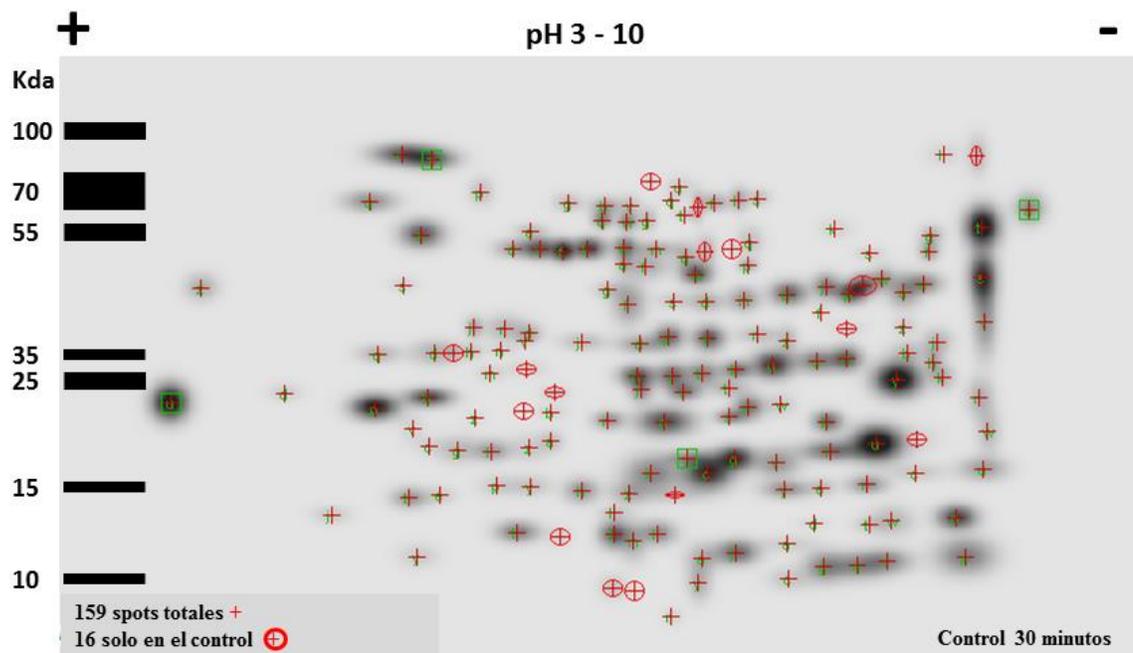


Figura 41. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 30 minutos con DHEA.

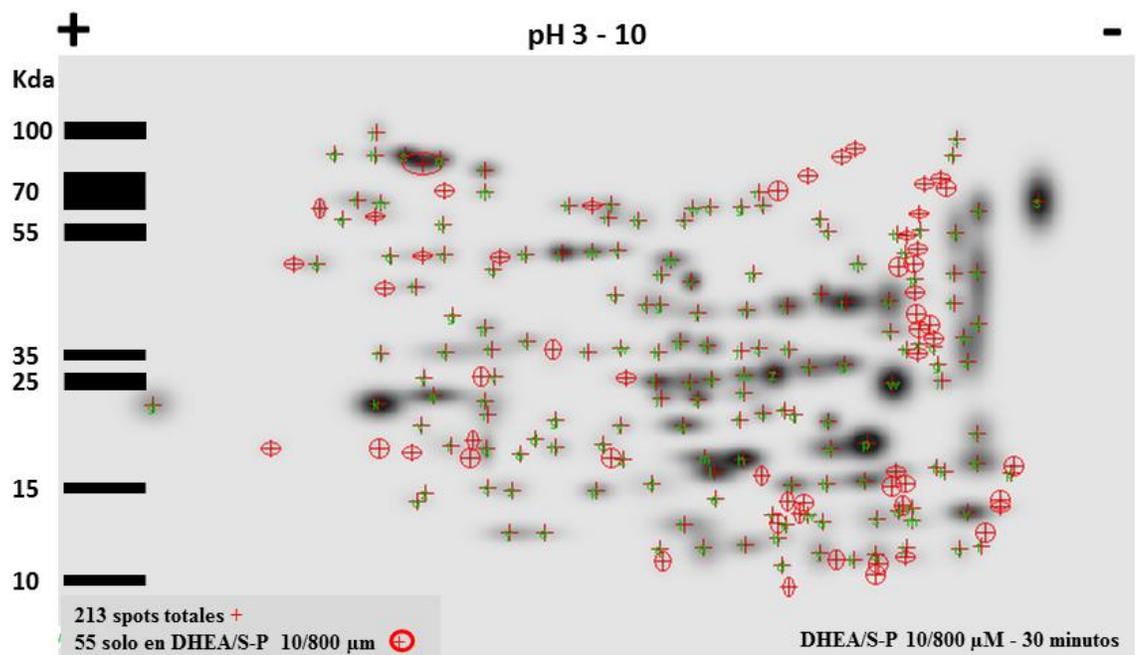
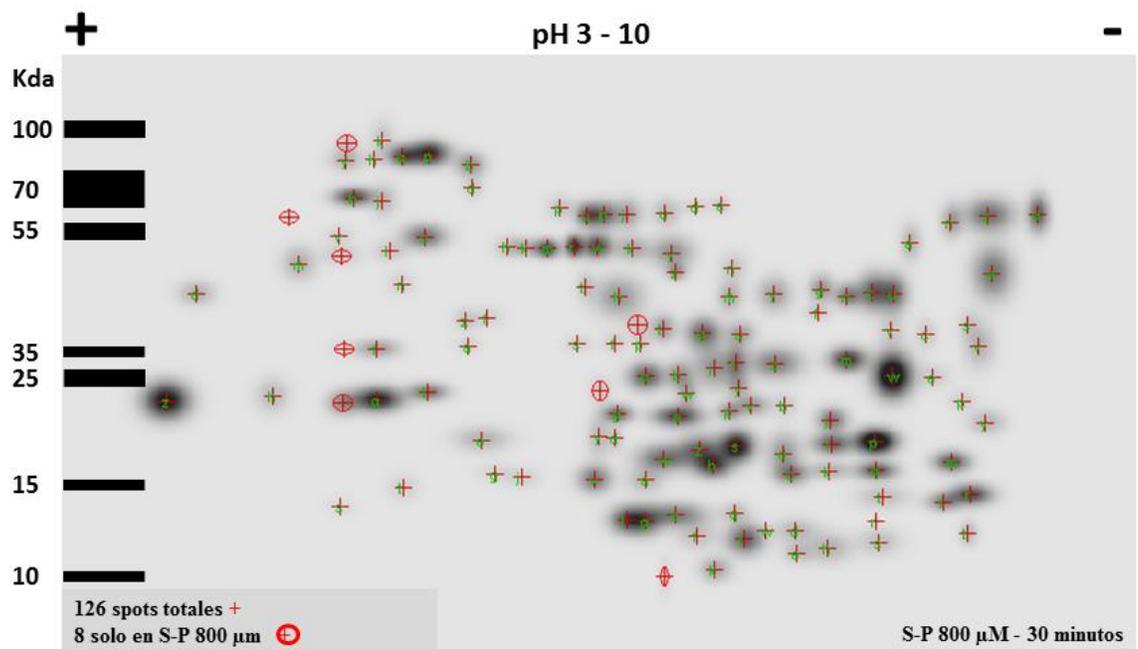


Figura 42. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 30 minutos con S-P y DHEA/S-P.

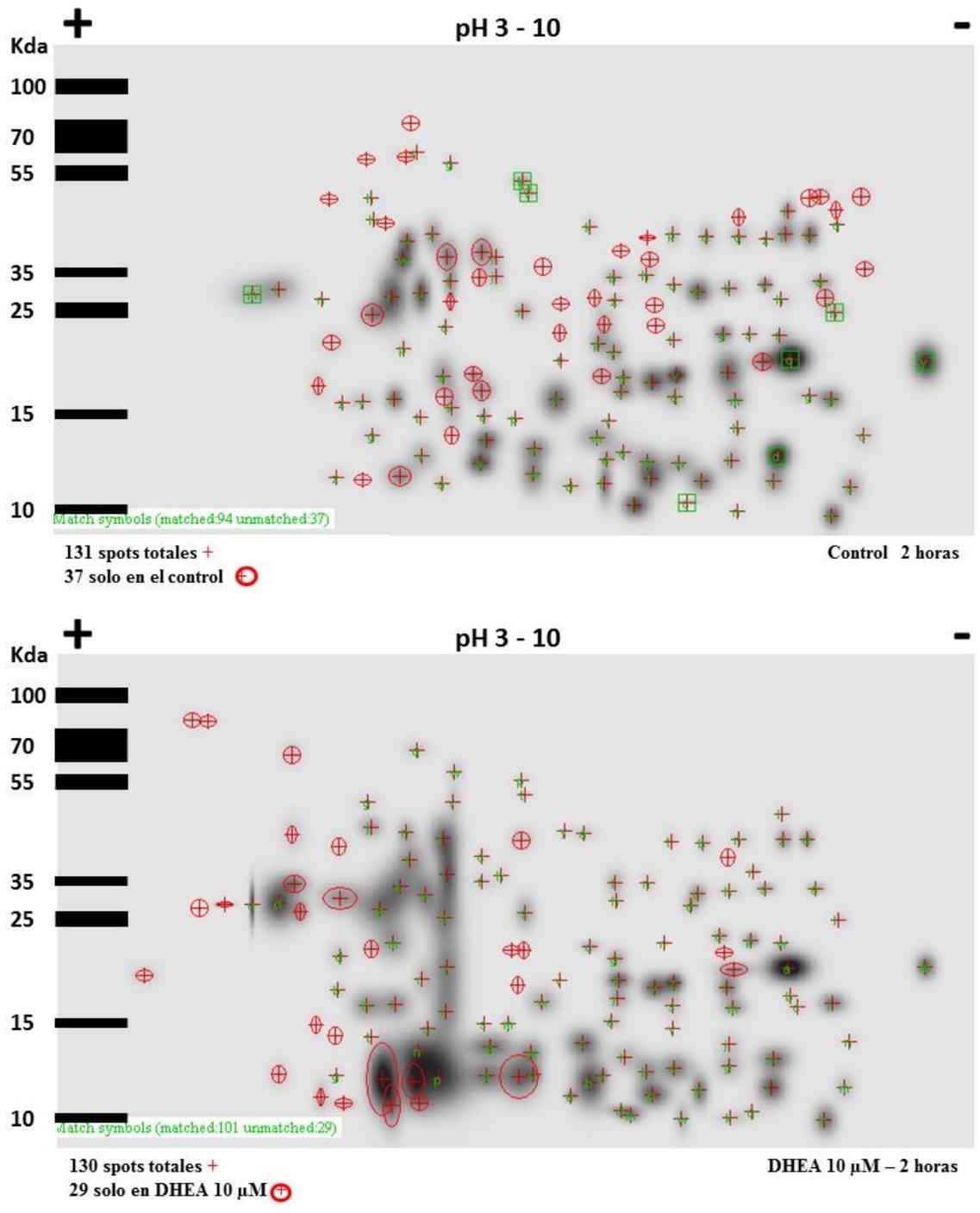


Figura 43. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 2 horas con DHEA.

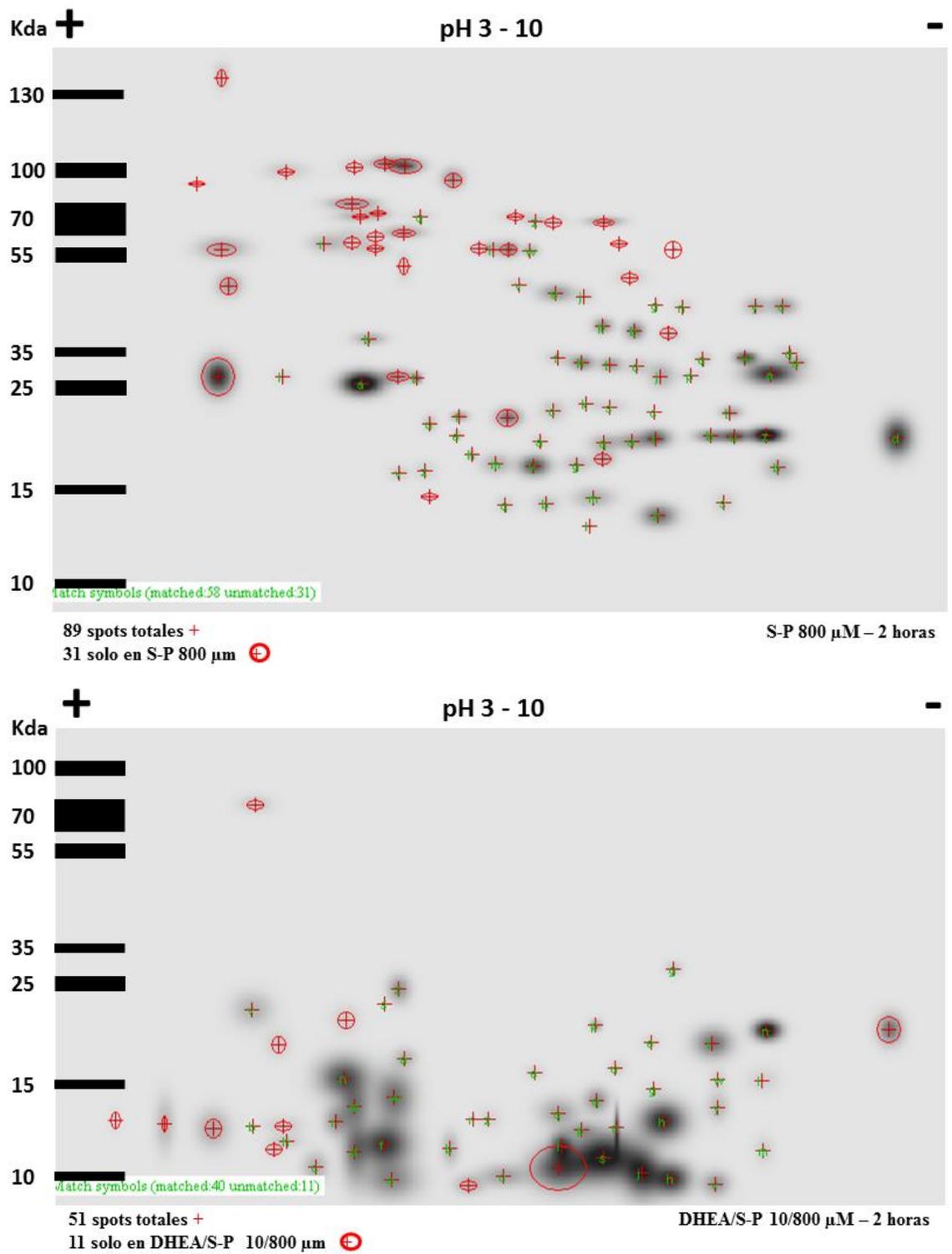


Figura 44. Separación proteómica en doble dimensión del extracto proteico total de tk's tratados 2 horas con S-P y DHEA/S-P.

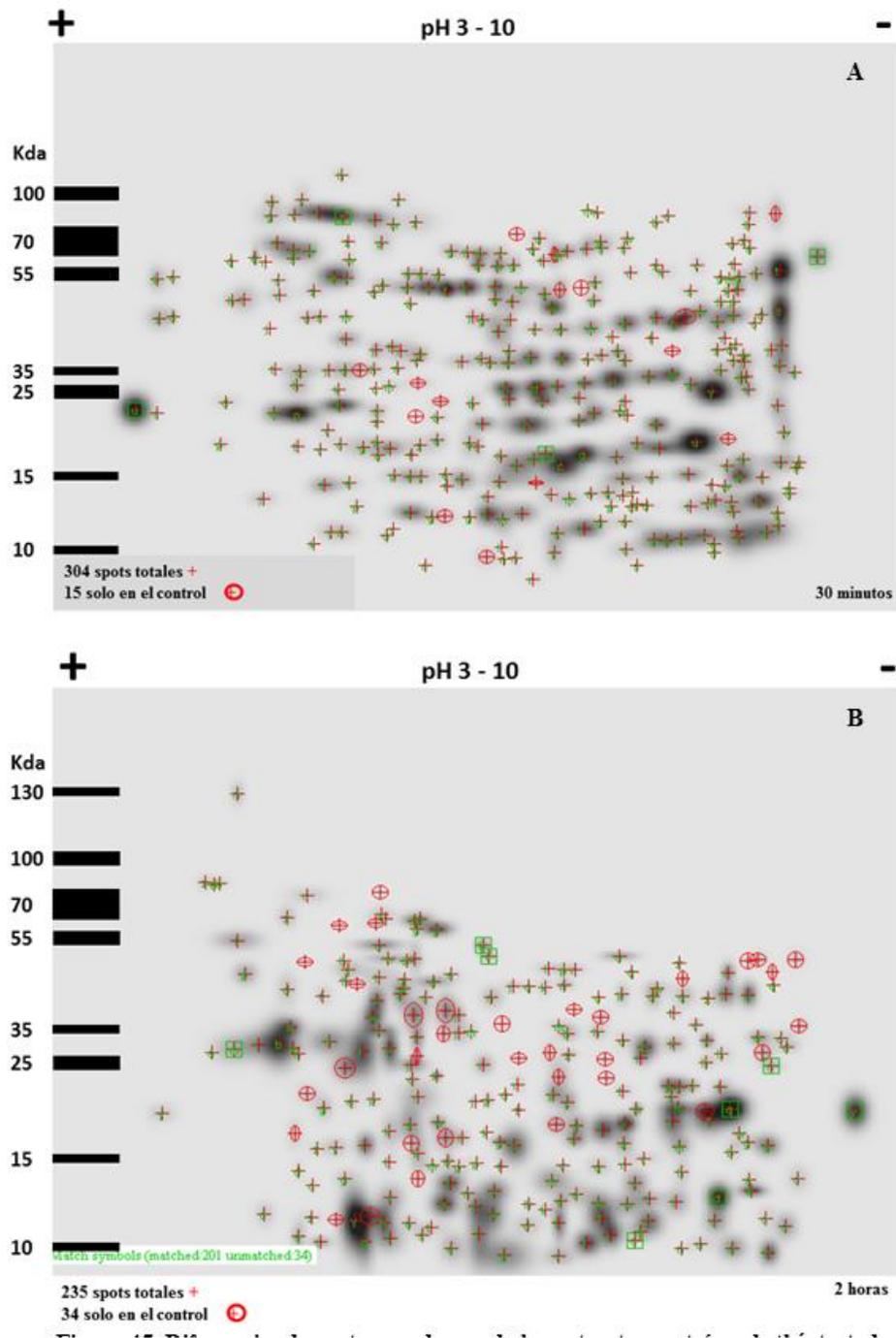


Figura 45. Diferencias de spots en cada uno de los extractos proteicos de tk's tratados con DHEA, S-P o la combinacion de ambos.

Masters donde se observa el empalme de cada gel por tratamiento a **A.** 30 minutos y **B.** 2 horas para observar la pérdida de proteínas respecto al control.

VIII.7. Diferencias ultraestructurales de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA.

Las imágenes obtenidas en el MET mostraron que los taquizoítos extracelulares tratados con cada uno de los tratamientos empleados (DHEA, S-P y la combinación de ambos) tienen un efecto diferente en la morfología del taquizoíto respecto a los controles a cada concentración y tiempo empleado (30 y 2 horas).

De manera general, los tratamientos indujeron diferentes cambios en la morfología de los tk's tratados; se observó modificación de la membrana, hubo una pérdida de la polaridad de la célula, desorganización de los organelos, la forma de los parásitos se perdió con el tratamiento; mostrándose en forma ovoide, todos los tratamientos indujeron la extrucción del conoide y se observó el vaciamiento de gránulos densos en diferente proporción de acuerdo al tratamiento.

El control a los 30 y 2 horas (Figura 46) tienen una forma normal de media luna; con la membrana plasmática bien definida, el conoide en reposo, los parásitos tienen una distribución normal de los organelos; las roptrías con una forma de bastón y estructura normal con el cuello denso y el cuerpo granulado, los micronemos se observan en la parte anterior del cuerpo del parásito, se observan algunos gránulos de almidón, gránulos densos distribuidos en la parte anterior en los tk's del control a los 30 minutos (Figura 46A y B); mientras que a los 2 horas los gránulos están distribuidos en todo el cuerpo del parásito; en ambos casos se ve vaciamiento de los mismos; pero en el control de 2 horas (Figura 46C y D) el vaciamiento es mucho mayor, el núcleo en ambos casos se observa en la parte posterior del cuerpo del taquizoíto; con la membrana bien definida y la cromatina (eucromatina y heterocromatina) visible, la única mitocondria del parásito se observa junto al núcleo con una estructura de sus crestas normal y no se ve el retículo endoplásmico en ninguno de los cortes obtenidos, en los cortes se pudo ver algún fantasma esporádico de taquizoíto con el conoide en estado de reposo.

Los parásitos empleados para el control de ETOH (Figura 47) mostraron una morfología parecida a los controles, la forma del parásito a los 30 minutos (Figura 47A y B) fue de media luna, ligeramente alargados, con la membrana definida y regular; el conoide se encontró extruido, roptrías con su morfología normal, gránulos densos en todo el cuerpo del parásito con vaciamiento considerable de los mismos, micronemos ubicados

en la parte anterior, presencia de gránulos de almidón, el núcleo en la parte posterior con la membrana visible y la cromatina visible, mitocondria junto al núcleo y el retículo endoplásmico visible junto al núcleo con la estructura normal, se observan algunos fantasmas con el conoide extruido. Los tk's tratados por 120 min (Figura 47 C y D) con ETOH tuvieron una forma alargada, con la membrana definida y regular, el conoide muy extruido, el resto de los organelos mostraron una morfología similar a los tk's tratados por 30 min con ETOH.

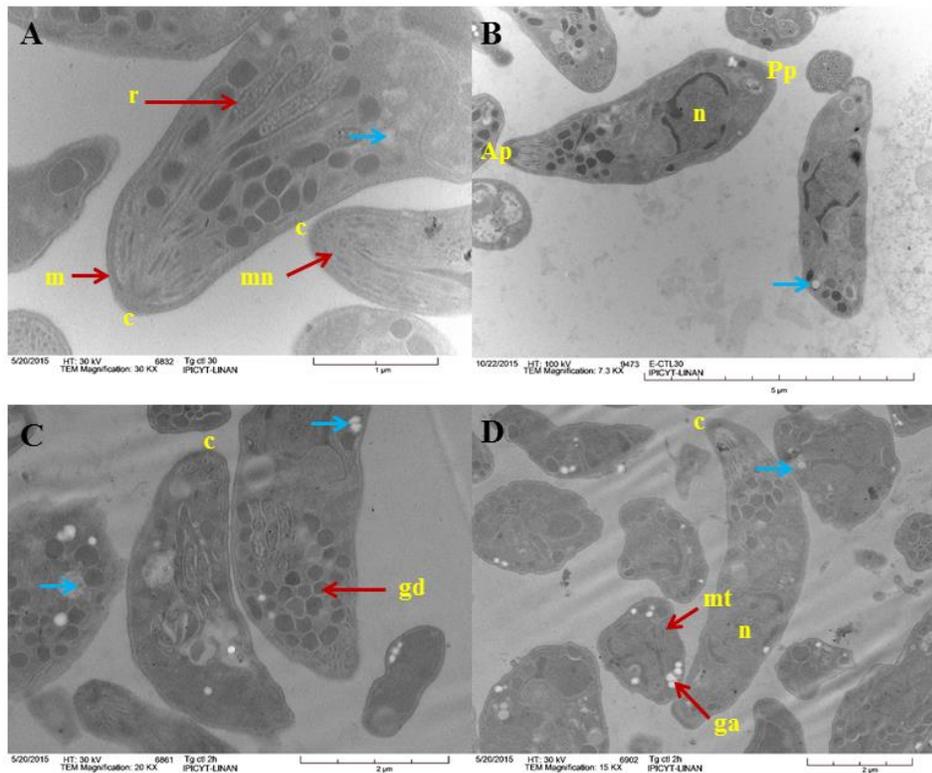


Figura. 46. Morfología de taquizoítos de *T. gondii*.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos sin tratamiento. A y B. control 30 minutos, C y D. control 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granulado y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), mitocondria (mt), gránulos de almidón (ga), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

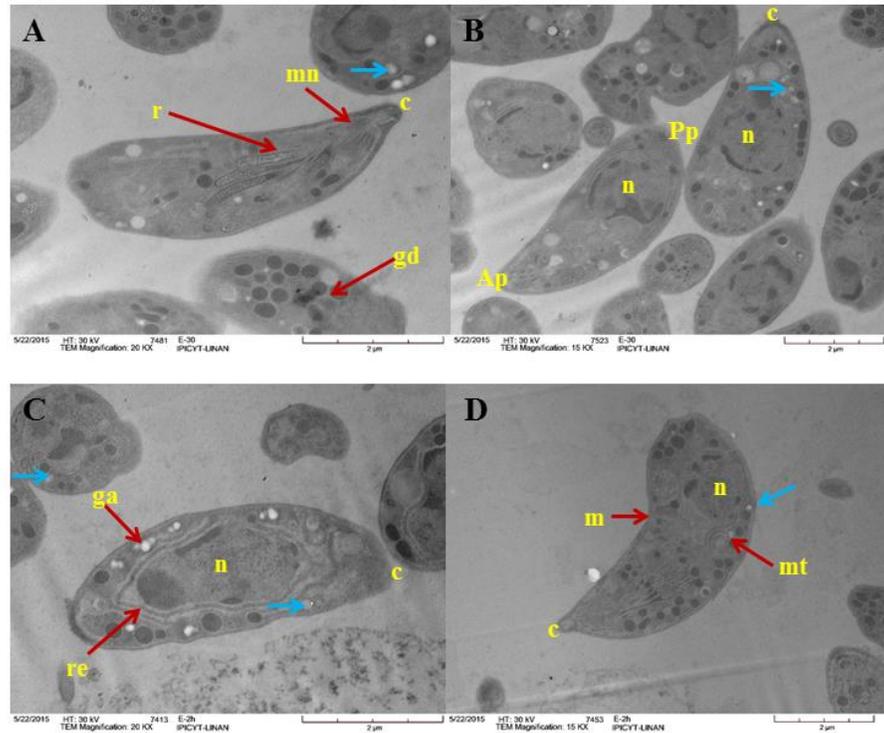


Figura. 47. Morfología de taquizoítos de *T. gondii*.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con ETOH. A y B. control 30 minutos, C y D. control 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granulado y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), mitocondria (mt), gránulos de almidón (ga) retículo endoplásmico (re), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

Los parásitos tratados con DHEA a cualquier concentración y tiempo empleado presentan una forma del cuerpo ovoide con la membrana con irregularidades y en forma ameboide; para el caso del tratamiento con S-P la forma de los parásitos fue en general alargada con algunos en forma ovoide, con la membrana irregular en forma ameboide, los tk's tratados con 800 µM de S-P por dos horas presentaron una morfología completamente deforme y alargada; y los tk's tratados con la combinación de ambos fármacos DHEA/S-P la forma del parásito fue tanto ovoide como alargada con la membrana irregular.

Cabe destacar que se observó la formación de vacuolas en el exterior de la membrana en los parásitos tratados con DHEA 10 µM por 30 minutos (Figura 48) y 400 µM (Figura

50 C y D) por dos horas; mientras que los parásitos tratados por 30 minutos con 400 μM (Figura 50 A) de DHEA se observa una separación de la triple membrana del parásito.

En todos los tratamientos y condiciones utilizadas el conoide se observó en forma extruida. Ninguno de los tratamientos, concentración y tiempo empleado afectó morfológicamente a las roptrías, ya que en todas las imágenes analizadas la estructura se observó de forma normal; de igual manera, el núcleo se observa en todas las imágenes en forma normal, con la membrana definida y con la cromatina visible; excepto en el caso del tratamiento con DHEA 100 μM por 30 minutos (Figura 49 A y B), donde se observa una separación de la doble membrana nuclear. La mitocondria en los casos donde se pudo observar se encuentra junto al núcleo y se pueden apreciar las crestas bien definidas. El retículo endoplásmico en general no pudo ser visualizado en los cortes; solo en algunos cortes de los tk's tratados con DHEA 10 μM 30 minutos y 600 μM 2 horas en ambos casos la estructura del retículo endoplásmico se observó de forma normal.

Los gránulos densos se observaron en todo el cuerpo de parásito con vaciamiento de los mismos en todos los tratamientos empleados, en las concentraciones donde se observó un mayor vaciamiento fue en los tk's tratados con DHEA 100 μM 30 minutos (Figura 49 A y B). Los micronemos se observaron principalmente como pequeñas estructuras alargadas ubicadas principalmente en la parte anterior del cuerpo del parásito en todas las concentraciones y tiempos empleados. Como se mencionó en el caso del control se vieron gránulos de almidón (gránulos blancos muy refringentes) en todo el cuerpo del taquizoíto dependiendo del tratamiento, concentración y tiempo de exposición; en general en todas las condiciones se vio aumentados estos gránulos; en el tratamiento con S-P 200 μM por 30 min (Figura 52 A y B) es donde se ve la mayor concentración de estos gránulos.

Uno de los efectos que se analizó con más detalle fue la pérdida de polaridad de los parásitos y aunado a esto la desorganización de los organelos; con el tratamiento con DHEA la pérdida de la polaridad se observó a 10 μM 120 min (Figura 48 C y D), 400 μM 30 y 120 min (Figura 50), 600 μM 30 min (Figura 51 A y B); con S-P (Figura 52 y 53) y en el tratamiento combinado (DHEA/S-P) (Figura 54-57) en todas las concentraciones y tiempos de exposición se vio una pérdida de la polaridad y desorganización de los organelos.

El tratamiento con DHEA 400 μ M por 30 minutos (Figura 50 A y B) y 600 μ M por 2 horas (Figura 51 C y D) se observan muchos fantasmas; es decir, muchos parásitos muertos con un vaciamiento total de los organelos, los cuales solo tienen la membrana bien definida.

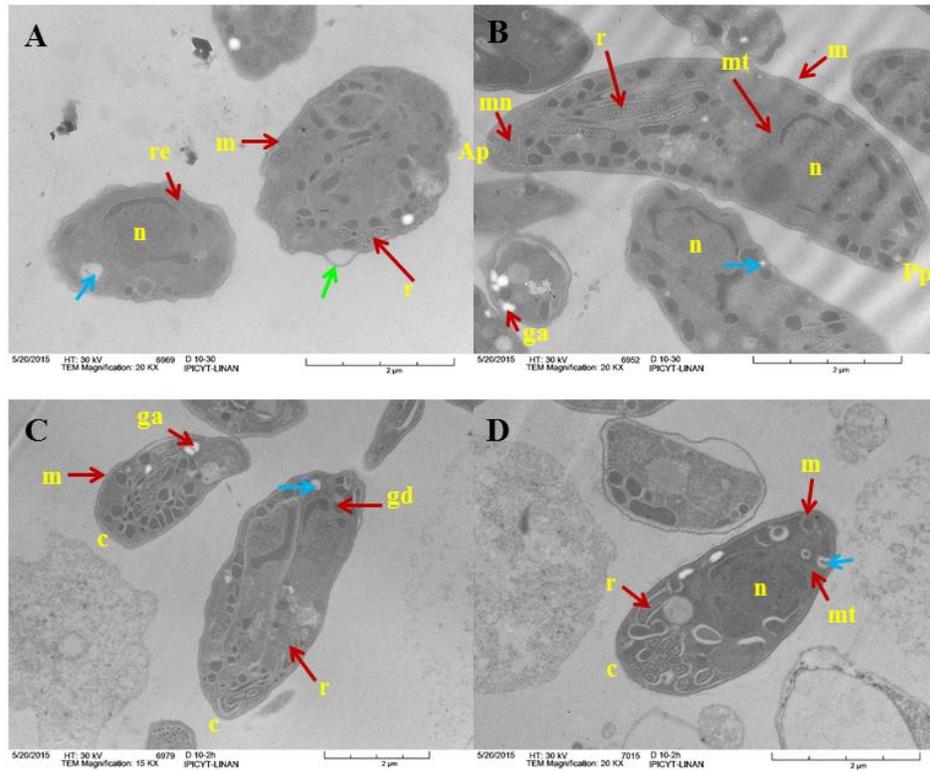


Figura. 48. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA 10 μ M.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA 10 μ M. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granuloso y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), mitocondria (mt), gránulos de almidón (ga) retículo endoplásmico (re), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos, flecha verde muestra formación de vacuolas al exterior de la membrana plasmática.

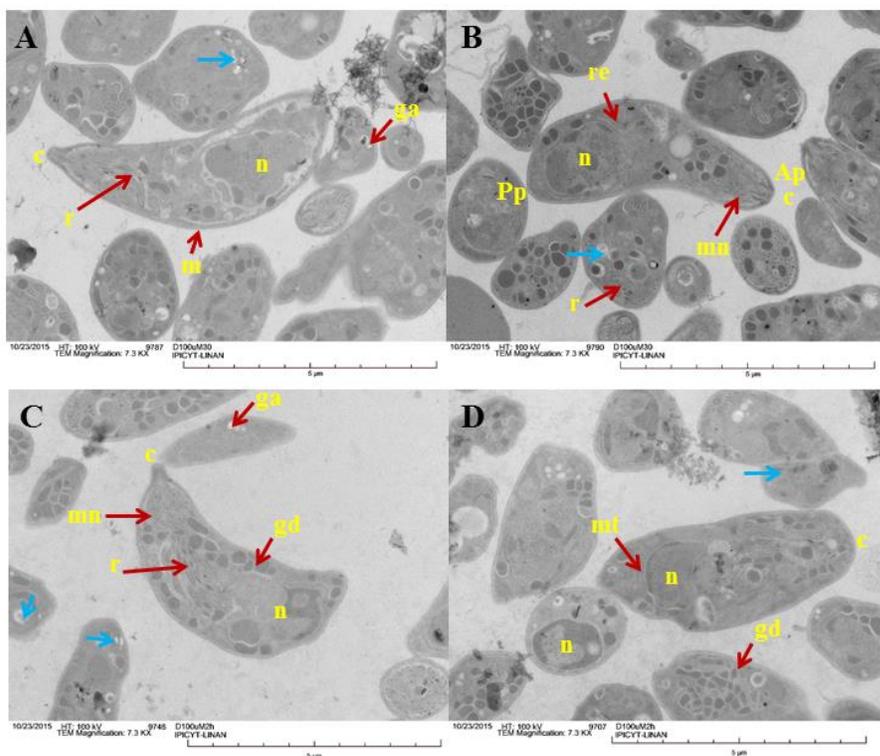


Figura. 49. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA 100 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA 100 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granuloso y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), mitocondria (mt), gránulos de almidón (ga) retículo endoplásmico (re), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

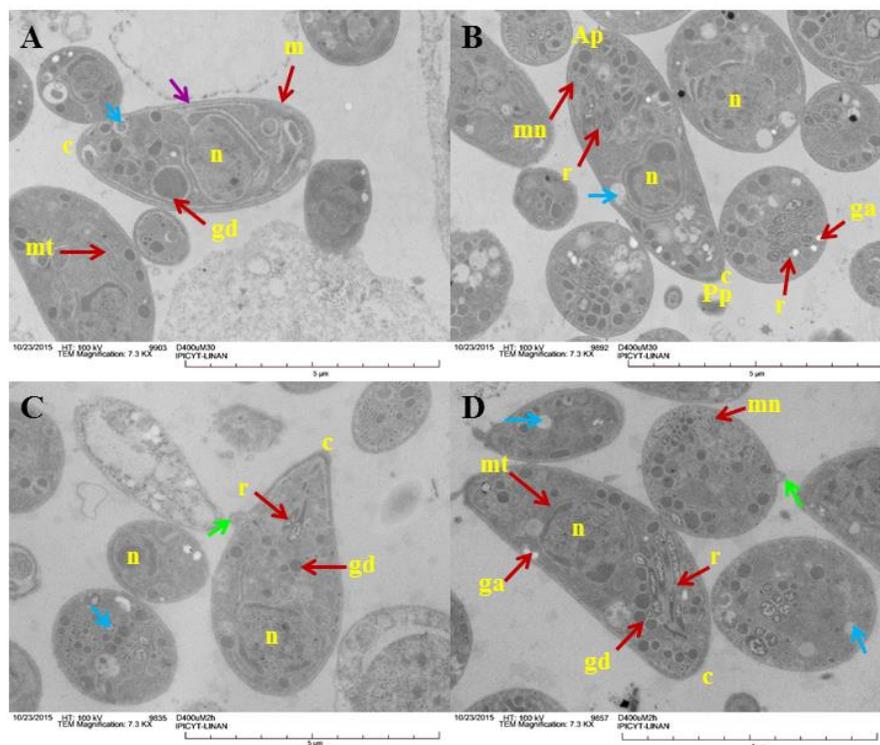


Figura. 50. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA 400 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA 400 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granuloso y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), mitocondria (mt), gránulos de almidón (ga), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos, flecha morada muestra separación de la triple membrana del parásito (películo), flecha verde muestra formación de vacuolas al exterior de la membrana plasmática.

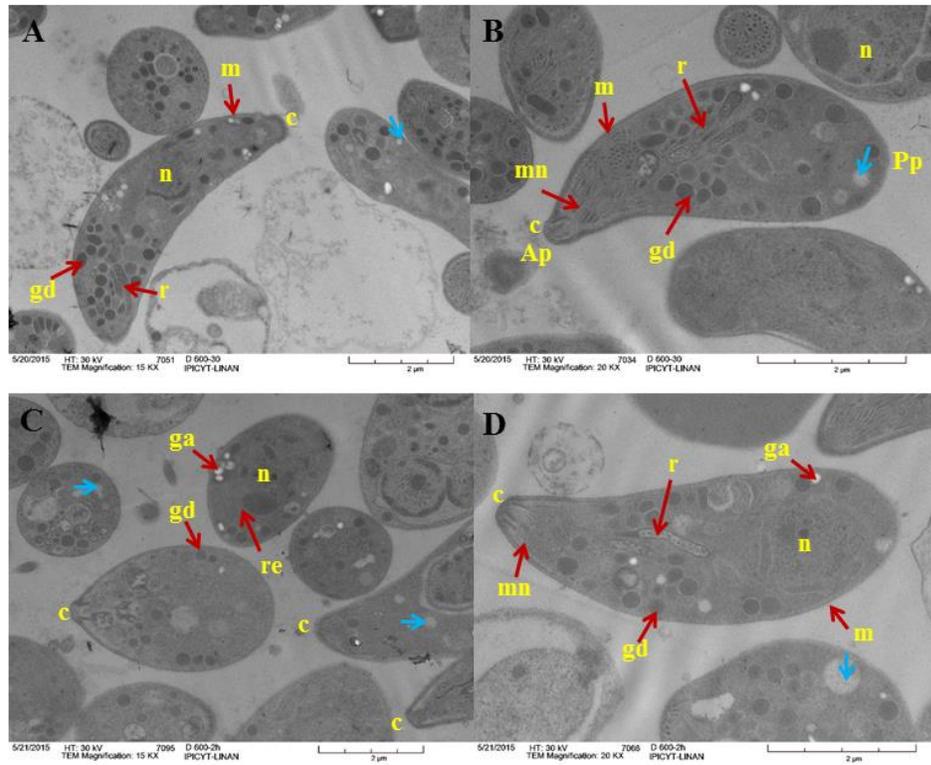


Figura. 51. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA 600 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA 600 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granuloso y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), gránulos de almidón (ga) retículo endoplásmico (re), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

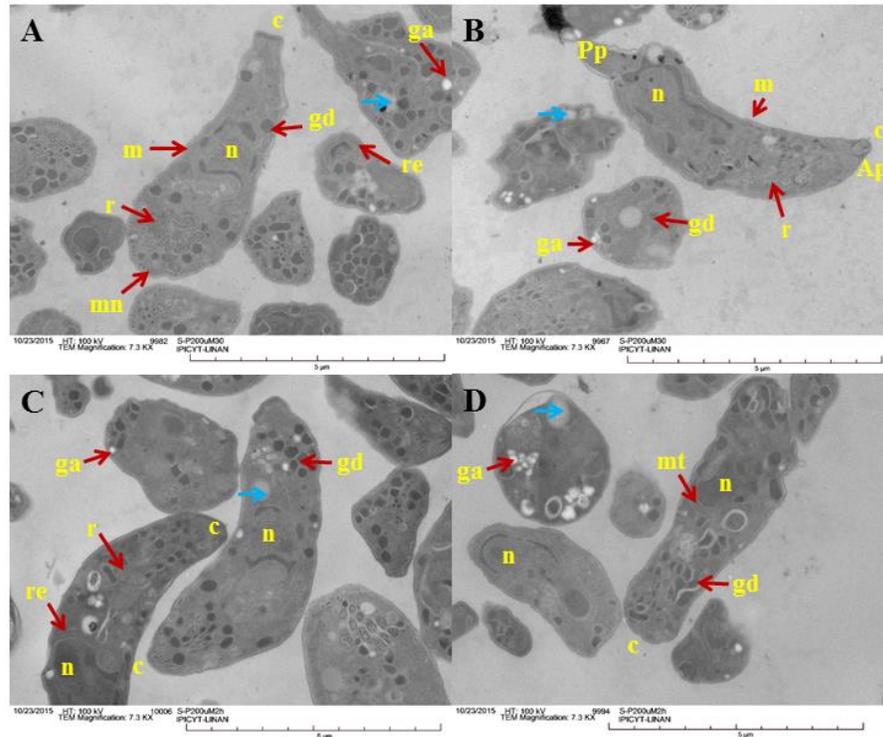


Figura. 52. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con S-P 200 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con S-P 200 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granuloso y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), mitocondria (mt), gránulos de almidón (ga) retículo endoplásmico (re), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

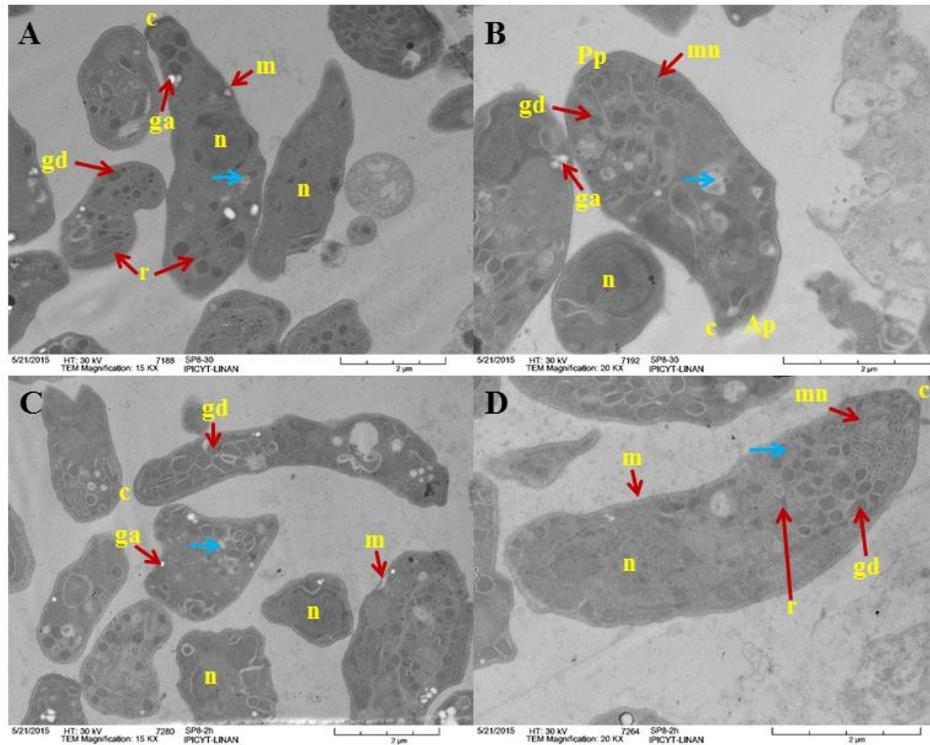


Figura. 53. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con S-P 800 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con S-P 800 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrias (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) euromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granuloso y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), gránulos de almidón (ga), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

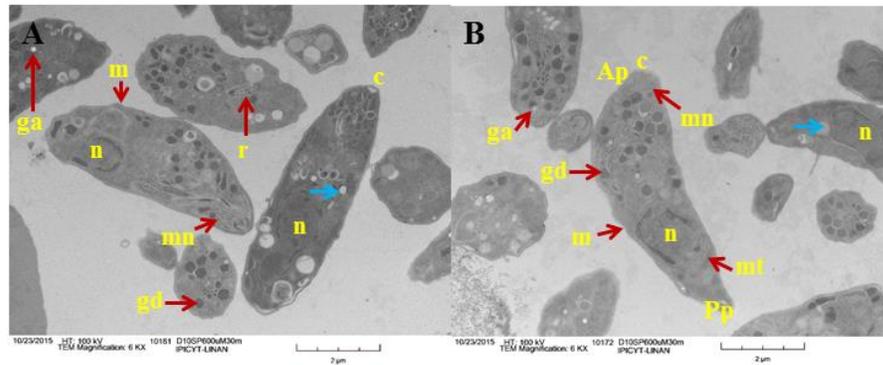


Figura. 54. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA/S-P 10/600 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA/S-P 10/600 uM. A y B. tratamiento 30 minutos. Roptrías (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granulado y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), gránulos de almidón (ga), mitocondria (mt), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

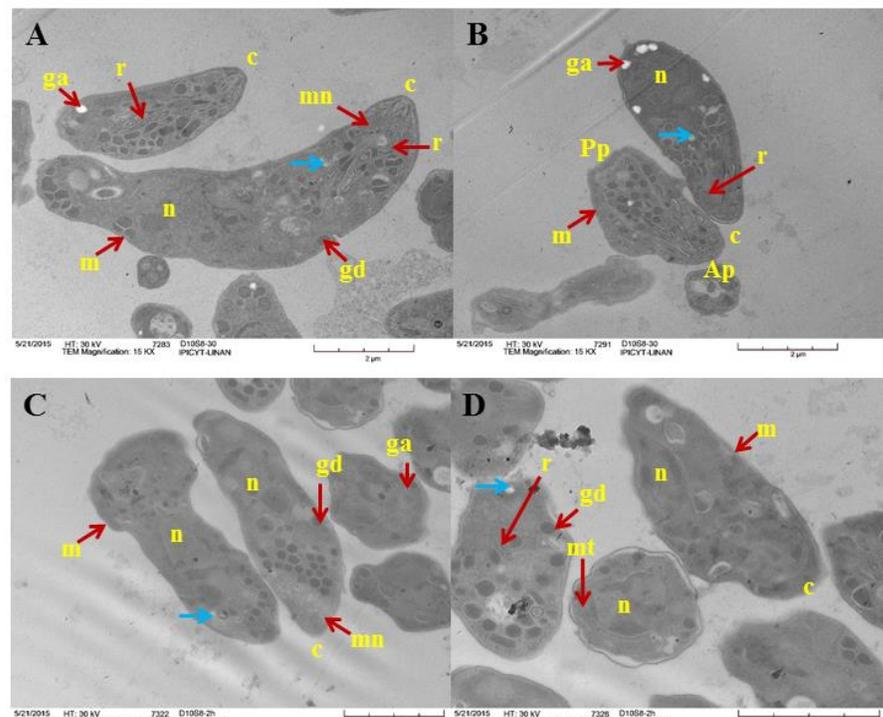


Figura. 55. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA/S-P 10/800 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA/S-P 10/800 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrías (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granulado y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), gránulos de almidón (ga), mitocondria (mt), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

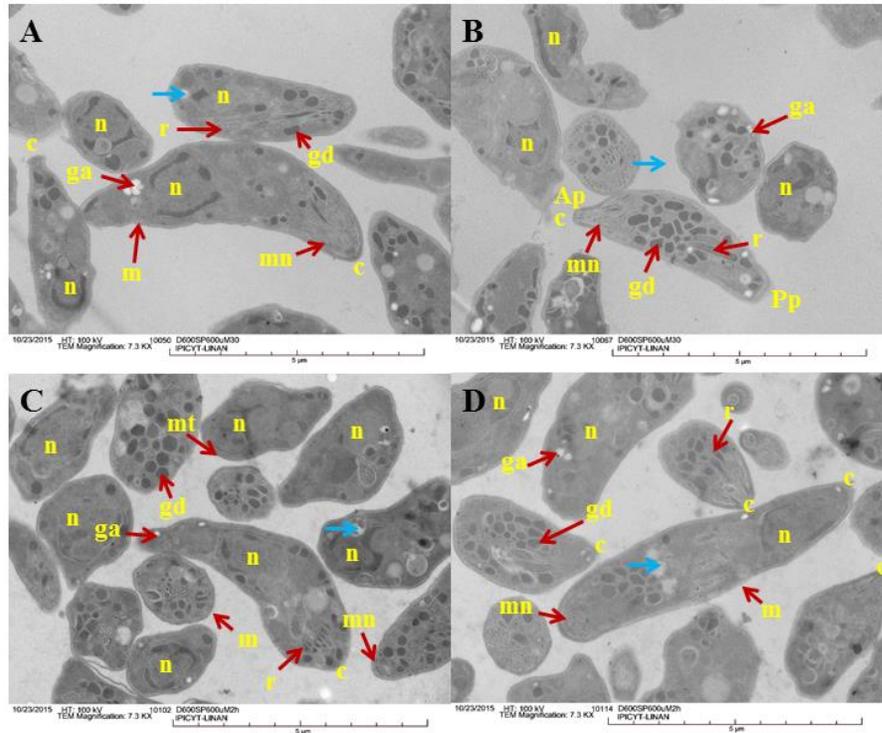


Figura. 56. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA/S-P 600/600 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA/S-P 600/600 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrías (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granulado y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), gránulos de almidón (ga), mitocondria (mt), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

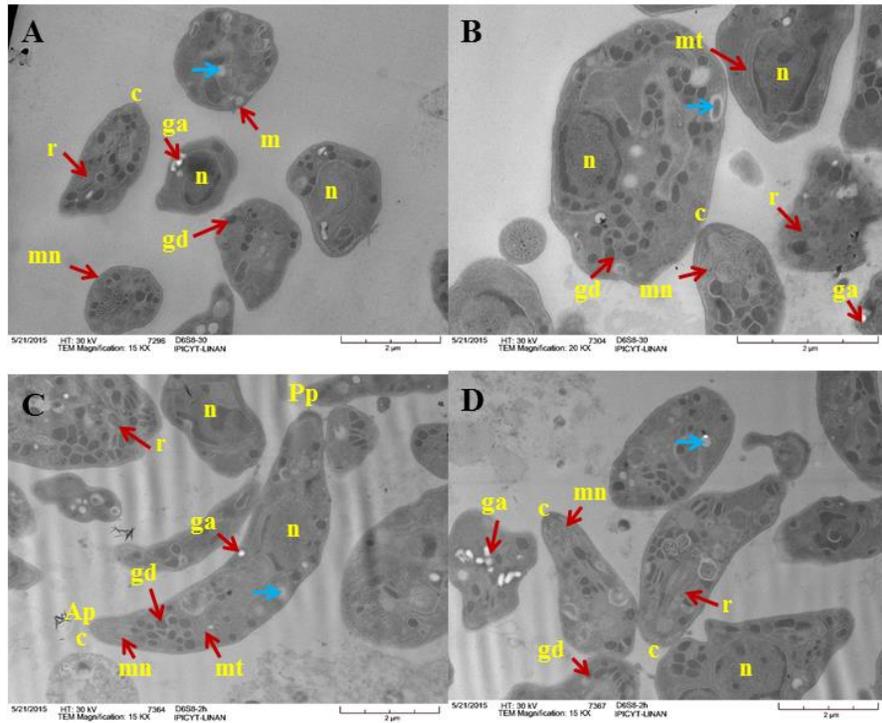


Figura. 57. Morfología de taquizoítos de *T. gondii* tratados con DHEA/S-P 600/800 uM.

Micrografía de corte fino donde se observa la morfología de taquizoítos tratados con DHEA/S-P 600/800 uM. A y B. tratamiento 30 minutos, C y D. tratamiento 120 minutos. Roptrías (r), membrana (m), conoide (c), micronemos (mn), núcleo (n) eucromatina se observa en la mayoría del núcleo; gris granuloso y la heterocromatina se observa en la periferia del núcleo de forma electrodensa, gránulos densos (gd), gránulos de almidón (ga), mitocondria (mt), extremo apical (Ap), extremo posterior (Pp), flecha azul muestra vaciamiento de gránulos densos.

IX. DISCUSIÓN

Muchos grupos de investigación en varias partes del mundo han hecho investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevos tratamientos para tratar enfermedades zoonóticas que son provocadas por diferentes parásitos. Algunos de estos tratamientos han sido moléculas endógenas como los esteroides sexuales, como la DHEA. La investigación del efecto de la DHEA en diferentes tipos de parásitos ha sido amplia, utilizando diferentes esquemas de experimentación tanto *in vitro* como *in vivo*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación podemos ver que la DHEA podría ser postulada como una alternativa de tratamiento contra la toxoplasmosis. En nuestros ensayos *in vitro* se evaluó el efecto directo de la DHEA sobre tk's extracelulares de *T. gondii*. El mayor efecto en la viabilidad de los parásitos fue cuando se emplearon las máximas concentraciones farmacológicas utilizadas en este trabajo (400 y 600 μM) a 2 horas de tratamiento; donde el porcentaje de viabilidad fue de 37.6% para 400 μM y 42.1% μM para 600 μM , mientras que para el control fue de 78.6%; la reducción de la viabilidad fue de 38% en comparación con el control. La DHEA ha sido evaluada en el parásito protozoario intracelular obligado *Trypanosoma cruzi*, la cual fue probada sobre parásitos extracelulares a diferentes concentraciones por 24 h. La mayor dosis empleada fue de 128 μM donde la viabilidad de los parásitos fue de 70.9% y la IC50 fue de 1064 μM (Kuehn *et al.*, 2009). En nuestros ensayos utilizamos una dosis de 100 μM , donde la viabilidad de los parásitos fue de 70% a los 30 min de tratamiento y 42% a las 2 h. En nuestros ensayos podemos ver que el efecto de la DHEA no fue lineal respecto al aumento de la dosis, lo que probablemente nos hable de efectos distintos de acuerdo a las dosis de DHEA empleadas. Otro parásito en el cual ha sido evaluado el efecto de la DHEA ha sido en el protozoario ameboide *Entamoeba histolytica* en 2006, donde se evaluó *in vitro* el efecto de la DHEA en la proliferación de trofozoítos del parásito a diferentes concentraciones de la hormona y distintos tiempos de cultivo; encontraron la muerte total de los trofozoítos a 173 μM a 72 h de cultivo o 347 μM a 24 h de cultivo (Carrero *et al.*, 2006), en este caso el efecto fue totalmente efectivo y no es comparable con nuestros resultados debido al tipo de parásito del que se trata y de las condiciones experimentales.

Este estudio además demostró que los trofozoítos tratados con DHEA experimentan una recuperación; aunque es inversamente proporcional a la concentración utilizada de DHEA, la recuperación fue de 1/5 en comparación con el control. Así como la DHEA ha sido evaluada en parásitos protozoarios también se ha probado en el trematodo *Squitosoma mansoni* (Morales-Montor *et al.*, 2001) en las diferentes etapas de su desarrollo: cercaría, esquistosómula y gusano. A 15.6 μM el efecto mostrado en cada etapa fue distinto, pero en los tres estadios de desarrollo se logra obtener una muerte de los parásitos, en la cercaría fue a las 48 h de cultivo, en la esquistosómula a 48 – 96 h de cultivo y en gusanos a los 4-5 días de tratamiento. De igual modo los resultados no son comparables a los nuestros, debido que se trata de un parásito con una biología completamente diferente a *T. gondii* y esquemas experimentales distintos.

Los tk's extracelulares también fueron expuestos al tratamiento convencional S-P, el cual tuvo un mejor efecto parasiticida a la máxima concentración y el mayor tiempo de exposición (800 μM a 2 h) y también observamos un efecto lineal dependiente del tiempo y de la concentración. Debido a estos resultados decidimos combinar ambos tratamientos (DHEA/S-P) para tratar de evaluar un posible efecto acumulativo y lograr la muerte total de los parásitos expuestos, pero para sorpresa nuestra el efecto al combinar ambos tratamientos no fue el que esperábamos si no el efecto fue similar al administrar la DHEA sola. El mayor efecto se mostró a 400 μM de ambos fármacos a dos horas de exposición con una viabilidad de 41.8%, posiblemente los tratamientos tienen un efecto competitivo siendo la DHEA la que es competitivamente mejor, debido a que enmascara el efecto del tratamiento convencional.

Lo que cabe destacar es que se ha reportado el efecto parasiticida de la DHEA en distintos parásitos y, aunque en nuestros ensayos no obtengamos la muerte total, es notable el efecto parasiticida de la hormona sobre los tk's tratados. Por esta razón se profundizó en la investigación del efecto de la DHEA a diferentes niveles.

Una vez obtenido el efecto parasiticida *in vitro* de la DHEA sobre los tk's extracelulares de *T. gondii* y viendo que el efecto no fue tan grande como en el tratamiento convencional lo siguiente era evaluar el efecto de la DHEA sobre los procesos biológicos de invasión y proliferación de parásitos tratados en células fagocíticas (macrófagos

murinos) y no fagocíticas (células HEp-2), para ver si a pesar de que un gran número de parásitos estaban vivos a las diferentes concentraciones de DHEA y tiempos empleados, habían sufrido daños importantes que les impidieran invadir y proliferar en los distintos cultivos empleados.

El porcentaje de invasión en los cultivos primarios de macrófagos murinos fue reducido solo cuando los parásitos fueron tratados con 600 μM por 30 min y, 400 y 600 μM por 2 h de DHEA, en donde la invasión se vio reducida en promedio de 70 a 23% en los tres casos. La invasión no se vio modificada cuando los parásitos se expusieron con el tratamiento convencional o la combinación de ambos tratamientos, lo cual va en concordancia con los resultados *in vitro*, el porcentaje de invasión no disminuye aún más que cuando se prueban ambos tratamientos por separado, lo que de nuevo nos sugiere mecanismos diferentes de acción. Que el proceso de invasión se vea reducido en los cultivos de macrófagos activados, nos podría estar hablando de que los parásitos que entran a las células es mediante los dos tipos de invasión, tanto la pasiva por fagocitosis, como la activa y podemos sugerir un daño en los micronemos, ya que es el organelo que permite la adhesión del parásito a la membrana apical de la célula hospedera; de igual modo en el conoide que es organelo que va a sensar el sitio de internalización.

Una vez analizado el porcentaje de invasión se hicieron los ensayos del proceso de proliferación para evaluar si todos los parásitos que lograban entrar a la célula hospedera y alojarse en su vacuola parasitófora eran capaces de proliferar, si estos eran degradados por los lisosomas o se quedaba arrestado el proceso de proliferación pero evitando su degradación, quedando protegido dentro de su vacuola parasitófora. Como en el caso de la invasión, la DHEA tuvo efecto a las dosis farmacológicas (400 y 600 μM) a ambos tiempos, pero mostrando una reducción del porcentaje de proliferación casi del 100% cuando los parásitos fueron tratados por dos horas. Aunque el tratamiento convencional tuvo mejor efecto; ya que la reducción del porcentaje de proliferación se observó desde la menor concentración a las 2 h de tratamiento, sorpresivamente cuando se combinaron ambos tratamientos a las dosis más altas 600/800 μM (DHEA/S-P) a las dos horas de exposición de los tk's, la proliferación fue casi totalmente inhibida obteniéndose un porcentaje del 0.3%. Lo anterior nos vuelve a sugerir que los tratamientos poseen diferentes

mecanismos de acción y aunque cuando se exponen *in vitro* a ambos fármacos no se ve una reducción considerable en la viabilidad. Si se ve afectado algún organelo del parásito que impide que este prolifere dentro de su célula hospedera, lo cual en términos de aplicación como tratamiento parasiticida en la infección con *T. gondii*, podría resultar en una buena alternativa de tratamiento ya que en una infección crónica aunque el parásito ya esté dentro de su célula hospedera, si la combinación de la DHEA y el tratamiento convencional evita que prolifere sería un gran avance cuando se tratan los casos de reemergencia del parásito en el caso de los pacientes con inmunosupresión.

Una vez evaluado el efecto de la DHEA en los procesos biológicos de invasión y proliferación de tk's tratados en células fagocíticas se tenía que evaluar los mismos procesos en células con actividad no fagocítica (HEp-2). En este caso el efecto de la DHEA en el proceso de invasión de tk's tratados en las monocapas de células HEp-2 se observó principalmente en las dosis más altas que se emplearon (400 y 600 μM) a los dos tiempos de tratamiento (30 y 2 horas). A los 30 minutos la invasión disminuyó de 12.3 a 2.8% a 400 μM y a 1.78 a los 2 horas; mientras que para 600 μM la disminución fue de 12.3 a 3.8% a los 30 minutos y a 0.9% a los 2 horas de tratamiento. En nuestros ensayos el porcentaje de invasión en el control fue 12.3%; mientras que otros autores (Muñiz-Hernández, 2009) lo reportaron en 35% para la misma línea celular; esta diferencia en los porcentajes la explicamos en la relación de parásitos que utilizamos, los autores utilizaron una relación 5:1, mientras que para estos ensayos se utilizó una relación 1:2. La reducción de la invasión con el tratamiento convencional no mostró una disminución significativamente diferente, solo observamos una tendencia a esta disminución, de 12.3 a 7% en promedio en todas las concentraciones y tiempos empleados. Hasta aquí podemos ver que la DHEA tiene mejor efecto que el tratamiento convencional en cuanto a la invasión en las monocapas de células HEp-2, ya que en el caso de la DHEA la reducción de la invasión es similar a la del tratamiento convencional desde la concentración más baja que se empleó (1 nM), de 12.3 a 6% para ambos tiempos de tratamiento de los tk's. Lo que implica que la DHEA afecta al taquizoíto de alguna forma que evite que invada a su célula hospedera, pudiendo dañar citoesqueleto o alguno de los organelos secretores como los micronemos que permite la adhesión del parásito a la membrana de la célula hospedera. Cuando los tratamientos se

combinaron para tratar a los parásitos, el efecto que se observó nuevamente no fue acumulativo como hubiéramos esperado, ya que el porcentaje de invasión no disminuyó más que lo que se obtuvo en cada uno de los tratamientos por separado, en este caso la invasión fue parecida a la obtenida en los tk's tratados con el tratamiento convencional. La reducción mayor en el porcentaje de invasión fue en el caso de los tk's tratados con 400 μ M de cada tratamiento por dos horas que fue de 11.2 a 2.5 %. Del mismo modo que el caso de los macrófagos murinos activados, la combinación de ambos fármacos no nos proporciona un efecto acumulativo, lo que nos vuelve a evidenciar la existencia de dos mecanismos diferentes de acción para cada uno de los tratamientos y también podemos deducir que la sulfadiazina enmascara de cierta manera el efecto de la DHEA, se podría hablar de un mecanismo de competencia por ambos fármacos a algún blanco del parásito; estas dos hipótesis nos ponen en una contradicción, por lo que son necesarios otro tipo de ensayos para profundizar en los mecanismos de cada fármaco para este parásito en específico.

En cuanto al proceso de proliferación de los tk's tratados en las monocapas de células HEP-2 observamos en ambos controles (30 y 2 horas) un porcentaje de proliferación del 15% y la máxima reducción de la proliferación de tk's tratados con DHEA fue a 200 μ M con una reducción del 15 al 2% para ambos tiempos de tratamiento, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, solo observamos una tendencia. Cuando se empleó la S-P la concentración que tuvo un mejor efecto en la reducción del porcentaje de proliferación fue a 800 μ M por 2 horas de tratamiento de 15 a 1.2%, aquí podemos ver que el mejor efecto lo tiene el tratamiento convencional, pero a altas dosis, mientras que para la DHEA el efecto es en la concentración de 200 μ M, es decir, 4 veces menos que en el tratamiento convencional. Cuando utilizamos la misma concentración del tratamiento convencional; la reducción del porcentaje de proliferación fue de 15 a 10% y cuando se combinaron ambos fármacos de nuevo no se observó un efecto acumulativo y no hubo una reducción estadísticamente significativa en ninguno de los tiempos y concentraciones empleadas. De igual manera el efecto de la DHEA se ve enmascarado por el tratamiento convencional, con lo que podríamos sustentar la hipótesis de un mecanismo de competencia por el mismo blanco.

En los perfiles proteómicos preliminares de extracto total proteico de tk's de *T. gondii* que se obtuvieron mostraron diferencias entre tratamientos y entre cada uno de los tiempos empleados, en el control se obtuvieron 159 spots a los 30 minutos y 131 a las dos horas. En un estudio llevado a cabo en el 2002 para determinar el perfil proteómico por electroforesis bidimensional de taquizoítos de la cepa RH se obtuvieron 630 spots utilizando tiras lineales con pH de 4 a 7 de 18 cm y 373 spots con tiras con un pH de 6 a 11 (Cohen *et al.*, 2002). El número de spots que se obtuvieron en ese estudio fue mucho mayor al que se obtuvo en este trabajo; pero esto se puede explicar debido a las diferencias en la metodología y las condiciones utilizadas. En cuanto a la apariencia del perfil proteómico no podemos inferir gran cosa ya que no sabemos que proteínas coinciden en los geles que nosotros realizamos y en los geles que presenta este grupo de investigación. En un estudio similar realizado años después reportaron un total de 1227 spots, utilizando tiras de 24 cm en un rango de pH de 3 a 10 (Ma *et al.*, 2009) de igual forma las condiciones experimentales fueron distintas a las que empleamos nosotros, aunque cabe destacar que el rango de peso molecular de los spots que encontramos coinciden con los reportados en este estudio; de 10 a 100 kDa. Por otro lado, no hay estudios en donde se haya evaluado el efecto de la DHEA sobre el taquizoíto extracelular, por lo que no tenemos forma de comparar nuestros resultados con algún otro publicado. Se observan notorias modificaciones de los perfiles proteómicos de los extractos totales de tk's tratados con los diferentes fármacos a ambos tiempos de exposición, más importante aún parece que los taquizoítos incubados con alguno de los tratamientos empleados modifica la secreción normal de proteínas ya que aparecen otras o se podría inferir que se trata de algunas isoformas de las proteínas presentes en los controles. Se deben efectuar más ensayos para determinar de qué proteínas se tratan, si son proteínas que solo se secretan por efecto de la DHEA y/o si se trata de alguna isoforma. Hasta el momento solo podemos decir que la DHEA, el tratamiento convencional y la combinación de ambos afectan el perfil proteómico de los tk's de *t. gondii* y más aún, la diferencia es drástica.

Con lo anterior podemos inferir que la DHEA tiene un mejor efecto parasiticida en el taquizoíto, y hay que recordar que el tratamiento convencional causa una gran cantidad de efectos adversos en los hospederos con toxoplasmosis, y uno de los objetivos en la

investigación de nuevos fármacos antitoxoplásmicos es la reducción o completa eliminación de estos efectos aunado a la posibilidad de eliminar por completo la infección, aunque hasta la fecha no ha sido posible. Lo que parece ser un objetivo más alcanzable y viable sería la búsqueda de algún tratamiento que si bien no elimine a los parásitos intracelulares si impida que estos proliferen o bloquee su reactivación en un caso de caída del sistema inmunológico, aunque para llegar a estas metas falta mucha investigación al respecto.

X. CONCLUSIONES

- ❖ La DHEA y S-P poseen mecanismos de acción diferentes.
- ❖ El efecto parasiticida de la DHEA *in vitro* no es lineal cuando se aumenta la concentración; mientras que el tratamiento convencional si lo es.
- ❖ Al probar en combinación la DHEA y la S-P sobre de los tk's el tratamiento convencional enmascara el efecto de la DHEA, por lo que no se observa un efecto acumulativo en ninguno de los ensayos realizados.
- ❖ La DHEA afecta el proceso de invasión de los tk's tratados en las monocapas de macrófagos murinos activados.
- ❖ La combinación de ambos fármacos tiene un mayor efecto en la proliferación de taquizoítos pretratados en macrófagos murinos activados.
- ❖ La DHEA posee el mejor efecto en la reducción del porcentaje de los procesos de invasión y proliferación en los cultivos de células HEP-2.
- ❖ El perfil proteómico presenta grandes modificaciones cuando los parásitos son tratados con DHEA, debido a la aparición de nuevas proteínas que pudieran estar secretándose y que no se encuentran en los controles.
- ❖ La pérdida de proteínas en los perfiles de extractos proteicos de tk's tratados es una característica que se observa en el tratamiento con DHEA y S-P, pero no se tratan de las mismas.
- ❖ La morfología común de media luna del taquizoíto se pierde cuando este es incubado con DHEA, observándose de forma ovoide, además la desorganización de los organelos intracelulares y la extrucción del conoide.
- ❖ De acuerdo a nuestros resultados la DHEA puede ser una alternativa de tratamiento o prevención en la infección aguda y/o crónica con *T. gondii*.

XI. ABREVIATURAS Y SIGLAS

<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tk's	Taquizoítos
DHEA	Dehidroepiandrosterona
S-P	Sulfadiazina-Pirimetamina
PBS	Buffer salino de fosfatos
TA	Temperatura ambiente
rpm	Revoluciones por minuto
ETOH	Etanol
SDS	Duodecilsulfato sódico
EGTA	Ácido etilén glicol tetra acético
DTT	Dithiothreitol
kDa	Kilo daltons
MET	Microscopía electrónica de transmisión
IPICYT	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

XII. PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar el efecto de la DHEA sobre cultivos de macrófagos murinos y/o células HEp-2 previamente invadidos con tk's de *T. gondii*, para evaluar si los parásitos logran proliferar o no.
- ❖ Determinar la posible toxicidad de la DHEA en cultivos celulares de macrófagos murinos y células HEp-2.
- ❖ Analizar si el tratamiento de macrófagos y células HEp-2 con DHEA, permite una disminución en los porcentajes de invasión y proliferación del taquizoíto de *T. gondii*.
- ❖ Realizar los triplicados de los análisis en doble dimensión.
- ❖ Puntear y secuenciar las proteínas que se consideren relevantes en los análisis proteómicos de cada uno de los extractos de los tk's de *T. gondii* tratados con DHEA con la finalidad de continuar la investigación sobre blancos específicos del parásito.
- ❖ Realizar ensayos *in vivo* del efecto de la DHEA administrándola como tratamiento curativo y/o preventivo sobre una infección murina.
- ❖ Evaluar el efecto de la DHEA sobre la infección crónica con *T. gondii*.
- ❖ Observar el efecto de la DHEA en la respuesta inmune en una infección murina aguda y/o crónica.
- ❖ Buscar un disolvente para la DHEA que no afecte a los parásitos o las células más de lo que la propia DHEA lo pueda hacer.

XIII. REFERENCIAS

- ❖ Baquero-Artigao F., F. del Castillo M., I. Fuentes C., A. Goncé Mellgren, C. Fortuny G., M. de la Calle Fernández-Miranda, M. I. González-Tomé, J. A. Coucerio G., O. Neth, J. T. Ramos A. y Grupo de Trabajo de Infección Congénita perinatal de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). 2013. Guía de la sociedad española de Infectología Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita. *Anales de pediatría*. 79(2): 116.e1-116.e16.
- ❖ Buxton D, K. Thomson, S. Maley, S. Wright and H. J. Bos. 1991. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Veterinary Record*. 129 (5): 89-93.
- ❖ Black M. W. and J. C. Boothroyd. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64:607–623.
- ❖ Caballero-Ortega H., F. J. Uribe-Salas, C. J. Conde-Glez, C. Cedillo-Pelaez, J. A. Vargas-Villavicencio, H. Luna-Pastén, I. Cañedo-Solares, L. B. Ortiz-Alegría y D. Correa. 2012. Seroprevalence and nacional distribution of human toxoplasmosis in Mexico: análisis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 106:656-659.
- ❖ Cárdenas G., R. Valdez, B. Sáenz, O. Bottasso, G. Fragoso, E. Sciutto, M. C. Romano and A. Fleury. 2012. Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *International Journal Parasitology*. 42:171-176.
- ❖ Carrero J. C., C. Cervantes, N. Moreno-Mendoza, E. Saavedra, J. Morales-Montor and J. P. Laclette. 2006. Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*. *Microbes and Infection*. 8:323-331.
- ❖ Caumes E., H. Bocquet, G. Guermonprez, O. Rogeaux, F. Bricaire, C. Katlama, M. Gentilini. 1995. Adverse cutaneous reactions to pyrimethamine/sulfadiazine and pyrimethamine/clindamycin in patients with AIDS and toxoplasmic encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*. 21(3): 656-658

- ❖ Cheever L. W., R. E. Chaisson, and J. E. Gallant. 1996. West Journal Medicine. 165: 67-73.
- ❖ Chiaretta A. E., A. M. Sbaffo, A. L. Cristofolini y M. D. Molina. 2003. Estudio seroepidemiológico de la toxoplasmosis en niños de áreas de riesgo de la ciudad de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. Parasitology Latinoamerican. 58:112-117.
- ❖ Cohen A. M., K. Rumpel, G. H. Coobs and J. M. Wastling. 2002. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: Proteomics of *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology. 32:39-51.
- ❖ Costa da Silva R. and H. Langoni. 2009. *Toxoplasma gondii*: host – parasite interaction and behavior manipulation. Parasitology Research. 105:893 – 898.
- ❖ de-la-Torre A., A. C. Ríos-Cadavid, C. M. Cardozo-García, L. Padilla and J. E. Gómez-Marín. 2012. Serum Levels of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) in ocular toxoplasmosis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 45: 65-68.
- ❖ Derouin F., M. C. Mazon and Y. J. F. Garin. 1987. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. Journal of clinical microbiology. 9(25): 1597-1600.
- ❖ Dubey J. P., N. L. Miller, J. K. Frenkel. 1970. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. The Journal of experimental Medicine. 132(4):636-62.
- ❖ Dubey J. P. and C. P. Beattie 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, FL. 1–220.
- ❖ Dubey J. P., D. S. Lindsay and C. A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clinical Microbiology Reviews. 11:267 – 299.
- ❖ Dubey J. P. 2008. The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years. Journal of Eukaryotic Microbiology. 55:467–475.
- ❖ Eyles D. E. and N. Coleman. 1953. The relative activity of the common sulfonamides against experimental toxoplasmosis in the mouse. Am Journal Tropical Med Hyg. 2(1): 54-63.

- ❖ Eyles D. E. and N. Coleman. 1955. An evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. *Antibiot Chemother (Northfield)*. 5(10):529-39.
- ❖ Fardella B. C. 2001. Hiperplasia suprarrenal congénita. *Revista chilena de pediatría*. 5(72):408-415.
- ❖ Ferguson D. J. P. 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. 104: 133-148.
- ❖ Fortier B., A. Dao, F. Ajana. 2000. *Toxoplasma* y toxoplasmosis. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Pédiatrie*, 4-330-A-10:1-14.
- ❖ Galindo-Sevilla N., N. Soto, J. Mancilla, A. Cerbulo, E. Zambrano, R. Chavira and J. Huerto. 2007. Low serum levels of dehydroepiandrosterone and cortisol in human diffuse cutaneous leishmaniasis by *leishmania mexicana*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 76(3):566-572.
- ❖ Galván M. L. y R. F. Mondragón. 2001. *Toxoplasmosis humana*. Ediciones Cuéllar, Guadalajara, Jalisco, México.
- ❖ Gómez de León C. T., R. D. Díaz M., G. Mendoza H., S. González P., J. R. Ambrosio and R. Mondragón F. 2014. Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal of Proteomics*. 1741:1-14.
- ❖ Hai-Xia W., W. Shan-shan, D. S. Lindsay and P. Hong-Juan. 2015. A sistematic review and meta-analysis of the efficacy of anti-*Toxoplasma gondii* medicines in humans. *Plos One*. 10(9): e0138204. doi:10.1371/journal.pone.0138204.
- ❖ Hedhli D., N. Moiré, H. Akbar, F. Laurent, B. Héraud, I. Dimier-Poisson and M. N. Ménélec. 2016. The antigen-specific response to *Toxoplasma gondii* prolilin, a TLR11/12 ligand, depends on its intrinsic adjuvant properties. *Medical Microbiology Immunology*.
- ❖ Hill D. and J. P. Dubey. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*. 8: 634–640.
- ❖ Ismael A. B., I. Dimier-Poisson, M. Lebrun, J. F. Dubremetz, D. Bout and M. N. Ménélec. 2006. Mic1-3 knockout of *Toxoplasma gondii* is a successfull vaccine against

- chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Journal Infectious Diseases*. 194(8): 1176-1183.
- ❖ Jones J. L., D. Kruszon-Moran, M. Wilson, G. McQuillan, T. Navin and J. B. McAuley. 2001. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors. *American Journal of Epidemiology*. 4(154): 357-365.
 - ❖ Khalifa A. M., I. R. Ibrahim and E. D. El-Kerdany. 2000. Coccidial infection in immunosuppressed mice: prophylaxis and treatment with dehydroepiandrosterone. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*. 5/6(6): 908-918.
 - ❖ Kopec R., G. De Caro, E. Chapnick, M. Ghitan and N. Saffra. 2003. Prophylaxis for Ocular Toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases*. 37: e147-8.
 - ❖ Kuehn C. C., O. L. G. Rodriguez, S. C. Domingues, F. D. Silva, T. M. P. Alonso, S. de Albuquerque and J. C. do Prado Jr. 2009. Melatonin and dehydroepiandrosterone combination: does this treatment exert a synergistic effect during experimental *Trypanosoma cruzi* infection? *Journal of Pineal Research*. 47:253-259.
 - ❖ López-Mato A., O. Boullosa, G. Illa, A. Vieitez. P. Willis y C. Marquez. 1999. Dehidroepiandrosterona. Aspectos Psiconeuroinmunoendocrinológicos. EuroHealthLatina. Online in: www.eurohealthlatina.com/es/pdf/Dehidroepiandrosterona.pdf
 - ❖ Ma G.-Y., J.-Z. Zhang, G.-R. Yin, J.-H. Zhang, X.-L. Meng and F. Zhao. 2009. *Toxoplasma gondii*: Proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. *Experimental Parasitology*. 122:41-46.
 - ❖ Mendivil J. M. y V. M. Borges. 2009. La Dehidroepiandrosterona (DHEA), revisión de su eficacia en el manejo de la disminución de la libido y de otros síntomas del envejecimiento. *Actas Urológicas Españolas*. 33(4):390-401.
 - ❖ Mévélec M. N., C. Ducournau, I. A. Bassuny, M. Oliver, E. Sèche, M. Lebrun, D. Bout and I. Dimier-Poisson. 2010. Mic1-3 knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against *T gondii*- induced abortion in sheep. *Vet Res*. 41(4): 49.doi:10.1051/vetres/2010021.
 - ❖ Milewska-Bobula B., B. Lipka, E. Gołąb, R. Dębski, M. Marczyńska, M. Paul, A. Panasiuk, M. Seroczyńska, J. Mazela and D. Dunin-Wąsowicz. 2015. Recommended

- management of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women and their children. *Przegl Epidemiology*. 69: 291-298.
- ❖ Morales-Montor J., F. Mohamed, A. M. Ghaleb, S. Baig, C. Hallal-Calleros and R. T. Damian. 2001. *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *Journal Parasitology*. 87(5):1132-1139.
 - ❖ Morisaki H. J., J. E. Heuser and L. D. Sibley. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science*. 108:2457-2464.
 - ❖ Muñiz H. S. 2009. Modificación en la distribución de organelos y del citoesqueleto de la célula huésped inducido por el parásito *Toxoplasma gondii* durante la invasión y proliferación intracelular. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Bioquímica.
 - ❖ Muñiz H. S. y F. R. Mondragón 2009. *Toxoplasma gondii* un patógeno asesino re-emergente. *Revista de Educación Bioquímica*. 28: 52-58.
 - ❖ Nakayama I., 1965. Effects of immunization procedures in experimental toxoplasmosis. *Keio Journal of Medicine*. 14 (2): 63-72.
 - ❖ Naserifar R., F. Ghaffarifar, A. Dalimi, Z. Sharifi, K. Solhjoo, K. Hoosseinian Khosroshahi. 2015. Evaluation of Immunogenicity of Cocktail DNA Vaccine Containing Plasmids Encoding Complete GRA5, SAG1 and ROP2 Antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/C Mice. 2015. *Iran Journal Parasitology*. 10 (4) : 590-598.
 - ❖ Nichols B. A. and M. L. Chiappino. 1987. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Journal Protozoology*. 34:226-30.
 - ❖ Nicolle C. and L. Manceaux. 1908. Sur une infection á corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'académie des Sciences*. 147:763-766.
 - ❖ Nicolle C. and L. Manceaux. 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'académie des Sciences*. 148:369-372.
 - ❖ Oz H. S. 2014. Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. *Frontiers in Microbiology. Microbial Immunology*. 5:1-6.

- ❖ Patrón A. S., M. Mondragón, S. González, J. R. Ambrosio, A. L. Guerrero and R. Mondragón. 2005. Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *International Journal for Parasitology* 35:883-894.
- ❖ Ravindran S., M. B. Lodoen, S. H. L. Verhelst, M. Bogyo and J. C. Boothroyd. 2009. 4-Bromophenacyl Bromide Specifically Inhibits Rhoptry Secretion during *Toxoplasma* Invasion. *PLoS ONE*. 12:1-10.
- ❖ Rosso F., A. Agudelo, A. Isaza and J. G. Montoya. 2007. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colombia Médica*, 38:316-337.
- ❖ Sayles P. C. and L. L. Johnson. 1996. Intact Immune Defense are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. 64 (8) : 3088-3092.
- ❖ Smith J. E. 1995. A ubiquitous intracellular parasite: The cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 11(25): 1301-1309.
- ❖ Suárez-Hernández M., A. González-Fernández, B. Y. Gardón-Quirola, y R. Martínez-Sánchez. 2005. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. *Revista Biomédica*. 16:21-27.
- ❖ Tenter A. M., A. R. Heckeroth and L. M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30:1247-1258.
- ❖ Vargas-Villavicencio J. A., C. Larralde and J. Morales-Montor. 2008. Treatment with dehydroepiandrosterone *in vivo* and *in vitro* inhibits reproduction, growth and viability of *Taenia crassiceps* metacestodes. *International Journal for Parasitology*. 38:775-781.
- ❖ Vela-Amieva M., I. Cañedo-Solares, P. Gutiérrez-Castrellón, M. Pérez-Andrade, C. González-Contreras, J. Ortiz-Cortés, V. Ortega-Velázquez, M. de L. Galván-Ramírez, M. Ruíz-García, P. Saltigeral-Simentel, J. C. Ordaz-Favila, C. Sánchez and D. Correa. 2005. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 72:142-144.

- ❖ Velasco-Castrejón O, B. Salvatierra-Izaba, J. L. Valdespino, A. M. Sedano-Lara, S. Galindo-Virgen, C. Magos, A. Llausás, R. Tapia-Conyer, G. Gutiérrez, J. Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. Secretaría de Salud. 34:222 – 229.
- ❖ Wang Y. J., J. P. Cao, Y. W. Sun, Y. X. Xu and Y. J. Shen. 2015. Expression of Cocktail DNA Vaccine Comprising *Toxoplasma gondii* SAG1, MIC3 and ROP2 Using Fluorescent Protein-Reporting Vectors and Evaluation of its Immunogenicity. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 33(5):368-71, 376.
- ❖ Yano K., T. Nakabayashi. 1986. Attenuation of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* by passages in mice immunized with Toxoplasma lysate antigens. Biken. 29(2): 31-7.
- ❖ Zapata G. E. 2004. Efecto de la Dehidroepiandrosterona (DHEA), sobre la expresión de las proteínas que regulan en ciclo celular: p53, p21 y Rb en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC's). Tesis para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

XIV. ANEXOS

XIV.1. Datos individuales utilizados en la elaboración de cada una de las gráficas en todos los ensayos realizados; así como sus desviaciones estándar.

Curva dosis-respuesta (% de viabilidad)					
		30 minutos	Desv. Est.	2 horas	Desv. Est.
	control	92.1103215	2.9897079	78.6611444	4.24650614
	ETOH 2.8 uL/100 uL	91.6993967	3.04306673	68.11588	8.93715499
	ETOH 11.5 uL/100 uL *	77.3537867	4.04650708	60.2191167	0.87821497
DHEA	1 nM	86.4441	7.26159756	68.211295	2.61691027
	10 nM	81.2169233	10.0110187	61.256615	2.42840975
	100 nM	79.9501233	7.32754386	65.931125	4.01586447
	1 µM	73.0538133	12.7017498	57.86639	4.26652675
	10 µM	69.65919	3.57250105	46.73553	11.7351866
	20 µM	78.39108	6.04472584	65.49599	4.66925007
	50 µM	72.0885033	7.18411218	64.99496	1.98377667
	80 µM	74.7384467	10.4756988	68.915955	5.59517332
	100 µM	69.6420767	4.48362057	42.8272033	8.49325339
	200 µM	65.01352	5.0538029	54.443835	9.24623434
	400 µM *	63.1249233	3.50843214	37.69726	6.0344917
	600 µM *	47.82539	5.6828345	42.19842	1.1124911
S-P	80 µM	84.023132	3.71583672	48.80035	9.74382998
	200 µM	68.54464	4.69822416	40.74501	9.87731265
	400 µM	45.351926	13.9128273	30.814702	9.45557168
	600 µM	37.23844	17.2517017	19.495426	9.57430906
	800 µM	26.489172	6.23007644	9.2038854	5.13228798
DHEA/S-P	80 µM	80.650205	11.3629443	72.1823133	10.214821
	200 µM	61.38533	4.24013753	58.3011567	6.54268188
	400 µM	57.473805	2.05019247	41.87675	6.99844795
	600 µM	53.813925	0.51710012	48.007245	2.81818115
	600/800 µM	51.701995	15.1580854	52.42957	7.02422906
	10/600 µM	67.3005933	7.97597969	59.64892	6.75395087
	10/800 µM	65.55549	4.69138526	51.2040933	6.84961639

Invasión de tk's pretratados en macrófagos activados (% de invasión)					
		30 minutos	Desv. Est.	2 horas	Desv. Est.
	control	70.9822857	6.0467583	73.6820557	7.16530738
	macrófagos s/LPS	49.7694567	7.25777352	42.0992386	7.35962619
	ETOH 2.8 uL/100 uL	69.2029	8.32558109	60.8499633	7.33328521
	ETOH 11.5 uL/100 uL *	66.9528733	6.88960284	73.9537167	3.70053652
DHEA	1 nM	65.00486	11.2968364	63.6592233	3.51432
	10 nM	67.6199333	5.1938463	62.7794467	5.43408927
	100 nM	74.7219833	5.28419946	61.1031467	8.75922393
	1 µM	67.21103	3.29812879	66.4757633	9.53977835
	10 µM	69.1750167	10.6761367	62.9967533	3.62634948
	20 µM	67.5998367	5.33880825	61.7328933	1.55925057
	50 µM	69.7999567	3.13327705	64.7007467	12.033675
	80 µM	63.90532	6.3593594	52.8817733	11.5567877
	100 µM	59.05192	7.33669836	58.0175967	7.73370666
	200 µM	66.2660267	4.95082658	61.3057333	5.01335556
	400 µM *	55.4272833	1.84849599	25.0299533	1.56077098
	600 µM *	29.5094067	3.74971754	21.3188633	2.80959085
S-P	80 µM	68.0748175	5.38582115	73.1155	1.02410644
	200 µM	70.10952	4.92451147	71.8996167	4.85985583
	400 µM	73.4610575	5.89157594	71.2377467	7.13801938
	600 µM	73.3695225	2.52383109	72.5770433	2.97405381
	800 µM	73.0407675	3.86244367	71.52695	6.70043755
DHEA/S-P	80 µM	58.5953467	10.7317563	70.5396967	1.62780014
	200 µM	64.3925867	12.8304535	70.4376233	1.23271828
	400 µM	71.057	9.22880452	71.3587067	5.934384
	600 µM	68.56701	14.2497447	75.7586933	1.61886555
	600/800 µM	64.1869267	8.30289696	72.3320833	8.33349094
	10/600 µM	71.38728	10.1845466	76.29682	8.54786256
	10/800 µM	71.07714	11.3220657	72.8650667	5.02991062

Proliferación de tk's pretratados en macrófagos activados (% de proliferación)						
		30 minutos	Desv. Est.	2 horas	Desv. Est.	
		control	34.688888	7.32316268	22.3566075	9.200109676
macrófagos s/LPS	19.28126	5.2204167	18.8805433	10.92625343		
ETOH 2.8 uL/100 uL	22.37908	2.01647644	17.94495	1.730488283		
ETOH 11.5 uL/100 uL *	24.85235	2.54144883	20.67685	1.897167494		
DHEA	1 nM	26.0305133	5.27991823	19.39103	5.665919358	
	10 nM	27.639245	12.0646064	12.3903	3.064119957	
	100 nM	39.025475	4.00928838	26.84049	8.025449834	
	1 µM	37.10795	7.86615282	23.492015	8.2434155	
	10 µM	32.07012	9.90335574	23.139775	0.261099179	
	20 µM	24.32394	0.39377978	13.316375	2.23056127	
	50 µM	33.372475	7.25954712	15.1090567	4.309054237	
	80 µM	23.8625567	2.18194319	15.27529	3.855527902	
	100 µM	21.0584033	7.23285247	11.9788627	3.972306147	
	200 µM	24.32463	3.33484207	14.55844	4.105280857	
	400 µM *	14.297615	1.64940435	2.095147	0.472338679	
	600 µM *	7.9819765	5.1561286	1.96460933	1.741935458	
	S-P	80 µM	9.60424733	5.23182142	2.6534215	1.885556093
		200 µM	8.677822	8.48274596	1.9072895	0.445381813
400 µM		7.405344	8.10364362	0.9791081	0.024847308	
600 µM		4.03219033	4.00467497	3.04947293	3.601147221	
800 µM		3.106648	2.25202015	3.12567205	2.89766312	
DHEA/S-P	80 µM	18.89032	7.20855765	23.9927033	9.883051531	
	200 µM	19.011225	9.58120496	11.3336127	4.146696599	
	400 µM	9.94073667	7.53906274	2.75430233	1.751937217	
	600 µM	6.342185	8.96920404	0.5206701	0.356252736	
	600/800 µM	0.820513	1.4211702	0.22635698	0.284387436	
	10/600 µM	4.3939395	3.64267119	4.64869167	6.705521712	
	10/800 µM	2.201258	3.11304892	1.121305	1.942157231	

Invasión de tk's pretratados en células Hep-2 (% de invasión)					
		30 minutos	Desv. Est.	2 horas	Desv. Est.
		control	12.3143367	1.93289772	11.24339
ETOH 2.8 uL/100 uL	8.716267	3.71357349	6.490843	1.33721812	
ETOH 11.5 uL/100 uL *	4.5314815	3.65709475	3.2266435	2.98303673	

DHEA	1 nM	5.852846	0.23556697	6.2275795	0.05941465
	10 nM	4.632594	1.4431017	5.080276	0.78280539
	100 nM	6.804797	1.50480243	3.981823	0.21901643
	1 μ M	4.56609	1.70611573	3.1815675	2.2827804
	10 μ M	4.450193	0.67040794	4.003725	3.54433173
	20 μ M	5.0309965	2.71268294	7.339822	3.34199878
	50 μ M	4.835718	1.87199874	4.5806705	2.66229309
	80 μ M	6.2175355	0.06320898	3.8229645	0.92581137
	100 μ M	3.7610245	0.30582156	3.9408345	2.05648643
	200 μ M	3.741409	1.46895211	2.865985	0.39080943
	400 μ M *	2.848743	0.10035967	1.7861315	0.26523929
	600 μ M *	3.8045825	0.47719738	0.9528788	0.03080171
S-P	80 μ M	7.189428	3.78555696	6.092998	0.559395
	200 μ M	6.313357	2.85667745	4.2849505	0.1319935
	400 μ M	5.823587	1.68851018	4.8811695	0.26091745
	600 μ M	5.799346	2.33224747	7.193819	3.54348976
	800 μ M	5.717342	3.0724723	3.7624585	2.62717959
DHEA/S-P	80 μ M	7.0330965	2.08955923	4.483231	2.00842085
	200 μ M	8.59146433	3.66316226	4.5686825	0.33549742
	400 μ M	6.014889	2.86023844	2.5537	0.81658812
	600 μ M	4.9252155	1.42409538	3.3374945	1.58883005
	600/800 μ M	6.219452	2.14303559	3.295835	1.86612551
	10/600 μ M	7.497869	0.76558027	3.7482195	0.23997861
	10/800 μ M	9.1935805	0.76079528	4.609206	2.60555697

Proliferación de tk's pretratados en células Hep-2 (% de proliferación)

		30 minutos	Desv. Est.	2 horas	Desv. Est.
	control	15.1991375	5.29630104	15.852945	4.98779688
	ETOH 2.8 uL/100 uL	21.2507	4.81798519	10.96886	1.06454926
	ETOH 11.5 uL/100 uL *	3.826204	1.54407938	0	0
DHEA	1 nM	15.30413	4.26191642	7.5364685	3.29247938
	10 nM	10.6897335	4.64191065	5.661159	1.18073256
	100 nM	7.311499	3.09513087	7.14984	4.29263314
	1 μ M	8.235514	1.77762275	5.3903765	0.24921766
	10 μ M	7.06551467	3.03490707	5.602162	0.83796113
	20 μ M	8.43070467	2.82999348	5.818826	0.07503817
	50 μ M	11.098093	3.77946624	6.1672335	5.6330198
	80 μ M	7.03741133	2.9406516	6.6547075	0.99865327

	100 μ M	9.716142	5.3574059	6.3348785	1.3827268
	200 μ M	2.64935883	3.35341716	2.2303985	0.92520185
	400 μ M *	1.1399272	1.00280903	0	0
	600 μ M *	4.1750511	2.88708755	0	0
S-P	80 μ M	11.7164657	4.03748103	6.85123	1.41728665
	200 μ M	8.43345633	2.69535383	10.3781035	2.73696498
	400 μ M	9.317471	1.3015827	5.451453	1.9203408
	600 μ M	8.757078	1.58508681	5.720647	0.63296946
	800 μ M	8.41854	1.37862455	4.0095855	1.21619467
DHEA/S-P	80 μ M	10.7093543	4.60049464	4.294856	1.04999417
	200 μ M	8.659739	3.43974412	6.1782715	1.7085008
	400 μ M	8.04953167	5.12583811	4.819297	0.45016963
	600 μ M	11.0333175	4.30027343	3.148929	2.09186228
	600/800 μ M	9.25508533	3.96119231	4.6879495	0.84058379
	10/600 μ M	5.81864867	1.83648231	5.307421	0.87670069
	10/800 μ M	11.185938	4.7133932	7.0012695	3.14118682

Invasión 2 y 24 horas post-infección de tk's pretratados en macrófagos activados (% de invasión)

	Tk's pretratados 30 minutos				Tk's pretratados 2 horas			
	invasión 2 horas	Desv. Est.	Invasión 24 horas	Desv. Est.	Invasión 2 horas	Desv. Est.	Invasión 24 horas	Desv. Est.
Control	70.98228571	6.0467583	72.357364	8.6003543 2	73.68205571	7.1653073 8	59.29118	10.835641 6
macrófagos s/LPS	49.76945667	7.2577735 2	60.2883275	2.2713625	42.09923857	7.3596261 9	49.28109667	5.6829290 5
ETOH 2.8 uL/100 uL	69.2029	8.3255810 9	54.94235	1.1969769 1	60.84996333	7.3332852 1	42.356415	12.606009 8
ETOH 11.5 uL/100 uL *	66.95287333	6.8896028 4	56.41516667	3.4861247 9	73.95371667	3.7005365 2	48.03163	1.7024868 5
DHEA								
1 nM	65.00486	11.296836 4	57.16916667	7.9086064 4	63.65922333	3.51432	47.756415	5.8925541 5
10 nM	67.61993333	5.1938463	58.58614	21.600754 5	62.77944667	5.4340892 7	33.951755	20.905505 9
100 nM	74.72198333	5.2841994 6	69.328165	0.6212286 6	61.10314667	8.7592239 3	55.214725	5.2056989 1
1 µM	67.21103	3.2981287 9	67.35594	6.9230986 5	66.47576333	9.5397783 5	57.130635	4.3197789 7
10 µM	69.17501667	10.676136 7	60.536675	2.8936294 4	62.99675333	3.6263494 8	56.68862	7.0337042 9
20 µM	67.59983667	5.3388082 5	56.07044667	5.8332361 9	61.73289333	1.5592505 7	43.079155	3.1248392 2
50 µM	69.79995667	3.1332770 5	63.75444	3.7121267 5	64.70074667	12.033675	40.08183333	11.109930 9
80 µM	63.90532	6.3593594	61.30039	4.9494100 6	52.88177333	11.556787 7	48.70061667	6.2636900 7
100 µM	59.05192	7.3366983 6	54.31128	8.9044288 8	58.01759667	7.7337066 6	42.52679667	15.319129 5
200 µM	66.26602667	4.9508265 8	58.28514333	1.6684604 2	61.30573333	5.0133555 6	45.72766333	2.8530919 9
400 µM *	55.42728333	1.8484959 9	35.17651	3.8216010 3	25.02995333	1.5607709 8	10.01288333	3.4590107
600 µM *	29.50940667	3.7497175 4	22.62107	3.2468504 9	21.31886333	2.8095908 5	12.99601	4.8495773 9

S-P	80 μ M	68.0748175	5.3858211 5	45.19294333	12.545150 5	73.1155	1.0241064 4	48.871745	13.106627 2
	200 μ M	70.10952	4.9245114 7	50.98157	15.689811 1	71.89961667	4.8598558 3	40.05055	11.601387 8
	400 μ M	73.4610575	5.8915759 4	42.79156	7.2951975 8	71.23774667	7.1380193 8	30.03184	1.2235351 5
	600 μ M	73.3695225	2.5238310 9	39.55831333	7.6160076	72.57704333	2.9740538 1	45.30017333	20.015417 8
	800 μ M	73.0407675	3.8624436 7	43.63169333	7.0401765 5	71.52695	6.7004375 5	40.5614875	14.649182 8
DHEA/S-P	80 μ M	58.59534667	10.731756 3	49.226555	3.5321185 8	70.53969667	1.6278001 4	61.02062667	12.926027
	200 μ M	64.39258667	12.830453 5	57.368045	20.265772 3	70.43762333	1.2327182 8	44.09275667	5.1181347 6
	400 μ M	71.057	9.2288045 2	45.90453	16.989005 4	71.35870667	5.934384	29.08181333	7.0415165 4
	600 μ M	68.56701	14.249744 7	37.38773	21.799578 8	75.75869333	1.6188655 5	26.11881667	1.3744422 4
	600/800 μ M	64.18692667	8.3028969 6	29.01982	7.0053752 1	72.33208333	8.3334909 4	22.8749525	6.5033447
	10/600 μ M	71.38728	10.184546 6	45.454545	20.570379 7	76.29682	8.5478625 6	36.82922667	18.425896 8
	10/800 μ M	71.07714	11.322065 7	43.091175	23.556915 9	72.86506667	5.0299106 2	34.16747667	4.5883584 5

Invasión 2 y 24 horas post-infección de tk's pretratados en células Hep-2 (% de invasión)									
		Tk's pretratados 30 minutos				Tk's pretratados 2 horas			
		invasión 2 horas	Desv. Est.	Invasión 24 horas	Desv. Est.	Invasión 2 horas	Desv. Est.	Invasión 24 horas	Desv. Est.
(% de invasión)	ETOH 2.8 uL/100 uL	8.716267	3.7135734 9	39.725075	7.0239815 7	6.490843	1.3372181 2	24.974635	1.9784 777
	ETOH 11.5 uL/100 uL *	4.5314815	3.6570947 5	7.665571	2.5543468 8	3.2266435	2.9830367 3	0.996813	0.8440 2104
	1 nM	5.852846	0.2355669	29.11398	7.2006522	6.2275795	0.0594146	20.0949	6.3213

			7				5		932
	10 nM	4.632594	1.4431017	23.367155	8.1664681 4	5.080276	0.7828053 9	14.0820245	6.8103 0875
	100 nM	6.804797	1.5048024 3	15.91406067	5.6329919	3.981823	0.2190164 3	18.723415	5.7337 3797
	1 µM	4.56609	1.7061157 3	16.54565333	4.2529396 9	3.1815675	2.2827804	14.618435	0.1319 3905
	10 µM	4.450193	0.6704079 4	14.59837333	4.9289094 6	4.003725	3.5443317 3	25.120635	8.2771 3035
	20 µM	5.0309965	2.7126829 4	14.87913667	3.3506123 5	7.339822	3.3419987 8	15.12311	1.5118 7915
	50 µM	4.835718	1.8719987 4	21.10060667	9.5807032 9	4.5806705	2.6622930 9	17.168018	13.468 5627
	80 µM	6.2175355	0.0632089 8	15.43715667	6.0410662 4	3.8229645	0.9258113 7	16.54765	0.2106 3297
	100 µM	3.7610245	0.3058215 6	19.92364667	7.4497936 2	3.9408345	2.0564864 3	15.983825	6.6104 6553
	200 µM	3.741409	1.4689521 1	5.499836667	5.9574957 3	2.865985	0.3908094 3	7.3282385	5.4102 3167
	400 µM *	2.848743	0.1003596 7	2.353281333	0.7856074	1.7861315	0.2652392 9	1.2233023	0.6053 8763
	600 µM *	3.8045825	0.4771973 8	8.167844333	5.9388492 8	0.9528788	0.0308017 1	0.4351743	0.1048 8303
S-P	80 µM	7.189428	3.7855569 6	21.00129	7.6655039 7	6.092998	0.559395	20.19757	4.0150 6544
	200 µM	6.313357	2.8566774 5	19.07910333	4.7463438 8	4.2849505	0.1319935	21.41497	3.4869 2739
	400 µM	5.823587	1.6885101 8	18.43503333	3.1445291 9	4.8811695	0.2609174 5	12.2645815	6.0420 5562
	600 µM	5.799346	2.3322474 7	15.33678333	3.6265198 5	7.193819	3.5434897 6	12.942255	1.2579 7832
	800 µM	5.717342	3.0724723	14.77469667	0.8095083 8	3.7624585	2.6271795 9	10.4157805	1.6947 7868
DHEA/S-P	80 µM	7.0330965	2.0895592 3	17.719842	6.8827034 4	4.483231	2.0084208 5	13.12863	1.4856 0306
	200 µM	8.591464333	3.6631622 6	16.68472067	7.4097503 7	4.5686825	0.3354974 2	14.51518	1.9712 8643

400 μ M	6.014889	2.8602384 4	18.50478667	10.651492 5	2.5537	0.8165881 2	14.51893	1.3307 0425
600 μ M	4.9252155	1.4240953 8	22.991875	10.434767 7	3.3374945	1.5888300 5	9.649181	1.3142 6968
600/800 μ M	6.219452	2.1430355 9	18.40983333	3.4318962 7	3.295835	1.8661255 1	11.2421335	2.3906 9479
10/600 μ M	7.497869	0.7655802 7	15.08506933	6.1845243 7	3.7482195	0.2399786 1	14.01227	0.3472 46
10/800 μ M	9.1935805	0.7607952 8	22.1777	7.5845115 9	4.609206	2.6055569 7	16.85211	7.8786 4032