



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**Polimorfismo del promotor del FcRn: niveles de expresión y
asociación con la entrada de *Toxoplasma gondii* a células
endoteliales, con la transmisión vertical y con la severidad de la
toxoplasmosis congénita en seres humanos**

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
LUZ BELINDA ORTIZ ALEGRÍA**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN**
Instituto Nacional de Pediatría

**COMITÉ TUTOR:
DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ**
Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Cd. de Méx., marzo de 2018



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.

Este trabajo de investigación se desarrolló en el **Laboratorio de Inmunología Experimental**, que pertenece a la Subdirección de Medicina Experimental, del **Instituto Nacional de Pediatría, SSA**.

Este trabajo forma parte del proyecto: “Toxoplasmosis congénita. Relación de los polimorfismos de genes del parásito y de la respuesta inmune de la madre y del hijo con la expresión, la actividad biológica, la transmisión vertical y la patogenia fetal”, el cual fue aprobado por los Comités de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría y cuyo número de registro es INP 060/2011.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por CONACyT, por el proyecto número 139721 y por el INP con recursos de la Convocatoria de Recursos Fiscales para Investigación 2012 y 2013.

Agradecimientos

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,

La alumna tuvo apoyo parcial de CONACyT, con el número de beca 22344.

A la Dra. Dolores Correa por permitirme ser su alumna y desarrollar juntas este proyecto.

Al Dr. Enrique Ortega Soto y al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez por siempre aportar su valioso conocimiento para la mejora de este proyecto y de mi crecimiento profesional.

A los miembros de mi jurado: Dra. María Inés Vargas Rojas, Dr. Jesús Martínez Barnetche, Dra. María Isabel Sada Ovalle y Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, por sus valiosos comentarios para la mejora de esta tesis.

A la Dra. Irma Cañedo, al LN. Héctor Luna y a la M. en C. Claudia Rico por su excelente en la obtención de muestras y ayuda en la ejecución de los experimentos para la realización de este proyecto.

Reconocimientos y agradecimientos personales

A la **UNAM** por ser mi *alma mater* y por permitirme estar tantos años en sus instalaciones, aprendiendo aspectos académicos y cosas de la vida.

A la **Doctora Dolores Correa** porque recibirme desde el primer día de una manera amable y se convirtió rápidamente en “mi mamá académica”. Usted me hizo darme cuenta de mis capacidades, ha compartido sus conocimientos y me ha impulsado en todos estos logros. Además, por apoyarme en muchos aspectos de mi vida.

A **Oscar**, simplemente por ser y estar conmigo y por apoyarme en todo momento para la culminación de este proyecto.

A **Nicolás** y a **Saúl** por llegar a mi vida e iluminarla, por estar conmigo y tenerme paciencia, todo esto es por ustedes.

A mi familia: Mi **mamá Juana**, mi **papá Gustavo**, mi hermana **Brenda**, mi hermano **Gustavo** y mi hermana **Julieta** por todo el apoyo y por todo el ánimo para no desistir.

A **Irma Cañedo** porque hemos crecido juntas, académica y personalmente.

A mis amigos del “**Smart group**” porque todos los días logran que sonría y porque podemos platicar de cualquier tema, a pesar de las adversidades.

A mis amigos y compañeros del LIE: Claudia, Irma, Lizbeth, Fernando, Heriberto, Luis Fernando, Héctor, José Antonio, Ana Laura, Carlos, Lulú y Mónica, por ser una parte esencial en este crecimiento y por siempre ser un reto.

A mis amigas y amigos de vida: Jazmín, Anahí, Claudia, Carlos, Juan y a sus hijitas e hijitos, porque con ellos he caminado y evolucionado y mi familia se ha vuelto más grande.

Dedicatorias

A mis hijitos:

Nicolás

Saúl

Ustedes son los tesoros más valiosos y los retos más grandes que tengo en mi vida.

Ustedes son mi motor y mi luz para lograr los objetivos que me propongo y para seguir adelante día a día.

Porque todos los días me regalan un beso, un abrazo y una sonrisa.

Los amo y los amaré incondicionalmente.

A Oscar:

Porque me has acompañado en este camino y me has apoyado. Porque me diste los dos regalos más preciados que tengo y por la familia que construimos. Juntos hemos aprendido y crecido en esta vida. Porque me has enseñado a amar a alguien incondicionalmente y has logrado que yo me convierta en una mejor persona.

Gracias por todo.

A mi familia:

Juana: *Mamá, me enseñaste que quien persevera alcanza, siempre me impulsaste a tomar los retos y a superarlos.*

Gustavo: *Papá, me mostraste el camino hacia la superación, me apoyaste en todo, hasta que lo conseguí.*

Bren: *Hermana, siempre has creído en mí, en que lograría todo esto, eres mi gran apoyo.*

July: *Hermana, eres esa vocecita que me impulsa y me motiva, tu eres mi apoyo incondicional.*

Tavo: *Hermano, siempre estás al pendiente de mí y de mis hijitos y hemos aprendido que a pesar de circunstancias permanecemos juntos.*

Juntos hemos construido una gran familia, gracias por apoyarme, por estar a mi lado.

A **Bren** y a **Rodolfo** porque siempre nos han apoyado a mí y a mi familia en todos los momentos, buenos y malos, y por regalarnos esas princecitas hermosas: **Naty** y **Rebe**.

A **Evelia** (Yeya) porque cuida mis tesoros más preciados y porque a pesar de las adversidades siempre me ha tendido su mano y una sonrisa.

LBOA

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE CUADROS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	15
MARCO TEÓRICO	16
El embarazo y la placenta	16
Las vellosidades coriónicas	17
La placenta como barrera para los patógenos	18
Respuesta inmune durante el embarazo	19
Respuesta inmune a nivel de la placenta	20
Transferencia de inmunidad madre-hijo	22
El FcRn	23
Gen del FcRn	31
Polimorfismos del gen del FcRn	34
FcRn e infecciones	37
<i>Toxoplasma gondii</i>	39
Aspectos generales	39
Ciclo de vida	40
Ciclo celular	41
Invasión de <i>Toxoplasma gondii</i> en diferentes tipos celulares	45
Diversidad genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	49
Aspectos epidemiológicos de la infección por <i>Toxoplasma gondii</i>	49
Aspectos clínicos e inmunológicos de la infección por <i>Toxoplasma gondii</i>	51
Toxoplasmosis congénita	54
<i>Toxoplasma gondii</i> y la placenta	55
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	58
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	60
OBJETIVO GENERAL	61
HIPÓTESIS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	62
1. Cultivos celulares	64
1.1. Células HMEC-1	64
1.1.1. Características de las HMEC-1	64
1.1.2. Cultivo de las HMEC-1	65
1.2. Células HUVEC	65
1.2.1. Características de las HUVEC	66
1.2.2. Aislamiento y cultivo de las HUVEC	66
2. Obtención de taquizoitos de la cepa RH y cepa ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	67
3. Ensayos de invasión de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> de la cepa RH y ME49 en HUVEC y HMEC-1	68
3.1. Estandarización de los ensayos de invasión de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> de la cepa RH y ME49 en HUVEC y HMEC-1	69
3.2. Cuantificación de células endoteliales humanas invadidas por taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> y teñidas con Wright	69

3.3. Determinación de infección de células endoteliales por taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante citometría de flujo y microscopía confocal	71
4. Recubrimiento de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> con anticuerpos IgG1 humanos específicos	72
5. Ensayos de invasión de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> recubiertos con anticuerpos IgG1 humanos específicos en células HMEC-1	73
6. Expresión del FcRn	74
6.1. Expresión mRNA del FcRn	74
6.1.2. Análisis de resultados y pruebas estadísticas	75
6.2. Identificación del FcRn a nivel de proteína	75
7. Identificación de los polimorfismos (VNTR) del promotor de la cadena α del FcRn humano.....	77
8. Asociación de los polimorfismos (VNTRs) del promotor de la cadena α del FcRn humano con transmisión vertical de <i>Toxoplasma gondii</i> y con daño en recién nacidos infectados congénitamente	79
RESULTADOS	80
1. Ensayos de invasión de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> en células endoteliales humanas.....	80
1.1. Estandarización de los ensayos de invasión de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> de la cepa RH y ME49 en células HUVEC y HMEC-1	80
1.2. Cuantificación de invasión de células endoteliales humanas por taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> por microscopía de luz	84
1.3. Determinación de infección de células endoteliales por taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante citometría de flujo y microscopía confocal	88
2. Recubrimiento de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> con anticuerpos IgG1 humanos específicos	93
3. Ensayos de invasión de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> recubiertos con anticuerpos IgG1 humanos específicos en células HMEC-1	95
4. Expresión del FcRn	99
4.1. Expresión del FcRn a nivel de mRNA	99
4.2. Expresión del FcRn a nivel de proteína	100
5. Identificación de los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn humano	104
5.1. Estandarización de la PCR y análisis del polimorfismo (VNTRs) del promotor del FcRn en individuos mexicanos.....	104
5.2. Frecuencia de los polimorfismos (VNTRs) del promotor de la cadena α del FcRn humano	104
5.3. Polimorfismos del promotor del gen de la cadena α del FcRn humano en mujeres con infección aguda por <i>Toxoplasma gondii</i> y de sus recién nacidos.....	105
DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	118
PERSPECTIVAS	119
REFERENCIAS	120
ANEXOS	153
Anexo I. Descripción de los casos clínicos incorporados en este estudio y aspectos éticos relacionados	153
Anexo II. Artículos publicados	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática del desarrollo de la placenta humana	17
Figura 2.	Cinética de la expresión del FcRn en la placenta humana y de la transferencia de IgG materna al hijo durante el embarazo.....	23
Figura 3.	Proceso del paso de anticuerpos IgG maternos, mediado por el FcRn, en la placenta humana.	29
Figura 4.	Diagrama de la organización del gen de la cadena α del FcRn humano (FCGRT). 32	
Figura 5.	Proceso de transcitosis de citomegalovirus (CMV) recubiertos de IgG materna específica a través de la placenta humana.....	38
Figura 6.	Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	41
Figura 7.	Representación esquemática de un taquizoito de <i>Toxoplasma gondii</i>	43
Figura 8.	Proceso de invasión celular de <i>Toxoplasma gondii</i>	45
Figura 9.	Prevalencia de anticuerpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> en población de México.	50
Figura 10.	Respuesta inmune que se desarrolla en un individuo inmunocompetente durante una primo-infección por <i>Toxoplasma gondii</i>	53
Figura 11.	Gráfica del riesgo de transmisión vertical de <i>Toxoplasma gondii</i> y de daño al bebé durante el embarazo	54
Figura 12.	Diagrama de flujo que muestra la estrategia experimental del proyecto.....	63
Figura 13.	Microfotografías de células HUVEC y HMEC-1 con taquizoitos intracelulares de la cepa RH de <i>T. gondii</i> y teñidas con colorante de Wright	70
Figura 14.	Gráficas de la tinción con CFSE de taquizoitos de <i>T. gondii</i>	71
Figura 15.	Cinética de la invasión de taquizoitos de la cepa RH de <i>T. gondii</i> en cultivos confluentes y no confluentes de HMEC-1	81
Figura 16.	Cinética de la invasión de taquizoitos de <i>T. gondii</i> en células HMEC-1, en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico	82
Figura 17.	Número de vacuolas por célula HMEC-1 infectada con taquizoitos de <i>T. gondii</i> en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico.....	82
Figura 18.	Cinética de la invasión de taquizoitos de <i>T. gondii</i> en células HUVEC, en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico	83
Figura 19.	Número de vacuolas por célula HUVEC infectada con taquizoitos de <i>T. gondii</i> en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico.....	83
Figura 20.	Cinéticas de la invasión de taquizoitos de <i>T. gondii</i> de la cepa RH y de la cepa ME49 en células HMEC-1 y HUVEC	84
Figura 21.	Microfotografías de células HMEC-1 y HUVEC infectadas con taquizoitos de <i>T. gondii</i> y teñidas con colorante de Wright	85
Figura 22.	Número de vacuolas por célula HMEC-1 y HUVEC infectada con taquizoitos de <i>T. gondii</i> de las cepas RH y ME49	86
Figura 23.	Promedio del número de taquizoitos de <i>T. gondii</i> de la cepa RH y de la cepa ME49 por cada 100 células endoteliales.....	87
Figura 24.	Gráficas de citometría de flujo de células endoteliales humanas infectadas con taquizoitos de <i>T. gondii</i> teñidos con CFSE	89
Figura 25.	Microfotografías de células HMEC-1 y HUVEC invadidas por taquizoitos de <i>T. gondii</i> teñidos con CFSE	90
Figura 26.	Gráficas de citometría de flujo de células HMEC-1 invadidas por taquizoitos de <i>T. gondii</i> teñidos con CFSE, separadas de acuerdo a su intensidad de fluorescencia verde y observadas por microscopía confocal.....	91
Figura 27.	Promedio del porcentaje de células endoteliales infectadas con taquizoitos de <i>T. gondii</i> marcados con CFSE	92

Figura 28. Gráficas de citometría de flujo y microfotografías de microscopía confocal de taquizoitos de <i>T. gondii</i> recubiertos con IgG1 humana específica.....	93
Figura 29. Gráficas de citometría de flujo y microfotografías de microscopía confocal de taquizoitos de <i>T. gondii</i> teñidos con CFSE recubiertos con IgG1 específica.....	94
Figura 30. Porcentaje de células HMEC-1 invadidas por taquizoitos de <i>T. gondii</i> sin tratamiento, con suero negativo y recubiertos con IgG1 específica	96
Figura 31. Microfotografías de células HMEC-1 con taquizoitos de <i>T. gondii</i> intracelulares.....	96
Figura 32. Número de vacuolas por cada célula HMEC-1 infectada con taquizoitos de <i>T. gondii</i> sin tratamiento, con suero negativo y recubiertos con IgG1 específica.....	97
Figura 33. Número total de parásitos por 100 células HMEC-1 infectadas con taquizoitos de <i>T. gondii</i> sin tratamiento, con suero negativo y recubiertos con IgG1 específica	98
Figura 34. Gráficas de la expresión del mRNA de la beta-2-microglobulina humana y de la cadena α del FcRn humano, medida por RT-PCR en tiempo real	99
Figura 35. Gráficas de la expresión de la proteína del FcRn en células HMEC-1 y HUVEC, evaluada por citometría de flujo.	101
Figura 36. Microfotografías de microscopía confocal de la expresión de la proteína del FcRn humano en células HMEC-1	102
Figura 37. Microfotografías de microscopía confocal de la expresión de la proteína del FcRn humano en células HUVEC	103
Figura 38. Fotografía de un gel de agarosa de los productos de PCR del promotor de la cadena α del FcRn de nueve individuos homocigotos VNTR3/3.....	104
Figura 39. Fotografía de un gel de agarosa de los productos de PCR del promotor de la cadena α del FcRn de un individuo homocigoto VNTR2/2 y tres individuos homocigotos VNTR3/3	105
Figura 40. Fotografía de un gel de agarosa de los productos de PCR para identificar los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn de cuatro binomios madre y su neonato... ..	108

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios sobre los VNTRs del promotor del FcRn humano, sus frecuencias y su asociación con diferentes características	35
Cuadro 2. Tipos celulares humanos reportados como susceptibles de invasión por <i>Toxoplasma gondii</i>	46
Cuadro 3. Ensayos de invasión de taquizoitos de <i>T. gondii</i> en células endoteliales humanas con diferentes relaciones parásito:célula y diferentes tiempos analizados	80
Cuadro 4. Datos serológicos, de biología molecular, de transmisión vertical y características clínicas de nueve recién nacidos y de sus madres con infección aguda por <i>T. gondii</i> ..	106
Cuadro 5. Datos clínicos de los binomios de madres y de sus recién nacidos incorporados en este estudio	154

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
FcRn	Receptor neonatal para el Fc de la IgG
FcRs	Receptores para el Fc de inmunoglobulinas
VNTR	Repeticiones en tándem de número variable
CMV	Citomegalovirus
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz-9
HLA-G	Antígeno leucocitario humano-G
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
VHS	Virus de herpes simple
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
NK	Células asesinas naturales
IFN- γ	Interferón- γ
VEGF- α	Factor de crecimiento del endotelio vascular- α
Ang-2	Angiopoyetina-2
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Fas-L	Ligando de Fas
IDO	Enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa
DAF	Factor de aceleración del decaimiento
MCP	Proteína cofactor de membrana
MAC	Complejo de ataque de membrana
B2M	β -2-microglobulina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
AP-2	Complejo adaptador de clatrina
GTPasa	Enzima trifosfatasa de guanosina
Rab	Enzima GTPasa de la superfamilia Ras
HPEC	Células endoteliales de placenta humana
HRP	Peroxidasa de rábano
OVA	Ovoalbúmina
FCGR2B2	Vesículas de la placenta que expresan Fc γ RIIb y contienen IgG
MDCK	Células epiteliales de riñón canino
FCGRT	Gen de la cadena α del FcRn humano
Fcrn	Gen de la cadena α del FcRn murino
NF1	Factor nuclear 1
Alu	Secuencia DNA susceptible a endonucleasa de restricción de <i>A. luteus</i>
DPE	Función de promotor río abajo
SP1	Proteína estimulante 1
Ets	Factor de transcripción específico E26
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
THP-1	Células epiteliales intestinales tipo macrófagos humanos

Abreviatura	Significado
LPS	Lipopolisacárido
NF-κB	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera κ de células B activadas
IκBα	Inhibidor de NF-κB α
Caco-2	Células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal
STAT-1	Transductor de señal y activador de la transcripción-1
PIAS1	Inhibidor de STAT-1
SNP	Polimorfismo de un solo un nucleótido
IDVC	Inmunodeficiencia variable común
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal
gB	Glicoproteína B de VIH
Env	Proteína de la envoltura del VIH que se une a las células blanco
HEC-1	Células de carcinoma endometrial humano-1
VP	Vacuola parasitófora
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
SAG	Antígenos de superficie
SRSs	Secuencias relacionadas a las SAGs
SUSAs	Antígenos de superficie no relacionados a las SAGs
CDPKs	Cinasas dependientes de calcio
MIC	Proteínas de los micronemas
RON	Proteínas del cuello de las roptrias
TgAMA1	Antígeno de la membrana apical de <i>T. gondii</i>
GRA	Proteínas de los gránulos densos
HeLa	Células de cáncer cervical humano
MRC5	Células tipo fibroblastos de pulmón humano
HL-60	Células de leucemia promielocítica humana caucásica
CXCR2	Receptor para quimiocinas con motivos C-X-C 2
CCR1	Receptor para quimiocinas C-C 1
CPAs	Células presentadoras de antígenos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
NOS	Intermediarios reactivos de nitrógeno
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
MIF	Factor inhibitorio de la migración de macrófagos
SV40 T	Antígeno T grande del virus vacuolar de simio 40
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
HDMEC	Células endoteliales de microvasculatura dérmica humana
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
BeWo	Células (trofoblastos) de adenocarcinoma placentario humano
EEA-1	Antígeno-1 de endosomas tempranos
LAMP-1	Glicoproteína de membrana asociada a lisosomas
GM130	Marcador del aparato de Golgi

RESUMEN

El protozoario *Toxoplasma gondii* puede causar toxoplasmosis congénita. La transmisión vertical y el daño fetal varían durante el embarazo: en las primeras semanas la tasa de transmisión es baja, pero si ocurre, produce daño severo al embrión, mientras que, al final de la gestación ocurre lo contrario. Se ha visto que los anticuerpos y sus receptores (FcRs) son importantes en la respuesta contra el parásito, especialmente, los de clase IgG1; además, existe una relación directa entre la edad gestacional y el paso de IgG a través de la placenta, el cual es mediado por el receptor “neonatal” para Fc de IgG (FcRn), siendo la IgG1 la principal subclase que atraviesa, con variaciones para las otras tres. A pesar de lo anterior, se ha reportado una asociación entre anticuerpos maternos de esta subclase y daño en sus hijos infectados congénitamente, con variaciones entre binomios madre/hijo. Se han observado diferencias en los niveles de anticuerpos transportados a través de la placenta, lo que puede explicarse por diferencias alélicas de los anticuerpos o del FcRn. Se han identificado cinco alelos de repeticiones en tándem de número variable en el promotor de la cadena α del FcRn (VNTR1-5), siendo VNTR2 y VNTR3 los más comunes mundialmente. Los individuos homocigotos VNTR3/3 expresan 1.66 veces más FcRn que los heterocigotos VNTR2/3. El objetivo del trabajo fue asociar los VNTRs con la entrada de *T. gondii* a células endoteliales, con la transmisión vertical y con la severidad de la toxoplasmosis congénita. Se emplearon células endoteliales humanas de microvasculatura (HMEC-1) y de cordón umbilical (HUVEC). Se realizaron ensayos de invasión con dos cepas de *T. gondii*: una virulenta (RH) y una no virulenta (ME49) cubiertas con IgG1 humana específica. Se corroboró la expresión del mRNA y de la proteína del FcRn en estas células. Por otro lado, se estudiaron mujeres embarazadas con infección aguda por *T. gondii* y sus recién nacidos y se buscó la asociación entre los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn con la transmisión vertical y con el daño clínico. Con muestras de DNA de 87 individuos mexicanos se determinó la frecuencia de los VNTRs. Los resultados demostraron que los parásitos de ambas cepas de *T. gondii* cubiertos con anticuerpos IgG1, entran más frecuentemente a las células que los no recubiertos, lo cual podría explicar la relación entre IgG1 materna y el daño en los recién nacidos. Las HMEC-1 expresan mayores niveles del FcRn que las HUVEC, y hay variación individual en éstas últimas. Se encontró una frecuencia de 97.1% del VNTR3 en la población estudiada y de 2.9% del VNTR2, lo cual es similar a otras poblaciones. La frecuencia del VNTR2 en el grupo de mujeres que transmitieron la infección por *T. gondii* y cuyos hijos tuvieron problemas clínicos graves fue 7.7 más alta (22.2%). Las conclusiones fueron que el recubrimiento de los taquizoitos con IgG1 humana favorece su entrada a células endoteliales y se forman vacuolas parasitóforas, lo que protege al parásito de destrucción intracelular; y el polimorfismo del promotor del FcRn está relacionado con la transmisión de *T. gondii*, pero de manera opuesta a lo esperado, ya que se asoció el VNTR2 en las madres y no el VNTR3 en los hijos.

Palabras clave: anticuerpos, FcRn, células endoteliales, IgG1, *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis congénita, placenta, VNTR

ABSTRACT

The protozoan *Toxoplasma gondii* may cause congenital toxoplasmosis. Vertical transmission and fetal damage vary during pregnancy: in the first weeks the rate of transmission is low, but if it occurs it causes severe damage to the embryo, while at the end of pregnancy the opposite occurs. Antibodies and their receptors (FcRs) are important in the response against the parasite, especially those of the IgG1 subclass; also, there is a direct relationship between gestational age and the passage of IgG through the placenta, which is mediated by the "neonatal" Fc receptor (FcRn), being IgG1 the main subclass that traverses. In spite of these facts, an association between maternal IgG1 antibodies and damage in their congenitally infected children has been reported, with variations among mother/newborn pairs. Differences in the levels of antibodies transported through the placenta have been observed, which can be explained by allelic differences of antibodies or FcRn. Five alleles of the variable number of tandem repeats (VNTR1-5) have been identified in the FcRn α chain promoter, being VNTR2 and VNTR3 the most common worldwide. The homozygous VNTR3/3 individuals express 1.66 times more FcRn than the heterozygous VNTR2/3. The objective of this work was to associate the VNTRs with the entry of *T. gondii* to endothelial cells, with vertical transmission and with severity in human congenital toxoplasmosis. Human microvasculature (HMEC-1) and umbilical cord (HUVEC) endothelial cells were used. Internalization experiments were carried out with two strains of *T. gondii*: one virulent (RH) and one non-virulent (ME49), which were covered with specific human IgG1 antibodies. The expression of FcRn mRNA and protein in these cells was corroborated. Independently, pregnant women with acute infection by *T. gondii* and their newborns were studied and the association between VNTRs of the FcRn promoter with vertical transmission and with clinical damage was determined. Also, the VNTRs alleles frequency was determined in 87 Mexican individuals. The results were that the parasites of both *T. gondii* strains covered with IgG1 antibodies enter to the cells more frequently than the uncoated ones, which could explain the relationship between maternal IgG1 and the damage in their newborns. HMEC-1 expresses higher FcRn levels than HUVEC; besides, there is variation among individual HUVEC. A frequency of 97.1% of the VNTR3 and of 2.9% of the VNTR2 in the studied population was found, which is similar to other parts of the world. The frequency of VNTR2 in the group of women who transmitted *T. gondii* infection and whose children had severe clinical problems was 7.7 higher (22.2%). The conclusions were first, that covering of tachyzoites with human IgG1 favors their entry into endothelial cells and parasitophorous vacuoles are formed, which protects the parasite from intracellular destruction; and secondly, that the polymorphism of the FcRn promoter is related to transmission of *T. gondii*, but in an opposite way than expected, since VNTR2 was associated in mothers and not the VNTR3 in the offspring.

Key words: antibodies, FcRn, endothelial cells, IgG1, *Toxoplasma gondii*, congenital toxoplasmosis, placenta, VNTR

INTRODUCCIÓN

Las infecciones congénitas se definen como aquellas adquiridas por el feto como consecuencia de una infección de su madre durante la gestación. Pueden ser transmitidas por vía transplacentaria, por ruta ascendente a través de la vagina, durante paso del neonato por el canal del parto o después del nacimiento, principalmente por la lactancia (Jasso-Gutiérrez, 2006; Correa y Figueroa, 2014; Spinillo *et al*, 2014). Este grupo de infecciones son frecuentemente asintomáticas en las madres, pero pueden causar efectos severos en el hijo. El impacto sobre el desarrollo fetal puede ser causado directamente por los agentes infecciosos o por sus toxinas, o indirectamente por placentitis o por una respuesta inmune insuficiente o exacerbada de la madre o del feto (Givens y Marley, 2008; McClure y Goldenberg, 2009; McClure *et al*, 2010). En algunos casos, las manifestaciones de la infección pueden pasar inadvertidas al nacimiento, pero se desarrollan algún tiempo después (Jasso-Gutiérrez, 2006; Arora *et al*, 2017). Entre las infecciones congénitas más frecuentes a nivel mundial están aquellas causadas por citomegalovirus (CMV), *Treponema pallidum* (causante de la sífilis) y *Toxoplasma gondii* (Correa y Figueroa, 2014; Madrid *et al*, 2016; Arora *et al*, 2017). La toxoplasmosis congénita se presenta con alta frecuencia en México (2 de cada 1000 recién nacidos vivos) (Vela-Amieva *et al*, 2005). Además, representa un modelo de interés para estudiar la relación entre un patógeno y dos hospederos íntimamente relacionados: la madre y el hijo en gestación. En particular, en nuestro grupo demostramos un efecto paradójico entre la respuesta inmune materna, especialmente la mediada por anticuerpos de subclase IgG1 -que la protege de daño por replicación del parásito- y la patogenia de esta infección en el neonato infectado; este efecto contradictorio ha sido constatado por otros grupos (Cañedo-Solares *et al*, 2008; De Souza-E-Silva *et al*, 2012; 2013). Para explicar este fenómeno, hemos desarrollado una línea de investigación que involucra estudios en seres humanos, en un modelo murino y en cultivo celular.

En esta tesis se presentan los resultados relacionados con el papel que juega el receptor “neonatal” para el Fc de la IgG -FcRn- presente en la placenta y la toxoplasmosis congénita.

MARCO TÉORICO

El embarazo y la placenta

Durante la vida intrauterina el embrión o feto debe adquirir oxígeno y nutrientes, así como remover desechos, lo que le permite sobrevivir y crecer. La placenta y los tejidos que la rodean son capas que satisfacen estos requerimientos, al mismo tiempo que secretan hormonas que ayudan al útero a retener al embrión y producen reguladores de la respuesta inmune que impiden el rechazo (Gude *et al*, 2004; Burton y Fowden, 2015; Burton y Jauniaux, 2015). La placenta es una interfase muy compleja entre tejidos maternos y fetales. Alrededor de los tres días después de la fertilización, la mórula, pequeño grupo interno de células rodeado por un grupo más grande (trofotodermo), alcanza la cavidad uterina y se convierte en blastocisto. El primer paso de diferenciación consiste en que la masa celular interna, localizada en uno de los polos, origina al embrión, mientras que el trofotodermo, compuesto por trofoblastos, rodea la cavidad del blastocisto y se convierte en la placenta. Al día seis, el blastocisto se adhiere al endometrio y los trofoblastos se diseminan rápidamente y proliferan invadiéndolo, en un proceso llamado implantación. Conforme el embrión crece, las paredes superficiales de los capilares sufren erosión, dando lugar a la *decidua basalis*, con el inicio de infiltración de la sangre materna hacia las lagunas. Hacia el final de la segunda semana del embarazo comienza el desarrollo de las vellosidades coriónicas, cuya porción terminal consiste de una columna de citotrofoblastos y una envoltura, el sinciciotrofoblasto, como se puede observar en la figura 1 (James *et al*, 2012a; Ortiz-Alegría *et al*, 2014; Burton y Fowden, 2015).

Alrededor del día 14, cuando las arterias espirales invaden, la sangre materna llega en mayor cantidad, llenando la laguna alrededor del sinciciotrofoblasto y se convierten de vasos angostos a anchos, permitiendo un flujo de sangre materna más abundante alrededor de las vellosidades. Los vasos sanguíneos fetales son funcionales a partir del día 17 y con ello comienza la circulación feto-placentaria. Aproximadamente al día 21, se establecen las vellosidades coriónicas, unidades funcionales y estructurales de la placenta, bañadas por la sangre materna en la parte exterior (figura 1; Correa *et al*, 2007a; Harris, 2010; Maltepe *et al*, 2010; James *et al*, 2012b).

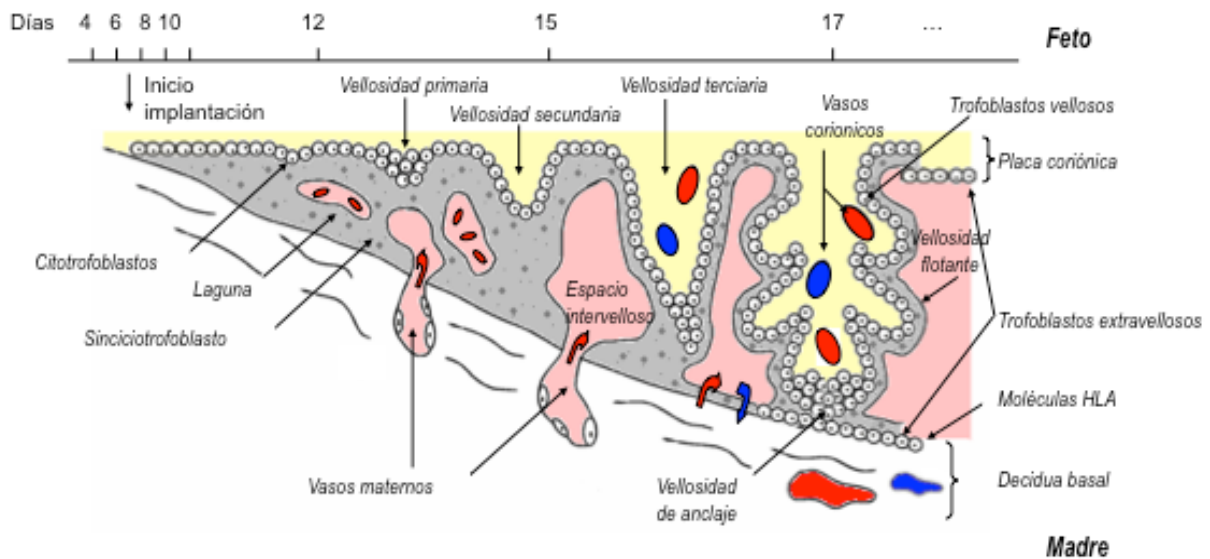


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo de la placenta humana, desde el día uno y hasta el final de la gestación. Tomado y modificado de Correa et al, 2007a.

Las vellosidades coriónicas

La placentación es un proceso que se lleva a cabo paso a paso e implica la diferenciación de las células troncales epiteliales especializadas de la placenta, los citotrofoblastos, los cuales emplean dos vías para dar origen a los citotrofoblastos diferenciados, que se encuentran en las vellosidades flotantes y en las vellosidades de anclaje. En la vía que origina a las vellosidades flotantes, algunos citotrofoblastos se diferencian por fusión en un sincicio multinucleado, **el sinciotrofoblasto**, que cubre la superficie de las vellosidades, donde está en contacto directo con la sangre materna. Esta población está adaptada para transportar una gran variedad de sustancias. Aquellos citotrofoblastos que se encuentran por debajo del sincicio se llaman trofoblastos intravellosos, mientras que aquellos que invaden al útero son los trofoblastos extravellosos. En la vía que da origen a las vellosidades de anclaje, los citotrofoblastos extravellosos permanecen como células individuales que se agregan en columnas e invaden el endometrio y el primer tercio del miometrio (invasión intersticial) y alcanzan a las arteriolas maternas que se encuentran en esta región

(invasión endovascular). Cerca de la mitad del embarazo, la población de los citotrofbastos de anclaje que invaden a la decidua y que expresan moléculas de adhesión, como la integrina $\alpha 1\beta 1$, proteinasas, como la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9), necesarias para la invasión, así como moléculas que inducen tolerancia inmune materna, como el HLA-G y la IL-10, alcanzan a los vasos uterinos y en un proceso llamado pseudo-vasculogénesis cambian su fenotipo de moléculas de adhesión, pareciéndose a las células endoteliales que reemplazan. Por ejemplo, expresan integrina $\alpha V\beta 3$, un marcador del endotelio angiogénico, así como la caderina endotelial vascular. El resultado de este proceso es una vasculatura “híbrida”, compuesta de células fetales y maternas. Ambos citotrofbastos de invasión y de pseudo-vasculogénesis son esenciales para un embarazo exitoso (Kaufmann y Castelluci, 1997; Gude *et al*, 2004; Staun-Ram y Shalev, 2005; Harris, 2010; James *et al*, 2012a; 2012b; Huppertz *et al*, 2014).

La placenta como barrera para los patógenos

La placenta es un órgano altamente especializado del embarazo que, junto con las membranas fetales y el líquido amniótico, ayudan al desarrollo y crecimiento normal del feto. La placenta tiene como funciones principales: el transporte de nutrientes y de gases respiratorios hacia el feto, la remoción de desechos, el metabolismo de sustancias (glucosa, algunos aminoácidos y lípidos), funciones endocrinas (producción de hormonas, eicosanoides y factores de crecimiento), funciones inmunológicas (producción de citocinas, quimiocinas, regulación de la respuesta inmune materna a nivel local) y funciones protectoras del feto contra ciertos xenobióticos, enfermedades maternas e infecciones (Gude *et al*, 2004; Burton y Jauniaux, 2015). Aunque la placenta es una barrera que previene la transmisión de microorganismos, existen algunos patógenos que logran atravesarla y llegan al feto (Jamieson *et al*, 2006; Carlier *et al*, 2012; Robbins y Bakardjiev, 2012). La placenta puede ser infectada por varias rutas, siendo las más frecuentes la infección ascendente y la vía hematogéna (Carlier *et al*, 2012; Spinillo *et al*, 2014). Las infecciones ascendentes se atribuyen a bacterias como los enterococos, estafilococos

coagulasa positivos, estreptococos anaerobios y *Escherichia coli*, los cuales se han relacionado con altas tasas de vaginosis e infecciones del epitelio cervical. Algunos patrones de infección placentaria *in utero* sugieren diseminación hematológica a partir del útero infectado (Pereira *et al*, 2005; Vigliani y Bakardjiev, 2014). Sin embargo, no son claros los mecanismos específicos por los que se lleva a cabo la transmisión. La mayoría de los patógenos que cruzan la placenta son intracelulares (al menos parcialmente) y tienen la capacidad de colonizar a los trofoblastos extravellosos en la decidua, a partir de la sangre materna (Arora *et al*, 2017). Por otro lado, se ha propuesto que la infección en la interfase sangre materna-sinciciotrofoblasto es posible, pero requiere que los microorganismos atraviesen la barrera sincicial (Robbins y Bakardjiev, 2012; Zeldovich *et al*, 2013). Algunos casos de villitis placentaria se han asociado con la presencia de múltiples patógenos, en donde se induce una expresión sincicial incrementada de ICAM-1 y por ende, la unión de monocitos circulantes -potencialmente infectados- a la superficie del sinciciotrofoblasto con daño inflamatorio (Xiao *et al*, 1997; Juliano *et al*, 2006).

Respuesta inmune durante el embarazo

Históricamente se planteó la hipótesis de que el embarazo está asociado con una supresión del sistema inmune; existen numerosos estudios que describen factores que la inducen; por ejemplo, la progesterona (Erlebacher, 2013; Racicot *et al*, 2014; Ghaebi *et al*, 2017). Actualmente, algunos aspectos médicos y evolutivos están en contra del concepto de inmunosupresión en la gestación, ya que las mujeres embarazadas parecen no ser más susceptibles a infecciones; sin embargo, hay controversia debido a que se ha descrito que el embarazo se asocia con un aumento de la gravedad de algunas infecciones, como la influenza, la malaria, la hepatitis E, la infección por el virus del herpes simple (VHS) y el sarampión, siendo mayor la gravedad en etapas tardías del embarazo. Incluso, se ha propuesto que las mujeres embarazadas pueden ser más susceptibles a la adquisición de malaria, infección por VIH y listeriosis, aunque la evidencia es limitada (Jamieson *et al*, 2006; Pazos *et al*, 2012). El sistema inmune es uno de los más importantes que protegen a la madre del

medio ambiente y al feto de daño. Durante el embarazo es cuando el sistema inmune materno se caracteriza por una red reforzada de reconocimiento, comunicación, tráfico y reparación de tejidos (Ghaebi *et al*, 2017). El feto y la placenta son los reguladores la respuesta inmune materna a nivel local, no sistémico, para su mantenimiento. Por tanto, es apropiado referirse al embarazo como una única condición, en la cual el sistema inmune materno es regulado, pero no suprimido. La inmunología del embarazo es el resultado de una combinación de señales y respuestas originadas del sistema inmune materno y del feto-placentario (King y Loke, 1999; Chaouat *et al*, 2004; Chaouat, 2007; Mor y Cardenas, 2010). La implantación, la placentación y el primer trimestre del embarazo requieren una fuerte respuesta inflamatoria. Durante esta primera etapa, el blastocisto rompe la capa epitelial del útero y se implanta, dañando el tejido endometrial durante la invasión; esto es seguido por el reemplazo de los vasos sanguíneos maternos por los trofoblastos del músculo liso vascular y endotelial, lo que asegura un aporte sanguíneo-fetal adecuado. Se requiere un ambiente inflamatorio tipo Th1 que repara el tejido uterino y remueve los detritus celulares. La segunda fase inmunológica del embarazo es el periodo del desarrollo y crecimiento fetal, en la cual hay un cambio hacia un fenotipo anti-inflamatorio (regulación). Finalmente, en la última etapa inmunológica de la gestación, el feto ha completado su desarrollo y hay una afluencia de células inmunes hacia el miometrio, lo que desencadena un proceso inflamatorio que promueve la contracción del útero, y la expulsión del bebé y de la placenta. Estos cambios locales en la respuesta inmune no alteran el estado inmunológico sistémico de la mujer embarazada, están altamente regulados y mantienen la homeostasis de ambos organismos: la madre y el feto (Hunt *et al*, 2006; Mor y Cardenas, 2010; Sappenfield *et al*, 2013).

Respuesta inmune a nivel de la placenta

El embarazo es un fenómeno muy complejo y con cambios sustanciales conforme avanza. Como se mencionó, al inicio se desarrolla un proceso inflamatorio intenso de tipo Th1 debido a la población leucocitaria que se encuentra en el endometrio y lo que será la *decidua basalis* (Mor y Cardenas, 2010). En este proceso participan células NK

(70%), macrófagos (20-25%), linfocitos T (2%) y células dendríticas (1.7%). Las células B generalmente están ausentes. Las células NK de la decidua son fenotípicamente distintas (CD56^{bright}, CD38⁺, CD16⁻) a las periféricas y son conocidas como NK uterinas (uNKs). Las uNKs, presentes al inicio del embarazo, incrementan los niveles de citocinas como el IFN- γ , la IL-18 y la IL-27, lo que conlleva a la respuesta inflamatoria mencionada (Moffet-King *et al*, 2002; Li *et al*, 2008). Asimismo, estas células llevan a cabo el mantenimiento y formación de arterias espirales, debido a que producen factor de crecimiento del endotelio vascular α (VEGF- α) y angiopietina-2 (Ang-2) (Gaynor y Colucci, 2017). Posterior a la implantación, se desarrollan múltiples mecanismos locales que impiden el rechazo del feto (Weetman, 1999; Thellin *et al*, 2000; Chaouat *et al*, 2004). Desde etapas tempranas, la placenta presenta antígenos de histocompatibilidad, pero la parte del sinciciotrofoblasto que da la cara a la sangre materna sólo muestra los solubles no clásicos HLA-G1 y -G2, que inhiben la función citotóxica de las NKs periféricas maternas, dejando intacta su función de síntesis de IFN- γ (Dahl *et al*, 2014; Gaynor y Colucci, 2017). Conforme avanza el embarazo, las células inmunes maternas, residentes en el útero gestante, inducen un aumento en los niveles de citocinas anti-inflamatorias Th2, como la IL-4, la IL-10, el TGF- β y la IL-13 y entonces, disminuye la producción de las citocinas pro-inflamatorias Th1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) (Hunt *et al*, 2006; Hunt y Langat, 2009). Además, este sincicio expresa el ligando de Fas (FasL) que contribuye a la inducción de apoptosis mediada por Fas de los linfocitos CD8⁺ y NKs periféricas (Kauma *et al*, 1999). La enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), sintetizada y secretada por el sinciciotrofoblasto, es esencial para el éxito del embarazo, ya que puede catabolizar el triptófano en el área placentaria, lo que reduce o inhibe la respuesta de los linfocitos T maternos (Thellin, 2000; Aluvihare *et al*, 2004). Asimismo, la activación del sistema del Complemento en embarazos exitosos se previene por la acción de tres proteínas de membrana de los trofoblastos: el factor de aceleración del decaimiento (DAF), la proteína cofactor de membrana (MCP) y la proteína reguladora del complemento (CD59). Las dos primeras inhiben la activación de la proteína C3, bloqueando la generación de la mayoría de los mediadores de la inflamación y daño tisular y la última previene el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (MAC), lo que

previene que las células fetales sean reconocidas como extrañas y por ende destruidas (Girardi *et al*, 2006; Regal *et al*, 2015).

Transferencia de inmunidad madre-hijo

Una de las funciones de la placenta es el transporte de sustancias de la sangre materna a la sangre fetal, las cuales deben atravesar el sinciotrofoblasto, el estroma del espacio intravelloso y el endotelio de los vasos sanguíneos fetales (Schneider, 1991; Sibley, 2009). Unas de las sustancias de alto peso molecular que atraviesan la placenta son los anticuerpos IgG (Saji *et al*, 1999; Roopenian y Akilesh, 2007). Cada uno de los tejidos y células placentarias expresan patrones únicos de los diferentes tipos de receptores para el Fc de IgG (Kristoffersen *et al*, 1990; Bright *et al*, 1994; Gafencu *et al*, 2003). Sin embargo, el único que se ha demostrado que transporta anticuerpos es el FcRn, localizado en el sinciotrofoblasto y en células endoteliales de los vasos fetales de la placenta (Leach *et al*, 1996; Simister *et al*, 1996; Saji *et al*, 1999; Roopenian y Akilesh, 2007). Durante el embarazo la transferencia de anticuerpos IgG es muy importante, ya que éstos median inmunidad pasiva transferida de la madre al hijo (Simister y Story, 1997). Se ha observado una relación directa entre la edad gestacional y el paso de las cuatro subclases de IgG a través de la placenta (Malek, 2003). Sin embargo, el transporte no es uniforme, depende de la afinidad de cada subclase de IgG por el FcRn: la eficiencia es siempre mayor para la IgG1, mientras que, para las otras tres subclases depende de la población de estudio (Saji *et al*, 1999; Dall'Acqua *et al*, 2002). En general, como se observa en la figura 2, el transporte de IgG en etapas tempranas del embarazo es ineficiente, comienza alrededor de la semana 16 y se incrementa bruscamente en la semana 22, alcanzando una concentración en el feto similar a la materna en la semana 26. La mayor parte de la IgG se adquiere durante las últimas 4 semanas de embarazo (Bright y Ockleford, 1995; Simister y Story, 1997; Szekeres-Bartho, 2002).

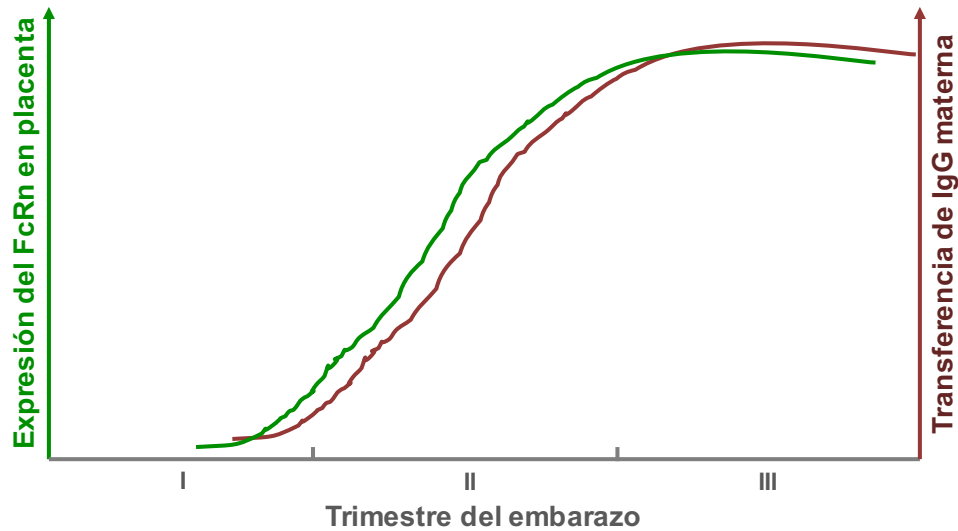


Figura 2. Cinética de la expresión del FcRn en la placenta humana y de la transferencia de IgG materna al hijo durante el embarazo.

El FcRn

El FcRn fue descubierto gracias a las contribuciones de varios grupos. Los primeros estudios que sentaron las bases de la transferencia de inmunidad materno-fetal durante la gestación (prenatal) y en la lactancia (posnatal) fueron realizados por Kitasato y Behring (1880), quienes describieron la presencia de “productos” en el suero de cobayos, los cuales prevenían efectos dañinos de la infección por *Corynebacterium diphtheriae* y de su toxina. Los animales re-expuestos, aún a dosis letales, estaban protegidos y sobrevivían sin daño, incluso si eran inyectados con suero de otro animal inmunizado. Los investigadores llamaron a la sustancia anti-toxina (posteriormente denominada anticuerpo), al tratamiento terapia sérica y al fenómeno transferencia de inmunidad. Ehrlich y Wernicke (1890-1895) demostraron que las hembras de cobayos, ratones y conejos inmunizadas contra la difteria tenían crías resistentes a la enfermedad, hasta por cuatro semanas, y la inmunidad se perdía al tercer mes después del nacimiento. Los individuos de la misma camada presentaban grados diferentes de inmunidad, algunos eran resistentes de manera natural y el grado de reacción de la madre con el tratamiento, determinaba el grado de

la inmunidad pasiva transmitida a las crías. Los nietos de hembras inmunizadas también eran resistentes y demostraron que los padres no la transmitían. Los investigadores identificaron que los recién nacidos también adquieren inmunidad con la lactancia, aún si lactan de otras madres inmunes (Ehrlich, 1890 [revisado en Krause, 1999]; Smith, 1905; 1907). Estos fenómenos se analizaron en especies diferentes, incluyendo seres humanos, y en contra de diversos agentes infecciosos (Famulener, 1912; Needham, 1931 [revisado en Schröder, 1992]; Nelson, 1932; McGirr, 1947; Rimington y Bickford, 1947).

Brambell y colaboradores realizaron estudios en conejos y reportaron el paso de proteínas plasmáticas maternas hacia el saco vitelino durante la gestación. Los siguientes estudios confirmaron que algunas proteínas eran anticuerpos maternos, cuya transferencia comenzaba a partir de la segunda mitad de la gestación e iba en aumento. En ratas y ratones el paso de anticuerpos durante la gestación era bajo, mientras que, durante la lactancia era más abundante. Los anticuerpos maternos atravesaban el intestino de los recién nacidos, eran detectados en la sangre de las crías desde los 30 minutos, con un pico a las tres horas y la transmisión duraba 16 días en ratones y 18 días en ratas (Brambell *et al*, 1947; Brambell y Hemmings, 1949; Brambell *et al*, 1950; 1951; Brambell y Halliday, 1956). Por otra parte, se observó transmisión de albúmina homóloga y heteróloga a los fetos de conejos y de cobayos (Schechtman y Abraham, 1958; Dancis y Shafran, 1958).

Diversos estudios caracterizaron la transferencia de anticuerpos en diferentes especies e identificaron que los seres humanos, primates, conejos y cobayos tienen paso durante la gestación, nacen con niveles iguales, incluso superiores a los de su madre, y aumentan con la lactancia. Las vacas, cabras, ovejas, caballos, burros y cerdos no tienen transferencia durante la gestación. Estas especies los adquieren del calostro; sin embargo, el paso a través del intestino del recién nacido es transitorio y dura unas horas. Las ratas, ratones, erizos, perros y gatos forman un grupo intermedio, ya que el paso de inmunoglobulinas durante la gestación es significativo; sin embargo, la mayor parte es transmitida con la lactancia, no se limita a unas horas y termina abruptamente cuando el intestino se vuelve impermeable (Brambell *et al*, 1954; Whipple *et al*, 1955; Bangham, 1960; Brambell, 1961; 1969).

En ambos casos de transferencia de anticuerpos, pre y posnatal, se confirmó que el paso es selectivo, ya que sólo la IgG de algunas especies atraviesan y no IgM, IgA, IgD, IgE, ni otras proteínas. La unión y el transporte de IgG son saturables, ya que grandes cantidades de sueros heterólogos o no específicos la bloquean. Además, la transmisión se lleva a cabo por la porción Fc de las inmunoglobulinas, ya que su tratamiento con pepsina evita el paso (Brambell *et al*, 1950; Halliday, 1958; Brambell *et al*, 1958; 1959; Brambell, 1960; Jones y Waldmann, 1972). La transmisión de los anticuerpos ocurre por pinocitosis en los bordes de las microvellosidades del endodermo del saco vitelino (no de la placenta) de fetos de conejos y del intestino de roedores neonatos y son distribuidos en todo el organismo. Posteriormente, se confirmó que el intestino delgado proximal (yeyuno e íleon) es el sitio de transmisión de IgG, mientras que, la parte distal absorbe las proteínas, pero no las distribuye (Halliday, 1955; Clark, 1959; Rodewald, 1970; Morris y Morris, 1974). La IgG se acoplaba a pH 6.0, entrando como un complejo ligando-receptor en endosomas, llegaba a la membrana plasmática contraria y se liberaba por la exposición a pH 7.4. Los análisis de proteínas purificadas demostraron una unión más alta para complejos FcRn:Fc 2:1 que para complejos 1:1 y confirmaron que la unión a pH 6.0 es de casi 100 veces mayor afinidad que a pH 7.0 (Huber *et al*, 1993; Burmeister *et al*, 1994a; 1994b; Raghavan *et al*, 1994; 1995; Popov *et al*, 1996). Asimismo, se determinó que existe transporte bidireccional de la IgG y una vía de reciclaje del receptor (Rodewald, 1980; Abrahamson y Rodewald, 1981). En 1984, se confirmó la presencia del receptor encargado de transportar a la IgG, el FcRn, que se aisló por primera vez de enterocitos de ratas neonatas y se determinó que está formado por dos cadenas proteicas, una de ~51 kDa y otra de ~15 kDa, siendo la más pequeña la β -2-microglobulina (B2M) (Rodewald y Kraehenbuhl, 1984; Simister y Rees, 1985). En 1989 se clonó a la subunidad grande, que es la que se une al Fc de la IgG, se identificó su secuencia y se comprobó que tiene una estructura génica y proteica parecida a la cadena α de las moléculas MHC-I, por lo que se denominó con el mismo nombre. Al cristalizarla los investigadores identificaron que posee una región intracelular, una transmembranal y una extracelular con tres dominios, pero, con un surco más estrecho, incapaz de unir péptidos y con un aminoácido aromático, el cual

se relaciona con motivos para interacciones con vesículas recubiertas (Simister y Mostov, 1989; Ahouse *et al*, 1993; Simister, 1993; Kandil *et al*, 1995). La cadena α del FcRn es similar entre especies, la de ratas presenta 91% de identidad con la de ratones y 65% con la de humanos. Sin embargo, hay diferencias en especificidad, siendo el FcRn humano más estricto, ya que sólo une IgG humana, de conejo y de cobayo, pero no une significativamente IgG de rata, bovino, oveja o ratón, con excepción de unión ligera a IgG2b murina. En contraste, el FcRn de ratón une a todas las IgGs analizadas (Ober *et al*, 2001). Las regiones críticas de unión a IgG y a albúmina se encuentran en el asa del dominio $\alpha 3$. Mutaciones en este sitio indicaron que las Histidinas (His) 310 y 433 contribuyen a la afinidad dependiente de pH, mientras que las His250 y 251 participan en la interacción FcRn/IgG (Raghavan *et al*, 1994). Los análisis de IgG1 murina y humana demostraron que los aminoácidos conservados localizados entre los dominios CH2-CH3 intervienen en la unión al FcRn murino, por lo que, participan en regular su vida media sérica. El cambio de His435 por Arginina, que corresponde a una de las diferencias entre IgG1 e IgG3 humana, demostró que está implicada en una vida media sérica menor de IgG3 (Kim *et al*, 1994; 1999). La parte citoplásmica del FcRn de todas la especies contiene motivos canónicos, que se unen a subunidades específicas del complejo adaptador de clatrina AP-2, un mediador de endocitosis y con un papel en la transcitosis. Estudios de microscopía de fluorescencia mostraron que el FcRn co-localiza con endosomas positivos a las GTPasas citoplásmicas Rab4, 5, 7, 9 y 11, que regulan el tráfico de proteínas y permiten el reclutamiento de otras moléculas efectoras para el dirigimiento hacia el blanco (Tesar *et al*, 2010).

Roberts y colaboradores (1990) desarrollaron el primer anticuerpo monoclonal (MC-39) que detecta a la cadena α del FcRn, el cual reaccionó con endosomas de células endodermales del saco vitelino y de la región cercana a la membrana basolateral del intestino de ratas neonatas. El receptor fue purificado y se identificó que presenta las mismas características que aquel aislado del intestino de ratas neonatas, por lo que se concluyó que ambos receptores estaban relacionados estructural y funcionalmente. Por otro lado, los primeros estudios enfocados en el catabolismo de inmunoglobulinas identificaron que IgG marcada con I¹²⁵ e inyectada en conejos y ratones, era depurada

de la sangre y encontrada principalmente en riñones, hígado, bazo y pulmones, lo que indicaba que era redistribuida y no catabolizada (McFarlane, 1957; Sweet *et al*, 1965). Brambell y colaboradores (1966) establecieron un modelo en el que la IgG es rescatada (en cantidad constante) de catabolismo por un “receptor para protección”, en vesículas de células pinocíticamente activas y regresa a la circulación cuando hay una concentración sérica baja; mientras que, con una concentración sérica alta, el receptor se satura y los anticuerpos se catabolizan. En ratonas gestantes identificaron que la tasa de transmisión neonatal de IgG era 20 veces más alta que la tasa de protección de catabolismo y propusieron un receptor común para ambos sistemas, mediado por diferentes tipos celulares, con diferentes tasas de pinocitosis, de densidades de receptor y por tanto, de proporciones de IgG protegida-catabolizada y transportada (Brambell, 1964; 1966). Debido a sus contribuciones, el receptor para el Fc de la IgG fue denominado receptor de Brambell (FcRb) y posteriormente FcRn (Junghans *et al*, 1997). Los siguientes estudios identificaron que el catabolismo de IgG en ratas ocurre en sitios distribuidos en todo el organismo, siendo el hígado y el bazo los órganos más activos. Dentro del hígado, las células endoteliales eran 10 veces más activas que los hepatocitos y se propuso que el catabolismo de IgG se lleva a cabo en el endotelio vascular, el cual presenta pinocitosis altamente activa, está distribuido ampliamente y en contacto estrecho con el plasma. Los análisis histoquímicos de músculo y de hígado murinos indicaron que el FcRn se expresa en el endotelio de arteriolas pequeñas y de capilares, pero no de vasos grandes como la vena central y la vasculatura portal. Estudios *in vitro* de células endoteliales de ratón mostraron que expresan un FcRn funcional, localizado en estructuras vesiculares del citosol (Borvak *et al*, 1998). Por otro lado, se demostró que células derivadas de la médula ósea y células presentadoras profesionales de antígenos de diferentes tejidos expresan grandes cantidades de FcRn. Experimentos con células murinas de médula ósea, que sobreexpresan el FcRn, demostraron que extienden significativamente la vida media de la IgG sérica, con lo que se propuso que, además del endotelio vascular, las células derivadas de la médula ósea son otro sitio para la homeostasis de IgG (Akilesh *et al*, 2007; Perez-Montoyo *et al*, 2009). Asimismo, se observó que los

patrones de catabolismo de IgG y de albúmina eran similares, aunque, regulados de manera independiente (Waldmann y Stroer, 1969; Henderson *et al*, 1982).

Por otra parte, los primeros estudios de la membrana basal de trofoblastos de placentas humanas revelaron la presencia de IgG y de sus subclases, no de IgA, IgM o IgE. La tipificación antigénica de la IgG indicó que eran de origen materno, siendo IgG1 e IgG3 las predominantes (Faulk *et al*, 1974; Johnson *et al*, 1977; Johnson y Faulk, 1978). En la parte apical de trofoblastos y en células endoteliales de vellosidades de placentas humanas encontraron actividad de receptor para el Fc de IgG, de sus subclases y de complejos inmunes, con selectividad, ya que sólo unía IgG humana, de conejo y de cobayo, era bloqueada por fragmentos Fc de las cuatro subclases de IgG humana y no por fragmentos Fab o F(ab')₂, no por IgM o IgA. También se detectó la presencia de β -2-microglobulina en estas células (Johnson *et al*, 1973; 1976; Faulk y Johnson, 1977; Matre, 1977; Johnson y Faulk, 1978; Matre y Haugen, 1978). Los análisis de hibridación *in situ* y de inmunohistoquímica confirmaron la presencia de mRNA y de proteína del FcRn en placentas humanas. En 1994 fue aislado y clonado a partir de sinciciotrofoblasto y se comprobó su papel en la transferencia de IgG materna (Story *et al*, 1994; Leach *et al*, 1996; Simister *et al*, 1996). En células HPEC (human placental endothelial cells) aisladas de vellosidades placentarias a término encontraron que: a) el FcRn se expresa activo funcionalmente; b) la transcitosis de IgG es un proceso tiempo dependiente y sucede preferentemente del lado basolateral al apical y c) la IgG y el FcRn co-localizan en compartimentos intracelulares endocíticos sensibles a cloroquina (Antohe *et al*, 2001). Después se corroboró que el proceso de transcitosis de IgG, mediado por el FcRn, sucede *in vivo*, en sinciciotrofoblasto y en las células endoteliales de los vasos fetales, el cual se puede observar en la figura 3 (Kristoffersen y Matre, 1996; Firan *et al*, 2001). Además, el FcRn distingue entre IgG nativa y modificada y controla su tráfico celular, la IgG nativa es rescatada y liberada fuera de las células; mientras que, la modificada es enviada a degradación (Radulescu *et al*, 2004). Algunas macromoléculas, como peroxidasa de rábano (HRP) y ovoalbúmina (OVA), unidas a IgG, cruzan la barrera placentaria, usando al FcRn (Sakuma *et al*, 2013). En modelos *in vitro* e *in vivo* el

FcRn puede transportar complejos inmunes IgG anti-IgE-IgE, aunque hay controversia al respecto (Paveglio *et al*, 2012; Bundhoo *et al*, 2015).

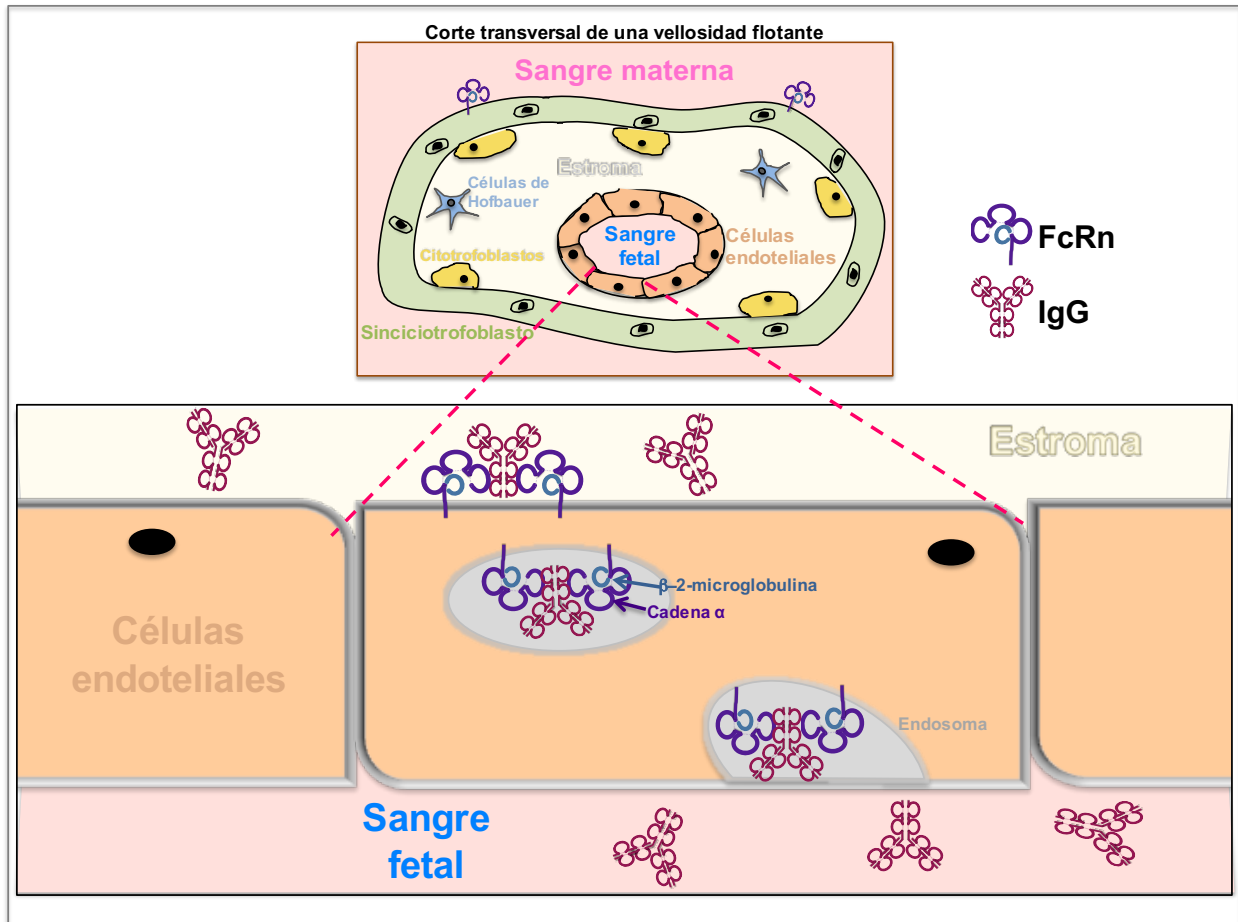


Figura 3. Diagrama del proceso del paso de anticuerpos IgG maternos, mediado por el FcRn, a través del sinciciotrofoblasto y de las células endoteliales de los vasos fetales de la placenta humana.

Otros estudios propusieron mecanismos alternativos para el paso de IgG a través de la placenta; sin embargo, con diversos análisis se rechazaron. Uno de ellos indicó que el FcγRIIb, que se expresa en vesículas que contienen IgG (compartimentos FCGR2B2) de células endoteliales de la placenta podría servir como transportador (Kim *et al*, 2009; Mohanty *et al*, 2010; Ishikawa *et al*, 2015). Otro mecanismo consistía en la ingestión oral de anticuerpos maternos contenidos en el líquido amniótico y su

paso a través de los enterocitos, por unión al FcRn, el cual se detectó en intestinos de fetos abortados (Israel *et al*, 1993).

En 1996 se generaron los primeros ratones knockout para el FcRn, en los cuales hubo bloqueo del transporte intestinal y de la protección de IgG. El catabolismo de los anticuerpos era 10 veces más rápido y tenían niveles de IgG más bajos, mientras que los niveles de IgA no se modificaban. En ratones knockout para la B2M (b2m^{-/-}) tampoco hubo detección del FcRn, ni transporte de IgG materna y aquellos de mayor edad tenían niveles de IgG autóloga 10 veces menores que los roedores normales, lo que indicó que la B2M es indispensable para la expresión y función del FcRn (Israel *et al*, 1996; Ghetie *et al*, 1996; Junghans y Anderson, 1996).

Después de la caracterización del FcRn, las investigaciones se enfocaron en buscar su expresión en diversos tejidos y células, así como otras funciones. Una de ellas es la capacidad del FcRn de unir complejos inmunes de IgG en células epiteliales, transportarlos y “entregarlos” a células dendríticas para que sean procesados y presentados a linfocitos T CD4⁺ en estructuras linfoides regionales (Jones y Waldmann, 1972; Abrahamson *et al*, 1979; Yoshida *et al*, 2004; 2006a; 2006b; Qiao *et al*, 2008; Cervenak *et al*, 2011). En células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) y en células dendríticas se demostró que el FcRn determina el destino intracelular de IgG unida al receptor o el FcRn no unido, los cuales son enviados a túbulos de reciclaje que emergen de endosomas tempranos. Cuando el FcRn une complejos IgG-antígeno los dirige, por entrecruzamiento, hacia lisosomas, donde son procesados, generando péptidos, los cuales son cargados en moléculas MHC-I y -II, dando lugar a respuestas específicas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que participan en el direccionamiento (Qiao *et al*, 2008; Weflen *et al*, 2013; Baker *et al*, 2014). En otro estudio con células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) el FcRn envía partículas del virus de la influenza opsonizadas con IgG hacia lisosomas para su destrucción, lo que ayuda al control de la infección (Bai *et al*, 2011). Por otro lado, el FcRn expresado en polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y células dendríticas participa en la fagocitosis de partículas recubiertas con IgG (Zhu *et al*, 2001; Vidarsson *et al*, 2006).

Otro tema que ha sido de interés, es la asociación entre la expresión del FcRn y la mejora o el desarrollo de algunas enfermedades (Palmeira *et al*, 2012). Por ejemplo, en un modelo murino se encontró que la saturación del FcRn por una dosis alta de IgG intravenosa mejoró la artritis reumatoide (Akilesh *et al*, 2004). Por otro lado, la presencia del FcRn durante la gestación y el transporte de IgG materna que induce la destrucción de plaquetas fetales se asoció con el desarrollo de trombocitopenia inmune fetal y neonatal (Chen *et al*, 2010). En otro estudio demostraron que la transferencia de IgG materna específica a algunos alérgenos regula el desarrollo de inflamación alérgica de las vías respiratorias de ratones neonatos, en una manera FcRn-dependiente (Nakata *et al*, 2010). Con estos antecedentes se propuso que el FcRn podría servir como blanco terapéutico para tratar enfermedades mediadas por anticuerpos patógenos. Por lo cual, se ha desarrollado un gran número de estudios enfocados en las ventajas terapéuticas del transporte de IgG y de otras moléculas mediado por el FcRn (Pyzik *et al*, 2015).

Gen del FcRn

El gen de la cadena α del FcRn es de copia única y se encuentra en el cromosoma 7 en ratones (*Fcfn*) y en el cromosoma 19 en seres humanos (*FCGRT*) y no en el cromosoma 17 o en el 6, respectivamente, donde se localiza el grupo de genes de los MHC. En ambos casos, es un gen genuino con una organización exón-intrón, similar a la de los genes de los MHC-I, con motivos de unión para los factores de transcripción NF-IL6 (nuclear factor for IL-6 expression) y NF1 (nuclear factor 1), pero, sin los elementos regulatorios en la región 5' (enhancer A, enhancer B y elemento de respuesta a IFN) (Ahouse *et al*, 1993; Kandil *et al*, 1996). La comparación de secuencias del *Fcfn* de ocho cepas de ratones mostró que el dominio distal a la membrana tiene al menos tres variantes de aminoácidos (Kandil *et al*, 1995). Estudios de Southern blot, usando una sonda de cDNA para el *Fcfn*, identificaron bandas en varias especies mamíferas y en pollos, lo que se sugirió que el origen del FcRn es a partir del receptor para IgG del saco vitelino de pollos, que correspondería a la

estructura primordial, el cual también une anticuerpos a pH 6.0 y no a pH 7.4, es específico y reversible (Linden y Roth, 1978; Tressler y Roth, 1987).

En el año 2000 se secuenció el gen del FcRn humano y se determinó que se ha extendido, comparado con los genes de los MHC-I clásicos, ya que presenta secuencias repetitivas en sus intrones, incluyendo múltiples elementos Alu en el cuarto intrón (Mikulska *et al*, 2000; Mikulska y Simister, 2000). El *FCGRT* está formado por 10671 pares de bases, comprendidos en 7 exones y 6 intrones y da lugar a una proteína de 365 aminoácidos (figura 4; Mikulska *et al*, 2000).

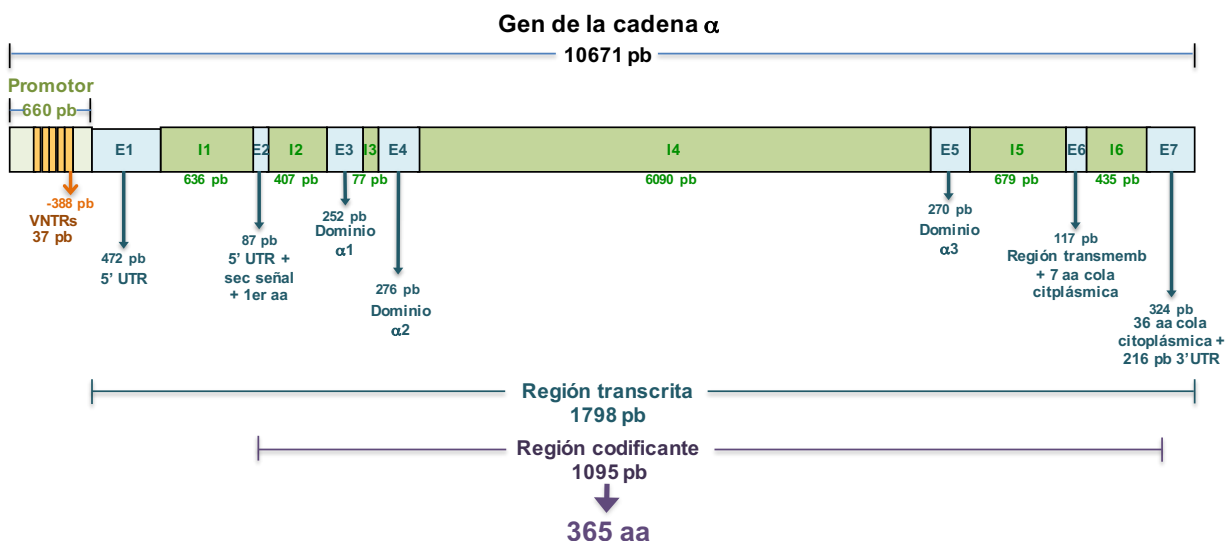


Figura 4. Diagrama de la organización del gen de la cadena α del FcRn humano (*FCGRT*). El *FCGRT* está compuesto por un promotor de 660 pb, siete exones y seis intrones, después de la transcripción y de la traducción se genera una proteína de 365 aminoácidos.

El promotor del *FCGRT* tiene un tamaño de 660 pb (figura 4). Algunos estudios con genes reporteros revelaron que contiene tres regiones reguladoras con diferentes funciones: 1) -372 a -140 con función represora; 2) -105 a -1 con función activadora; 3) +1 a +78 como dominio activador. El *FCGRT* no presenta ningún elemento TATA o secuencia Inr río arriba, ni un elemento central del promotor característico río abajo (downstream promoter feature -DPE-) y carece del contenido típico de un elemento activo, lo que hace incierta la naturaleza de la organización para el complejo de

iniciación de la transcripción. El estudio del promotor del FcRn humano, de ratón y de rata reveló sitios de unión putativos para la proteína estimulante 1 (stimulating protein 1, Sp1) o para factores tipo Sp1 (Mikulska *et al*, 2000; Mikulska y Simister, 2000; Jiang *et al*, 2004; Qiao *et al*, 2006). Los análisis del *Fcgrt* identificaron motivos de unión a factores de transcripción en la región proximal río arriba del promotor, como el NF1, Sp1 (caja GT) y el Ets (E26 transformation-specific), con diferencias de unión y de su efecto entre tipos celulares, lo que indica una regulación de manera tejido-específica del receptor (Tiwari y Junghans, 2005). Sin embargo, existen pocos datos sobre la regulación de la expresión del FcRn (Mikulska, 2015). La administración de corticoesteroides o de tiroxina en ratas lactantes inhibe la expresión del mRNA, así como la absorción de IgG, en una manera dosis y tiempo-dependiente (Martín *et al*, 1993). Otro grupo encontró que la estimulación de monocitos humanos con PMA (phorbol myristate acetate) incrementa la expresión de la proteína (Zhu *et al*, 2001). La estimulación de células epiteliales intestinales tipo macrófagos (THP-1) y de monocitos humanos recién aislados con TNF- α , LPS u oligodeoxinucleótido CpG, incrementan la expresión del FcRn. El tratamiento de estas células con un inhibidor específico de NF- κ B o con I κ B α resultó en expresión disminuida. Además, encontraron tres secuencias en los intrones 2 y 4 del *FCGRT* de unión a NF- κ B. Asimismo, la estimulación con TNF- α incrementó el transporte de IgG a través de células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal -Caco-2-. Estos datos indicaron que las secuencias intrónicas, vía señalización del NF- κ B, regulan la expresión y función del *FCGRT* por TNF- α (Liu *et al*, 2007). Posteriormente, en estas mismas células se encontró que el IFN- γ disminuye la expresión del FcRn. Este efecto fue reversible o bloqueado por mutaciones de los nucleótidos del centro del sitio de activación y por sobre-expresión del inhibidor de STAT-1 (PIAS1). El STAT-1 se une a un sitio de activación por IFN- γ en la región promotora del FcRn humano. Funcionalmente, el IFN- γ disminuyó el transporte bidireccional de IgG a través de una monocapa de células epiteliales polarizadas de pulmón Calu-3 (Liu *et al*, 2008).

Polimorfismos del gen del FcRn

Existen pocos reportes en los que se han identificado polimorfismos en el gen de la cadena α del FcRn. En un estudio con diez muestras de cDNA de placentas humanas (20 alelos), encontraron dos SNPs, correspondientes a las sustituciones G251T y C707T, sin cambio en los aminoácidos Pro19 y Arg171 del péptido maduro. Debido a que el número de muestras fue reducido, los alelos eran de baja frecuencia ≤ 0.14 (Gunraj *et al*, 2002). En otro estudio, secuenciaron la región 5' y los exones de 126 individuos japoneses y encontraron 33 variantes genéticas, de las cuales, se analizaron dos SNPs no sinónimos G629A (R210Q) y T889A (S297T), que fueron heterocigotos y sin significancia funcional en células HeLa, ya que ambas variantes mostraron localización intracelular y eficiencias de reciclaje de anticuerpos similares (Ishii-Watabe *et al*, 2010). Sachs y colaboradores (2006) describieron polimorfismos en el promotor del *FCGRT*, los cuales consisten en 1 a 5 repeticiones, de 37 pares de bases, en tándem de número variable (variable number of tandem repeats, VNTR1-5) (figura 4). Al analizar muestras de individuos Caucásicos encontraron que el alelo con tres repeticiones (VNTR3) era el más frecuente (92.0%), seguido del VNTR2 (7.5%) y en menor proporción los otros alelos (cuadro 1). En ensayos con plásmidos reporteros, el alelo VNTR3 tuvo dos veces más transcrito del FcRn que aquellos con VNTR2. El análisis por RT-PCR en tiempo real reveló que los monocitos de individuos homocigotos VNTR3 expresaron 1.66 veces más transcrito del FcRn que los monocitos de individuos heterocigotos VNTR2/3 ($P=0.002$). Además, estos monocitos portadores de VNTR2, también presentaron una menor capacidad de unión a IgG. Todos estos datos indicaron que los VNTRs del promotor del FcRn influyen en la expresión del receptor, lo que lleva a capacidades diferentes de unión a IgG (Sachs *et al*, 2006). En años posteriores se realizaron estudios que analizan la frecuencia de estos polimorfismos del promotor del FcRn en diferentes poblaciones y que han tratado de asociar con distintos problemas clínicos o con biodistribución de anticuerpos monoclonales terapéuticos. Como se puede observar en el cuadro 1 en todas las poblaciones analizadas el VNTR3 es el alelo más frecuente, seguido del VNTR2, con ligeras variaciones entre poblaciones (cuadro 1).

Cuadro 1. Estudios sobre los VNTRs del promotor del FcRn humano, sus frecuencias y su asociación con diferentes características.

Población de estudio	Características de la población (n)	Frecuencia de los alelos (%)	Asociación del genotipo del FcRn con alguna característica o enfermedad	Referencia
Alemanes	Donadores de sangre (447)	VNTR1: 0.1	Mayor actividad transcripcional para VNTR3 que para VNTR2. Monocitos de homocigotos VNTR3/3 expresaron 1.66 veces más mRNA del FcRn que los VNTR2/3 y también unieron más IgG polivalente	Sachs <i>et al</i> , 2006
		VNTR2: 7.5		
		VNTR3: 92.0		
		VNTR4: 0.2		
		VNTR 5: 0.2		
Chinos	Pacientes con nefritis por lupus (200) e individuos sanos (204)	VNTR1: 0.0	No hubo asociación del genotipo con nefritis por lupus, ni con indicadores de prognosis renal, patológica y clínica. Tampoco hubo asociación con niveles séricos de autoanticuerpos	Zhou <i>et al</i> , 2009
		VNTR2: 3.9		
		VNTR3: 95.9		
		VNTR4: 0.3		
		VNTR5: 0.0		
Checos	Recién nacidos (206) y binomios madre/hijo (103)	VNTR1: 0.2	No hubo asociación con niveles totales de IgG circulante, ni con sus subclases, ni en las mamás ni en los recién nacidos	Freiberger <i>et al</i> , 2010a
		VNTR2: 6.4		
		VNTR3: 92.6		
		VNTR4: 0.7		
		VNTR5: 0.0		

Cuadro 1. Estudios sobre los VNTRs del promotor del FcRn humano, sus frecuencias y su asociación con diferentes características (continuación).

Población de estudio	Características de la población (n)	Frecuencia de los alelos (%)	Asociación del genotipo del FcRn con alguna característica o enfermedad	Referencia
Checos	Pacientes con Inmunodeficiencia variable común (IDVC) (62)	VNTR1: 0.0	No hubo diferencias entre homocigotos VNTR3/3 y portadores del alelo VNTR2 en características clínicas o de laboratorio, infecciones de tracto respiratorio, estructura pulmonar y anomalías funcionales u otras características fenotípicas de IDVC	Freiberger <i>et al</i> , 2010b
		VNTR2: 8.9		
		VNTR3: 90.3		
		VNTR4: 0.8		
		VNTR5: 0.0		
Japoneses	Pacientes con cáncer (126)	VNTR2: 3.2	----	Ishii-Watabe <i>et al</i> , 2010
		VNTR3: 96.8		
Franceses	Pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratados con cetuximab (94) y sanos (198)	VNTR1: 0.0	Pacientes homocigotos VNTR3 tuvieron distribución menor de cetuximab que VNTR2/3 y VNTR3/4. El genotipo no afectó la eliminación. Los VNTRs influyen en la distribución de mAbs en el organismo	Passot <i>et al</i> , 2013
		VNTR2: 8.4		
		VNTR3: 90.4		
		VNTR4: 1.0		
		VNTR5: 0.2		
Belgas	Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) tratados con Infliximab (Ac anti-TNF) (534)	VNTR1: 0.0	Pacientes con genotipo VNTR2/3 tenían concentraciones menores de anticuerpos anti-TNF que VNTR3/3. El genotipo VNTR2/3 se asoció con Infliximab más bajo y con menor exposición a adalimumab en pacientes con IBD	Billiet <i>et al</i> , 2016
		VNTR2: 9.4		
		VNTR3: 90.2		
		VNTR4: 0.4		
		VNTR5: 0.1		

FcRn e infecciones

El FcRn expresado en epitelios tiene un papel en la defensa del hospedero, con funciones inmunorreguladoras en las superficies de las mucosas, ya que se ha visto que en algunas infecciones participa en la fagocitosis de bacterias opsonizadas con IgG o interviene en el transporte de IgG específica que previene la replicación de algunos virus, como el herpes simple tipo 2 o el virus de la influenza (Vidarsson *et al*, 2006; Bai *et al*, 2011; Li *et al*, 2011). Sin embargo, en otros estudios al FcRn se le ha atribuido un papel facilitador de infecciones. Por ejemplo, se demostró que el citomegalovirus recubierto de IgG materna es capaz de cruzar el sinciciotrofoblasto de placentas humanas, usando al FcRn, con lo cual infecta a los citotrofoblastos subyacentes, al estroma, a las células endoteliales de las vellosidades placentarias y por tanto, al feto, como se observa en la figura 5. Esto debido a que se detectó co-localización de IgG, del FcRn y de la glicoproteína B (gB) del virus en vesículas proximales a la superficie del sinciciotrofoblasto que está en contacto con sangre materna. Este proceso se identificó en placentas de mujeres con títulos bajos o moderados de anticuerpos neutralizantes anti-gB. El grado de infección de la placenta fue inversamente proporcional al nivel de IgG materna neutralizante (Maidji *et al*, 2006). En otro estudio con virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), en presencia de IgG anti-proteína de envoltura (Env) y en contacto con la superficie apical de monocapas de células de carcinoma endometrial humano (HEC-1A), se incrementó la transcitosis de los viriones, tanto para cepas de laboratorio, como para aislados clínicos, en una manera dosis-dependiente. Los virus expuestos a pH 6.0 tuvieron más de 20 veces transcitosis que a pH 7.4 o en contacto con IgG negativa a cualquier pH. Con IgG mutada e incapaz de unirse al FcRn hubo transcitosis disminuida y con IgG mutada de mayor afinidad hubo incremento en el paso de los viriones. El bloqueo del FcRn con anticuerpos y la inhibición de la acidificación endosomal redujeron la transcitosis incrementada. Se llevó a cabo transcitosis similar con anticuerpos no neutralizantes que con neutralizantes. Sin embargo, la IgG neutralizante bloqueó parcialmente la infectividad de los virus transportados. Hubo transcitosis aumentada a pH bajo con IgG purificada de fluido cervicovaginal y de líquido seminal de personas infectadas con VIH. Por lo que, los autores sugirieron que la IgG específica para Env, la

cual aumentó la transcitosis a través de células epiteliales, vía FcRn, es un mecanismo de translocación del virus en el tracto genital y hacia células blanco susceptibles (Gupta *et al*, 2013).

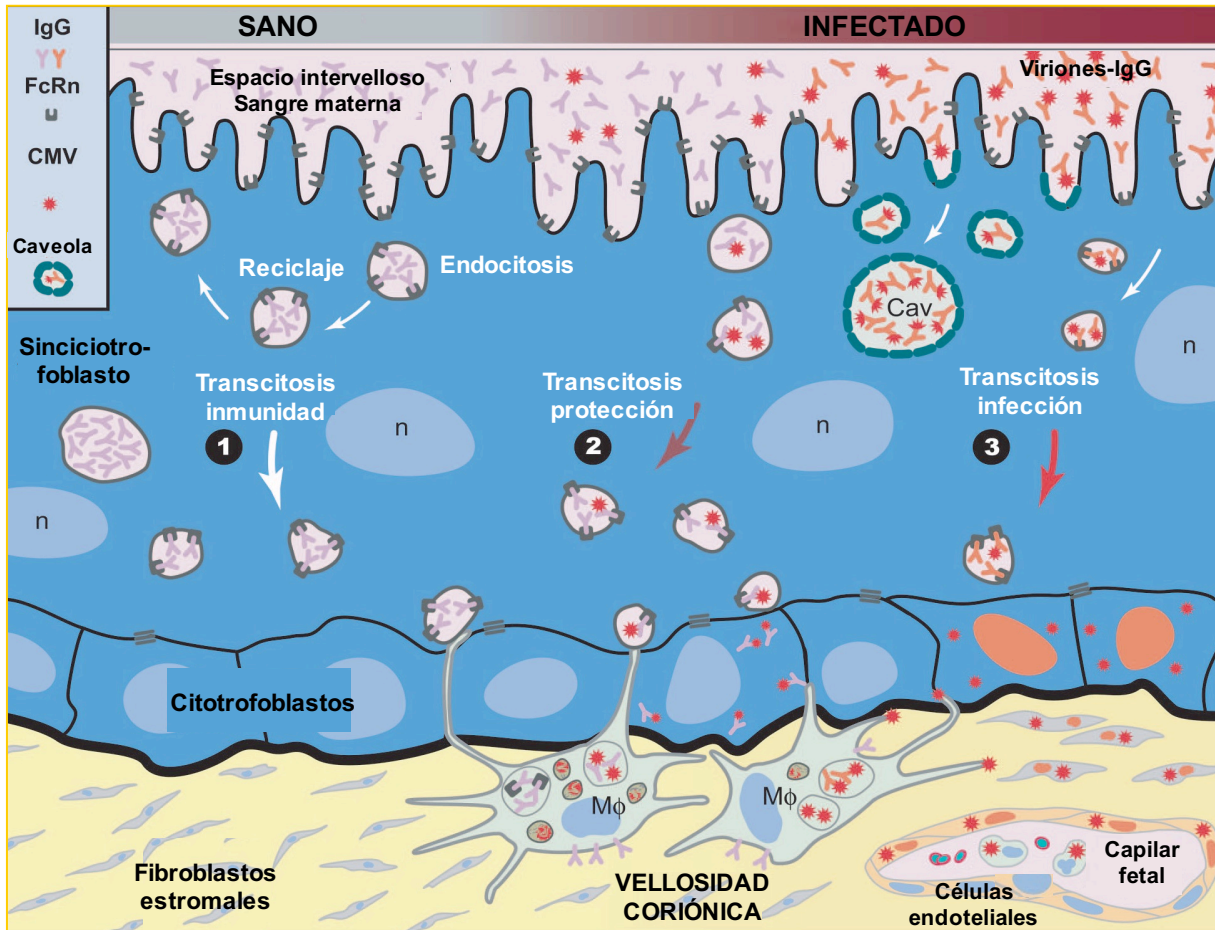


Figura 5. Proceso de transcitosis de citomegalovirus (CMV) recubiertos de IgG materna específica a través de la placenta humana. Específicamente a través del sinciotrofoblasto y de células endoteliales de las vellosidades placentarias, mediado por FcRn, hasta producir infección fetal. Tomado y modificado de Maidji *et al*, 2006.

Toxoplasma gondii

Aspectos generales

Toxoplasma gondii es un protozoario parásito, intracelular obligado, que pertenece al Phylum Apicomplexa, término que hace referencia al complejo apical de su citoesqueleto. Este patógeno es capaz de infectar a una gran variedad de animales homeotermos, entre ellos el ser humano (Montoya y Liesenfeld, 2004).

Toxoplasma gondii es la única especie del género *Toxoplasma* y su clasificación taxonómica es la siguiente (Tenter *et al*; 2000; Dubey, 2010):

Phylum: Apicomplexa
Clase: Sporozoa
Subclase: Coccidiasina
Orden: Eimeriorina
Familia: Toxoplasmatidae
Género: *Toxoplasma*

Filogenéticamente, *T. gondii* se encuentra relacionado con otros parásitos Apicomplexa, como *Plasmodium*, *Pneumocystis*, *Sarcocystis* y de manera más cercana a *Neospora caninum* (Dubey, 2010; Sibley, 2011). El nombre de *Toxoplasma* se deriva de la palabra *toxon*, término griego que significa “arco”, refiriéndose a la forma que presenta el taquizoito *in vitro*, y de *plasma*, que significa vivo (Dubey, 2008; Dubey 2010). *Toxoplasma gondii* fue descubierto en el Norte de África, en 1908, por Nicolle y Manceaux, en tejidos del roedor *Ctenodactylus gundi*, del cual obtuvo el nombre de la especie, y en el mismo año por Splendore, en Brasil, en tejidos de un conejo (Dubey, 2008; Ferguson, 2009).

Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

El ciclo de vida de *T. gondii* comienza en los felinos, hospederos definitivos, los cuales ingieren tejidos infectados con quistes tisulares, en los que están contenidos desde cientos, hasta miles de bradizoitos (formas infectivas de proliferación lenta). Los felinos también pueden infectarse por la ingestión de ooquistes esporulados. Una vez ingeridas las formas quísticas, las enzimas proteolíticas del estómago y del intestino delgado rompen y degradan la pared y se liberan los bradizoitos o los esporozoitos, que penetran a las células epiteliales del intestino delgado (Dubey, 1998; Dubey *et al*, 1998; Dubey, 2010). Dentro de los enterocitos se desarrollan las formas de replicación sexual, que a su vez dan origen al ooblasto y al ooquiste no esporulado, el cual se libera con las heces y, en condiciones ambientales adecuadas, esporula, pudiendo permanecer viable hasta 18 meses en tierra húmeda y tibia (Speer y Dubey, 2005). El ciclo de vida de *T. gondii* se puede observar en la figura 6.

Los hospederos intermediarios (incluidos los seres humanos) se infectan por ingestión de ooquistes esporulados presentes en agua o alimentos contaminados, o de quistes tisulares presentes en tejidos de otros hospederos intermediarios. Una vez ingeridos se liberan los esporozoitos o los bradizoitos y se convierten en taquizoitos (formas de reproducción rápida; figura 7); éstos pueden invadir cualquier célula nucleada, se replican hasta romper a la célula, se liberan e invaden a células adyacentes, diseminándose a través de los tejidos del hospedero. Por efecto del sistema inmune del hospedero, los taquizoitos se diferencian a bradizoitos, se enquistan y permanecen de por vida, con replicación lenta (Dubey *et al*, 1998; Black y Boothroyd, 2000; Sullivan y Jeffers, 2012).

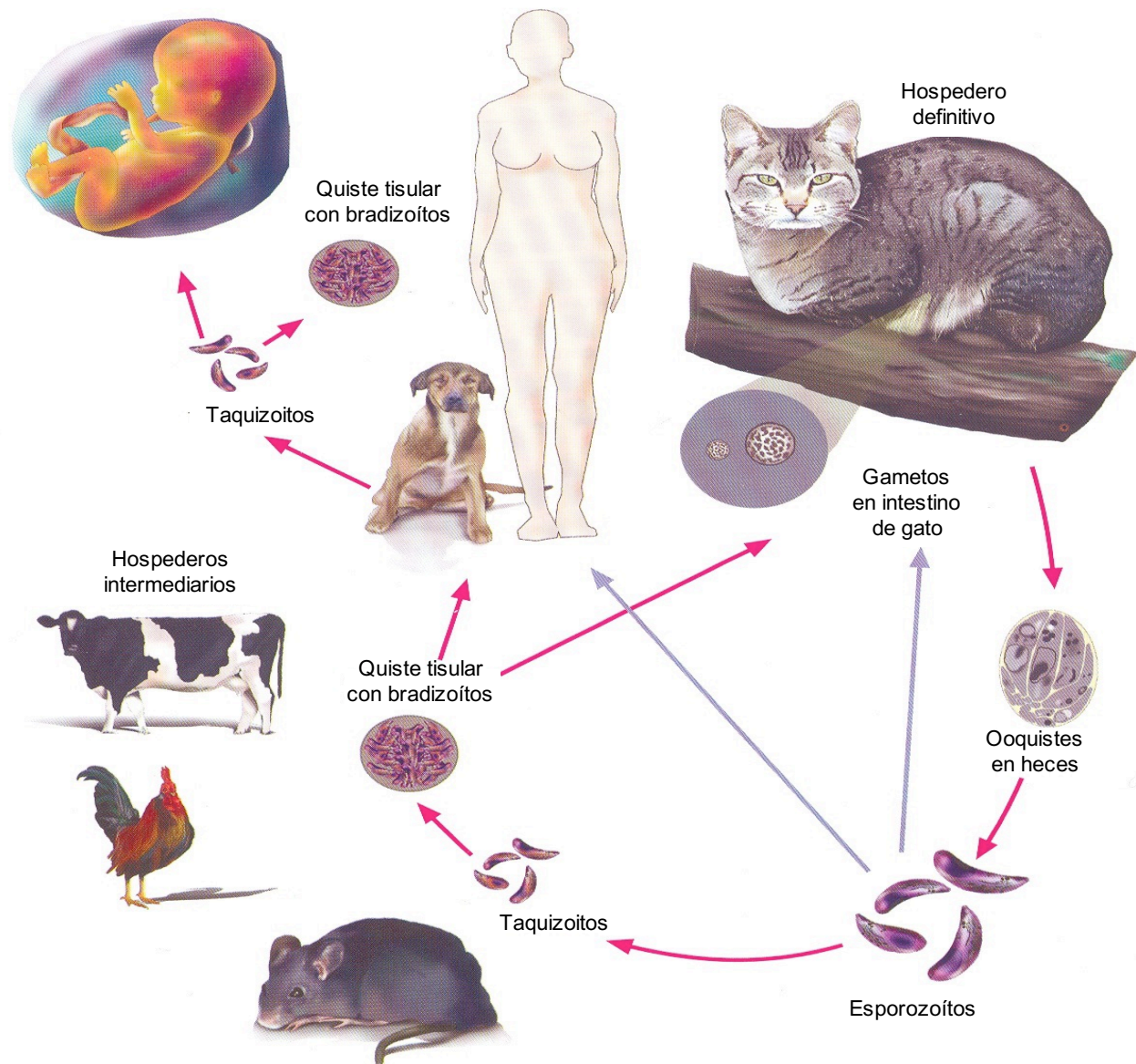


Figura 6. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Tomado y modificado de Correa et al, 2005.

Ciclo celular de *Toxoplasma gondii*

La invasión de células hospederas es un evento crucial en la supervivencia del taquizoito de *T. gondii*. El proceso de invasión celular implica la formación una vacuola parasitófora (VP), producida a partir de la membrana plasmática de la célula hospedera, dentro de la cual se replica, y posteriormente la lisa e invade células vecinas. De acuerdo con diversos estudios, todas las células nucleadas de animales

homeotermos son susceptibles de invasión por *T. gondii* y permiten su multiplicación intracelular (Dlugońska, 2014). Después de una infección oral, el parásito cruza activamente barreras biológicas no permisivas, como el intestino, la barrera hematoencefálica y la placenta, con lo que obtiene acceso a distintos tejidos y puede causar lesiones (Barragan y Sibley, 2003; Barragan y Hitziger, 2008; Robbins *et al*, 2012).

El proceso de invasión es rápido y complejo, que consiste de múltiples pasos regulados independientemente, como se observa en la figura 8 (Sibley, 1993; Carruthers y Boothroyd, 2007; Kafsack *et al*, 2007; Laliberté y Carruthers, 2008). Primero, el parásito se adhiere a la superficie de la célula hospedera por una interacción de afinidad baja, mediada por proteínas unidas a glicosil fosfatidil inositol (GPI): SAG (surface antigens), SRSs (SAG-related sequences) y SUSAs (SAG-unrelated surface antigens), que se encuentran en la superficie del parásito. Se ha sugerido que la unión de los parásitos a las células hospederas es mediada por más de una molécula; sin embargo, no se han identificado receptores específicos. Algunas SAGs parecen interactuar con glicosaminoglicanos sulfatados, como la heparina, el fucoidano y el sulfato de dextran. Tampoco es claro si el parásito puede invadir cualquier región de la membrana plasmática o si busca regiones enriquecidas en proteínas o lípidos específicos (Boothroyd *et al*, 1998; Black y Boothroyd, 2000; Jung *et al*, 2004).

El taquizoito de *T. gondii* posee tres organelos secretorios, los micronemas, las roptrias y los gránulos densos, con alta capacidad de almacenaje de proteínas, las cuales participan en la unión a la célula hospedera, la penetración y la formación de la vacuola parasitófora (figuras 7 y 8). El retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, el apicoplasto y la mitocondria están cerca del núcleo. Los micronemas y las roptrias se encuentran en la región apical y los gránulos densos están distribuidos a lo largo del citoplasma. A partir del conoide se organizan los microtúbulos y los microfilamentos del citoesqueleto que se encuentran anclados al complejo interno de membrana y a la membrana plasmática (Carruthers, 1999; Baum *et al*, 2006; Corvi *et al*, 2011).

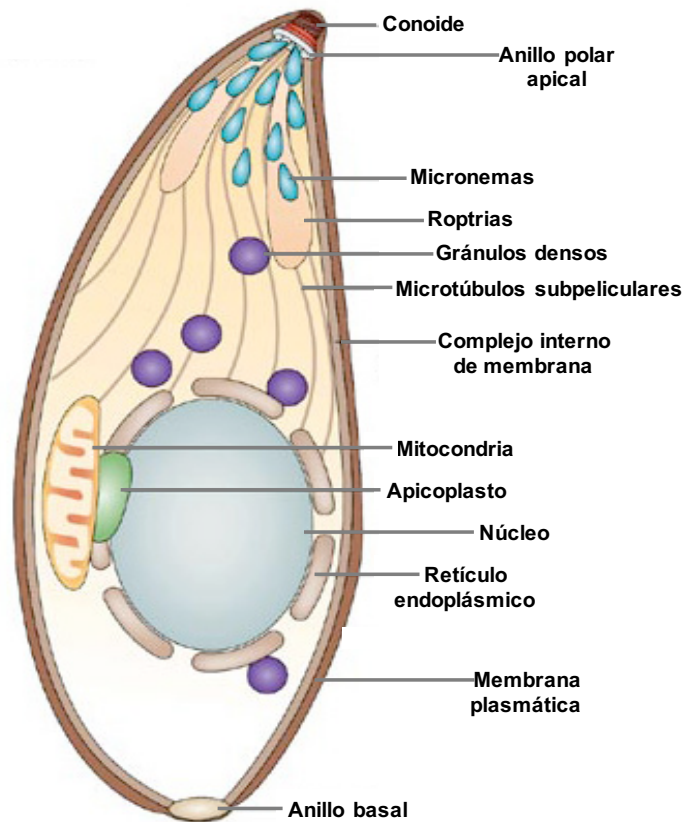


Figura 7. Representación esquemática de un taquizoito de *Toxoplasma gondii* que muestra sus organelos celulares. Tomado y modificado de Baum et al, 2006.

Una vez que se lleva a cabo la unión del parásito a la célula hospedera, una señal desconocida desencadena un incremento citosólico de calcio, el cual estimula la descarga de los micronemas; las cinasas dependientes de calcio (CDPKs) están involucradas en dicha descarga, siendo la TgCDPK1 la responsable de regular la motilidad y la invasión (Lourido *et al*, 2012). Se han identificado al menos 20 proteínas de micronemas (MICs), muchas de ellas son adhesinas transmembranales, con dominios conservados tipo trombospondina, factor de crecimiento epidermal o lectina; otras MICs son proteínas accesorias de las adhesinas (Soldati *et al*, 2001; Carruthers y Boothroyd, 2007). La adhesina más estudiada es MIC2, cuya inhibición bloquea la invasión de *T. gondii* a la célula hospedera y que se ha propuesto como uno de los determinantes de la virulencia del parásito (Brossier y Sibley, 2005; Huynh y

Carruthers, 2006). Posteriormente, un estímulo desconocido dispara la exocitosis de las proteínas RON2, RON4, RON5 y RON8 (provenientes del cuello de las roptrias) que se unen a TgAMA1, una proteína de los micronemas, forman la unión móvil, la cual comienza como un contacto estrecho entre el extremo apical del parásito y la membrana plasmática de la célula y se convierte en un anillo que migra a lo largo del parásito, conforme la invasión avanza (Mordue *et al*, 1999; Alexander *et al*, 2005; Dubremetz, 2007). Entonces, el parásito emplea una forma de motilidad única, llamada “gliding”, que es promovida por la maquinaria de actinmiosina (Opitz y Soldati, 2002). La unión móvil también se ancla al citoesqueleto de actina de la célula hospedera. Se han identificado dos proteínas de las roptrias, Toxofilina y RON8, que interactúan con el citoesqueleto de actina y que se exponen hacia el citoplasma de la célula hospedera durante la invasión. Conforme el parásito penetra a la célula hospedera forma su vacuola parasitófora, cuya membrana está formada principalmente por lípidos de la célula hospedera (Carruthers, 1999; Carruthers y Boothroyd, 2007; Blader y Saeij, 2010; Caffaro y Boothroyd, 2011). El contenido proteico de esta membrana es definido por *T. gondii*, relacionado con el escape del sistema endolisosomal de la célula hospedera. Además, presenta proteínas que fomentan el reclutamiento de organelos celulares como las mitocondrias y el retículo endoplásmico, lo que le permite la adquisición de nutrientes, a través de la formación de poros, que llevan a cabo la difusión bidireccional de pequeñas moléculas que provienen del citosol de la célula hospedera (Charron y Sibley, 2002; Martin *et al*, 2007; Gendrin *et al*, 2008; Sinai, 2008; Clough y Frickel, 2017). Posterior a la entrada de *T. gondii*, se inyectan las proteínas de la parte bulbosa de las roptrias en pequeñas vesículas que se fusionan con la VP. Las proteínas de los gránulos densos (GRAs) son liberadas durante y después de la invasión dentro de la VP, permanecen solubles en el lumen o se asocian a la membrana o a la red túbulo-vesicular, la cual soporta el arreglo característico de los parásitos en replicación (Carruthers, 1999; Nam, 2009). Las GRAs también están involucradas en el control de moléculas efectoras y algunas se han detectado en el núcleo de la célula hospedera (figura 8; Mercier y Cesbron-Delauw, 2015).

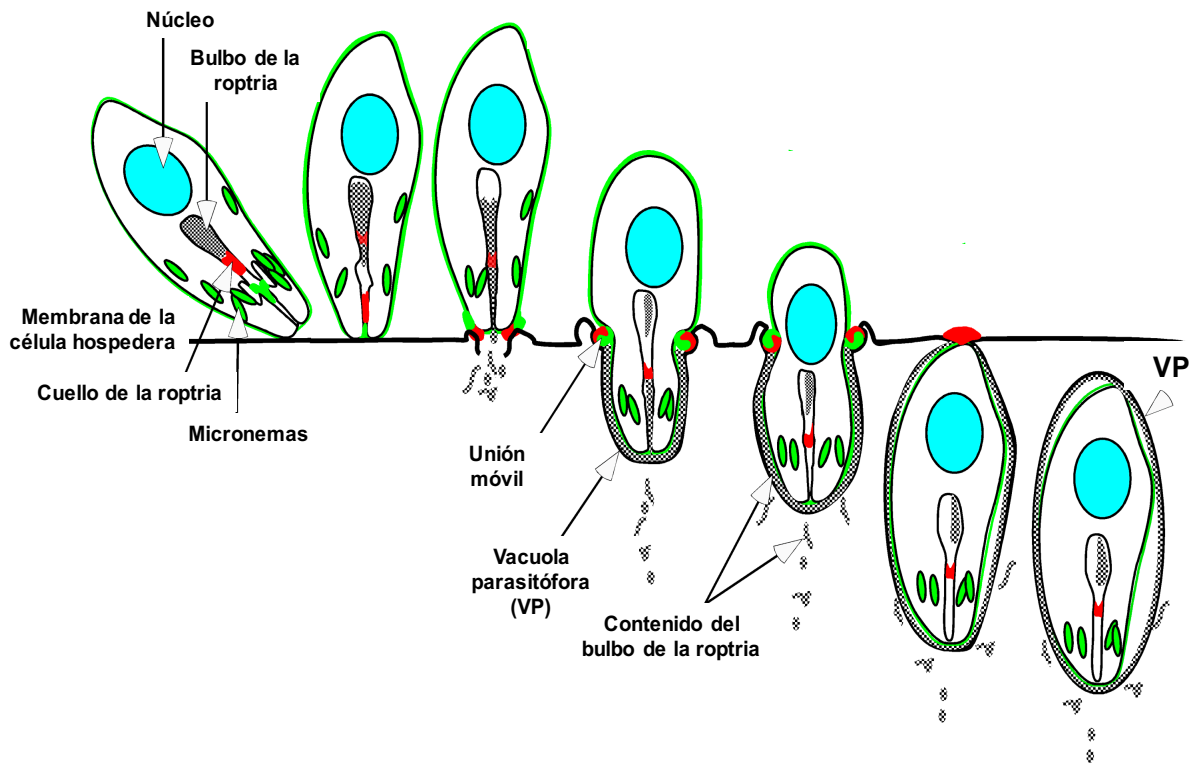


Figura 8. Proceso de invasión celular de *Toxoplasma gondii*.
Tomado y modificado de Carruthers y Boothroyd, 2007.

Invasión de *Toxoplasma gondii* en diferentes tipos celulares

Se ha demostrado que *T. gondii* tiene la habilidad de invadir cualquier célula nucleada de origen vertebrado que se haya probado *in vitro*; sin embargo, son pocos los tipos celulares analizados, principalmente de seres humanos. Los modelos celulares empleados son heterogéneos, en cuanto a la relación parásito:célula, los tiempos de interacción, las cepas del parásito y las condiciones de los ensayos, por lo cual los porcentajes de células infectadas varía y no hay datos específicos que indiquen que algunos tipos celulares son más susceptibles que otros (cuadro 2).

Cuadro 2. Tipos celulares humanos reportados como susceptibles de invasión por *Toxoplasma gondii*.

Tejido	Tipo celular	Cepa de <i>T. gondii</i>	Genotipo de <i>T. gondii</i>	Relación parásito:célula	Tiempo de interacción (h)	% Células infectadas	Referencia
Cordón umbilical	Endoteliales (HUVEC)	RH	I	2:1	1	58.0	Benedetto <i>et al</i> , 1997
					0.5	6.3	
					1	8.1	
					2	14.6	
					3	16.1	
		ME49	II	10:1	4	19.3	Cañedo-Solares <i>et al</i> , 2013
					0.5	19.4	
					1	32.4	
					2	32.1	
					3	44.7	
Micro-vasculatura	Endoteliales HMEC-1	RH	I	10:1	4	48.6	Cañedo-Solares <i>et al</i> , 2013
					0.5	8.4	
					1	31.8	
					2	33.0	
					3	37.0	
		ME49	II	10:1	4	46.8	
					0.5	41.1	
					1	48.7	
					2	49.7	
					3	62.7	
4	54.3						

Cuadro 2. Tipos celulares humanos reportados como susceptibles de invasión por *Toxoplasma gondii* (continuación).

Tejido	Tipo celular	Cepa de <i>T. gondii</i>	Genotipo de <i>T. gondii</i>	Relación parásito:célula	Tiempo de interacción (h)	% Células infectadas	Referencia
Placenta	Trofoblastos BeWo	RH	I	5:1	3	26.0	Barbosa <i>et al</i> , 2008
Cervico-uterino	Epiteliales de adenocarcinoma (HeLa)	RH	I	5:1	3	60.0	Barbosa <i>et al</i> , 2008
					24	95.0	Sanfelice <i>et al</i> , 2017
Pulmón	Fibroblastos MRC5	RH	I	1:1	3	26.4	Brenier-Pinchart <i>et al</i> , 2006
Piel	Fibroblastos	RH	I	1:1	3	20.0	Brenier-Pinchart <i>et al</i> , 2004
		PRU	II		1	14.5	Brenier-Pinchart <i>et al</i> , 2010
		BRC TgH20002A	II		1	17.0	
		BRC TgH20017A	II		1	12.0	
		BRC TgH20018A	II		1	18.0	
BRC TgH38034A	II	1	17.5				
Sangre periférica	Linfoblastos de leucemia HL-60	RH	I	10:1	1	50.0	Youn <i>et al</i> , 1991
	Monocitos de leucemia THP-1	RH	I	1:5	48	32.6	Cuéllar <i>et al</i> , 2012
				1:20	48	14.8	
				1:50	48	8.1	
	Macrófagos no adherentes	RH	I	2:1	2	39.0	Fadull <i>et al</i> , 1995
				21.5	75.0		
Macrófagos adherentes	RH	I	4:1	2	63.0	Fadull <i>et al</i> , 1995	
				18	71.0		
Macrófagos adherentes	RH	I	2:1	2	20.0	Fadull <i>et al</i> , 1995	
					21.5		12.0

Cuadro 2. Tipos celulares humanos reportados como susceptibles de invasión por *Toxoplasma gondii* (continuación).

Tejido	Tipo celular	Cepa de <i>T. gondii</i>	Genotipo de <i>T. gondii</i>	Relación parásito:célula	Tiempo de interacción (h)	% Células infectadas	Referencia	
Sistema nervioso	Astrocitoma (Glioblastome Humain E)	RH	I	1:1	1	10.0	Pelloux <i>et al</i> , 1994	
					24	25.0		
					1	20.0		
				7:1	24	45.0		
					24	18.0		
					24	18.0		
	Astrocitos	RH	I	1:1	3	17.9	Brenier-Pinchart <i>et al</i> , 2004	
				5:1	18	?	Peterson <i>et al</i> , 1995	
		ME49	II	1:5		24	24.2	Halonen <i>et al</i> , 1996
						48	49.6	
						48	49.6	
		PRU	II	1:1	3	5.0	Estran <i>et al</i> , 2006	
		Glioblastoma (86HG39)	BK	I	1:1	3	22.0	Däubener <i>et al</i> , 1993
Glioblastoma (U373)	RH	I	1:1	3	32.0	Brenier-Pinchart <i>et al</i> , 2004		
Neuronas	ME49	II	1:5		24	10.5	Halonen <i>et al</i> , 1996	
					48	15.2		

Diversidad genética de *Toxoplasma gondii*

Originalmente se encontró que *T. gondii* se dispersó en Europa y América del Norte de manera clonal, a partir de tres linajes principales: I, II y III, siendo el tipo II el más frecuente en seres humanos y animales domésticos; también se habían descrito cepas recombinantes de las clonales y “atípicas”, provenientes de animales silvestres y de seres humanos con cuadros de enfermedad inusual (Dardé, 2004; Sibley *et al*, 2009). Este cuadro se complicó cuando se empezó el estudio de la diversidad genética en América, África y Asia. Particularmente en Brasil y Colombia surgió una gran cantidad de cepas “atípicas” y una gran variabilidad. A partir de 2012 se reportaron más de 138 genotipos distintos y actualmente se pueden encontrar más de 270 en la base de datos mundial toxodb.org sobre este parásito (Su *et al*, 2012).

Aspectos epidemiológicos de la infección por *Toxoplasma gondii*

Dadas las diversas maneras en que pueden infectarse los seres humanos de manera horizontal por *T. gondii*, la **infección adquirida** se encuentra ampliamente distribuida: la prevalencia mundial es de 30%; sin embargo, su frecuencia varía ampliamente de acuerdo con las condiciones ambientales (es más frecuente en regiones de clima cálido-húmedo) y culturales, por los factores de riesgo asociados a la transmisión, que son principalmente hábitos alimentarios y convivencia con felinos (Tenter *et al*, 2000; Petersen, 2007; Pappas *et al*, 2009; Furtado *et al*, 2011).

En México, Roch y Varela, en 1966, reportaron una seropositividad general del 30%. Posteriormente, en 1987, se reportó una seroprevalencia nacional de 32.0%, con variaciones por estado (Velasco-Castrejón *et al*, 1992). Más recientemente, reportamos un aumento de la seroprevalencia nacional a 40.0% en 2000 y a 43.9% en 2006, siendo más alta para los estados de la Costa (figura 9; Caballero-Ortega *et al*, 2012).

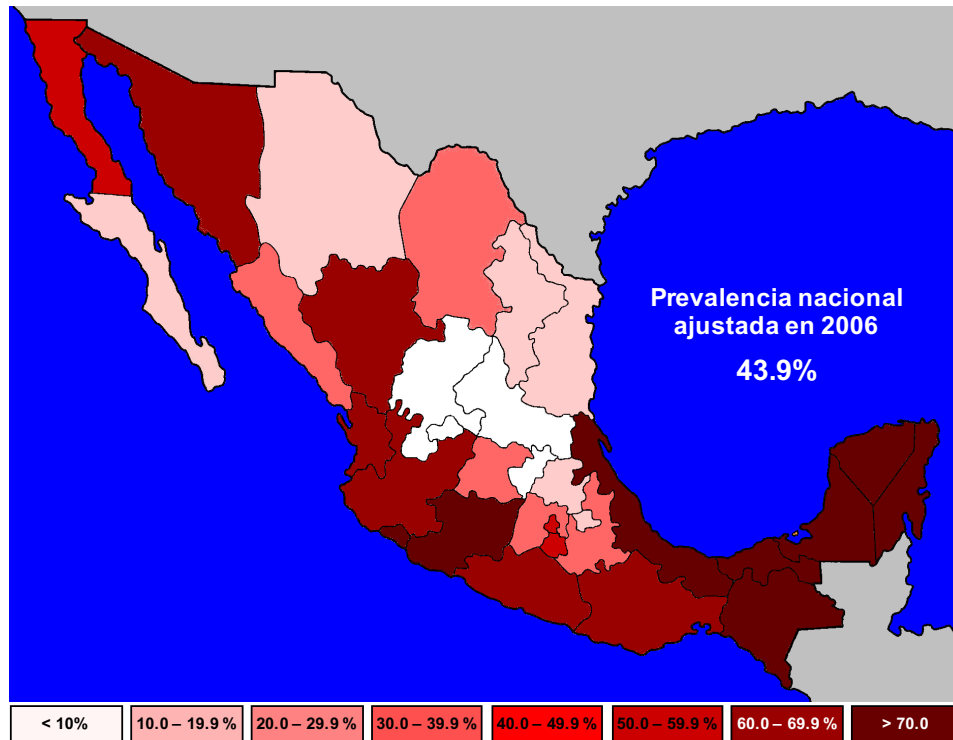


Figura 9. Prevalencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en población de México. Tomado y modificado de Caballero-Ortega et al, 2012.

En mujeres embarazadas, los valores más altos de seroprevalencia se han encontrado en América del Sur, África Central, Austria y Francia (Cook *et al*, 2000; Lopes *et al*, 2007; Villena *et al*, 2010). En México existen pocos reportes; uno de los primeros indicó 34% de positividad a *T. gondii* en 329 binomios madre/hijo (Espinosa de los Reyes, 1965). Posteriormente, en el Estado de Jalisco se encontró una seropositividad de 34.9% entre mujeres con embarazo del alto riesgo y 44.9% en mujeres con abortos recurrentes (Galván-Ramírez *et al*, 1995). En 2003, en Morelos se demostró una seroprevalencia de 84% en mujeres embarazadas (Bustos-Bahena, 2004). Algunos reportes más recientes indican seroprevalencia de ~6% para IgG en la ciudad de Durango y Aguascalientes y de hasta 20% en comunidades rurales de Durango (Alvarado-Esquivel *et al*, 2006; 2009; 2016).

La prevalencia de la **infección congénita** varía ampliamente en el mundo, por ejemplo, en Austria, Noruega, Suecia, Estados Unidos se ha reportado una tasa

menor a uno de cada 10,000 recién nacidos vivos; mientras que, en Bélgica, Brasil, Francia, Italia y Polonia es de 3 a 20 por 10,000 (Cook *et al*, 2000; Carlier *et al*, 2012). Roch y Bravo-Becherelle (1962) encontraron que 19 de cada 1000 recién nacidos de la Ciudad de México, tenían anticuerpos totales contra *T. gondii*, aunque éstos que no necesariamente indican infección congénita, pues podrían ser anticuerpos maternos. Posteriormente, Vela y colaboradores (2005) encontraron dos casos de toxoplasmosis congénita confirmados entre 1000 recién nacidos de la ciudad de México, ubicándose entre las zonas de mayor frecuencia.

Aspectos clínicos e inmunológicos de la infección por *Toxoplasma gondii*

La forma adquirida de esta parasitosis suele ser asintomática y se mantiene autolimitada en personas inmunocompetentes (Montoya y Liesenfeld, 2004; Dupont *et al*, 2012). Los pacientes con deficiencia adquirida o hereditaria de la función de linfocitos T, como aquellos con SIDA, síndrome de hiper-IgM o que reciben tratamiento inmunosupresor para el control de enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes o cáncer, son los que presentan mayor riesgo de desarrollar toxoplasmosis aguda, la cual puede ser mortal (Muñoz *et al*, 2011). Esto puso de manifiesto el papel de la respuesta inmune en el control de la parasitosis y del daño que ocasiona. Más aún, se había establecido que durante una infección primaria por *T. gondii* se inducía una respuesta inmune específica que protege de por vida contra una re-infección; sin embargo, actualmente se ha demostrado que las reinfecciones son comunes, por lo que hay debate al respecto y se desconoce si en una segunda infección se genera una nueva respuesta o si participa la respuesta de memoria (Skariah *et al*, 2010; Rougier *et al*, 2017).

En una primo-infección por *T. gondii*, la respuesta inicial de defensa es la innata, mediada por neutrófilos, macrófagos y células NK, a través de fagocitosis y citotoxicidad celular; también hay reclutamiento local de neutrófilos IL-12⁺, cuyo flujo es dependiente de los receptores para quimiocinas CXCR2 y CCR1. Las células presentadoras de antígenos (CPAs) procesan antígenos del taquizoito y lo

presentan a través de los antígenos del MHC, a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y las CPAs secretan IL-12, dirigiendo la respuesta hacia un fenotipo Th1. La activación de los macrófagos es crucial en la defensa del hospedero contra el parásito, por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e intermediarios reactivos de nitrógeno (NOS). Además, sintetizan TNF- α , el cual induce apoptosis de las células infectadas. Sin embargo, su principal función es la fagocitosis de parásitos libres. Los linfocitos T CD8⁺ tienen un papel primordial como linfocitos efectores, ya que -mediante su actividad citotóxica- son capaces de lisar células infectadas; mientras que, los linfocitos T CD4⁺ regulan la respuesta inmune en contra del parásito por la producción de citocinas. El IFN- γ , producido por NKs y linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), activa a las células efectoras incrementando la fagocitosis, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) por NKs y la citotoxicidad por linfocitos T CD8⁺. Por tanto, la IL-12, el IFN- γ y el TNF- α son citocinas clave contra la replicación de *T. gondii* (Neyer *et al*, 1997; Denkers y Gazzineli, 1998; Filisetti y Candolfi, 2004; Miller *et al*, 2009; Muñoz *et al*, 2011; Pifer y Yarovinsky, 2011). Una vez controlada la infección, el perfil Th1 debe ser regulado, mediante la producción de citocinas como la IL-10 y el TGF- β , o directamente por las células Treg (Foxp3⁺) (Tenorio *et al*, 2011; Olguín *et al*, 2015). Algunos linfocitos T CD4⁺ producen IL-2, que activa a linfocitos B y éstos se diferencian a células plasmáticas que producen anticuerpos en contra del parásito, los cuales también son muy importantes en la rama efectora. Los primeros en aparecer, 3 a 10 días después de la infección, son los de clase IgM y duran de pocas semanas hasta años (Correa *et al*, 2007b). Enseguida, se presentan los anticuerpos de clase IgA, los cuales tienen un papel protector, inhibiendo la invasión celular por el parásito, principalmente a nivel de mucosas. Se presentan todas las subclases de IgG, siendo la IgG1 predominante y la primera en aparecer; estos anticuerpos pueden proteger al hospedero de re-infecciones. La polarización de la respuesta humoral depende de las interleucinas presentes: IgG1 e IgG3 son estimuladas por IFN- γ y promueven protección, ya que son activadores de la vía clásica del complemento e inducen inflamación, se unen a macrófagos y a neutrófilos a través de receptores Fc γ opsonizando a los parásitos para su fagocitosis. Las células NKs,

activadas por IFN- γ , expresan Fc γ RIII (CD16), el cual une a estas subclases y median ADCC matando a los taquizoitos. La IgG2 se encuentra raramente en la toxoplasmosis; es inducida por IL-2 e IL-6. La IgE y la IgG4 son estimuladas por IL-4 e IL-13, relacionándose la primera con mal pronóstico en individuos con infección congénita o adquirida (figura 10; Huskinson *et al*, 1989; Wallace *et al*, 1994; Roberts *et al*, 1996; Pleass y Woof, 2001; Kasper *et al*, 2004; Correa *et al*, 2007b; Matowicka-Karna *et al*, 2009).

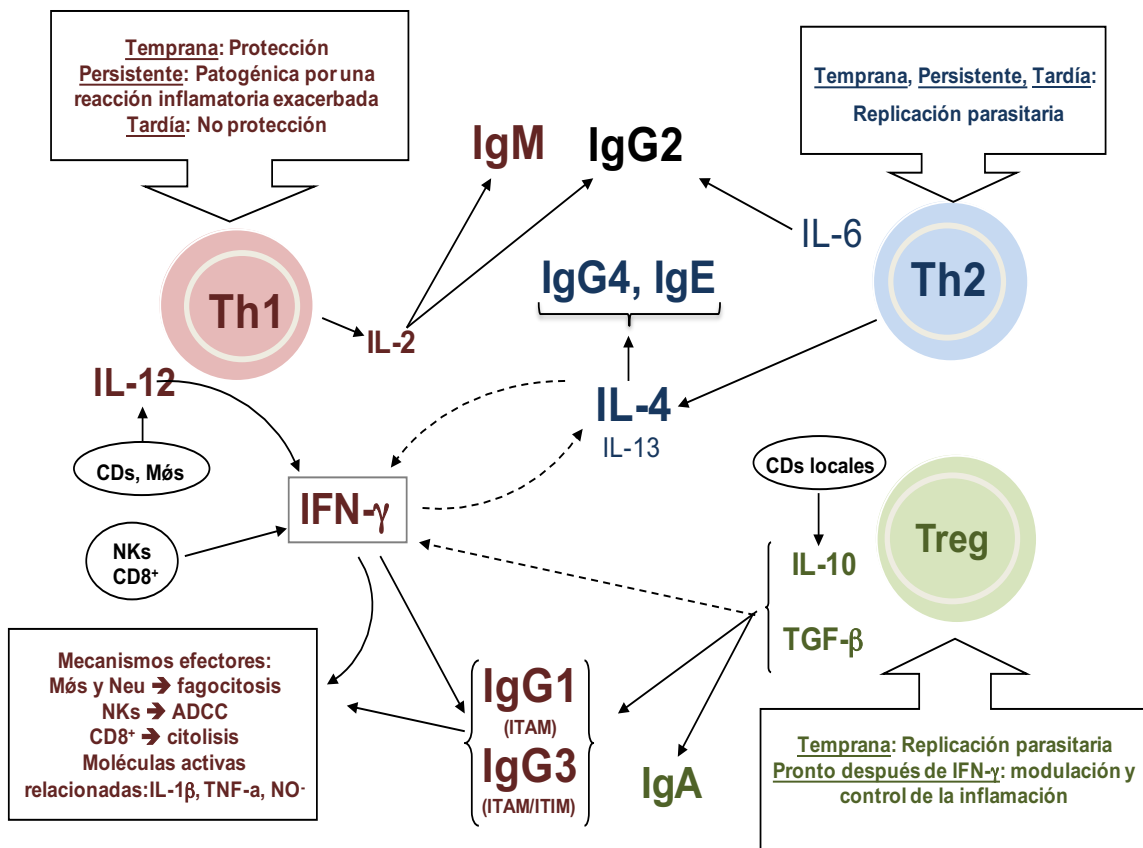


Figura 10. Diagrama de la respuesta inmune que se desarrolla en un individuo inmunocompetente durante una primo-infección por *Toxoplasma gondii*. Tomado y modificado de Correa *et al*, 2007b.

Toxoplasmosis congénita

Cuando ocurre una primo-infección por *T. gondii* durante el embarazo, existe la posibilidad de que ocurra transmisión vertical y aunque la mujer es capaz de responder inmunológicamente y limitar la replicación del parásito, no siempre evita la transmisión (McLeod *et al*, 2009; Carlier *et al*, 2012). La frecuencia de la transmisión vertical y la severidad del daño, dependen de varios factores; uno muy importante es la etapa del embarazo en la que ocurre la infección materna.

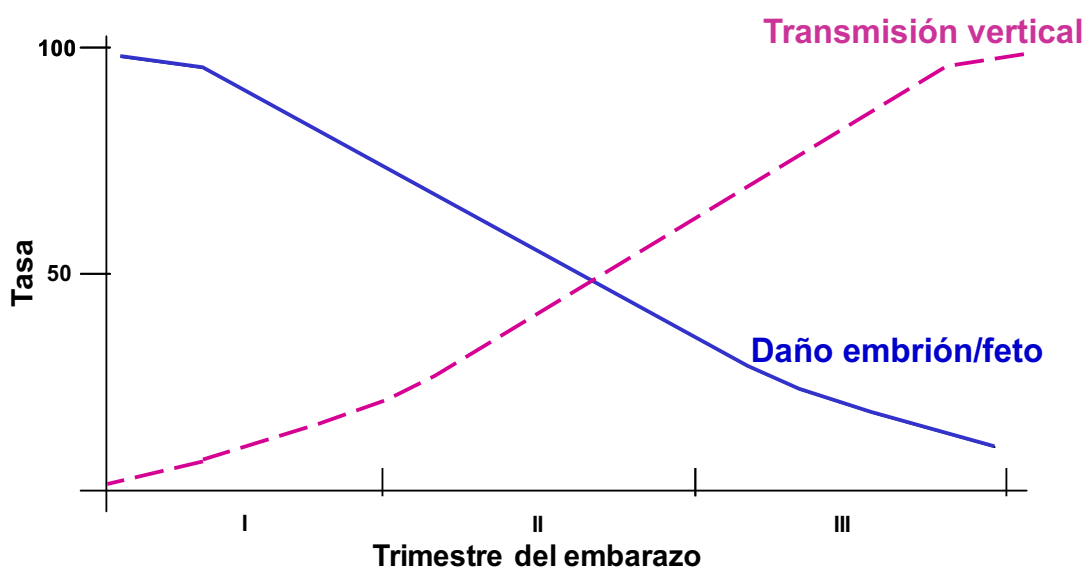


Figura 11. Gráfica del riesgo de transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* y de daño al bebé durante el embarazo en una primo-infección. Tomado y modificado de Dunn *et al*, 1999.

Como se aprecia en la figura 11, durante las primeras semanas, la tasa de transmisión es baja, aunque si ocurre, produce daños severos al embrión, incluso aborto o muerte. Si la transmisión ocurre en el segundo trimestre, el parásito puede producir daños graves como distintas malformaciones, retinocoroiditis, macro o microcefalia o hidrocefalia. Hacia el final de la gestación, la infección primaria de la madre se relaciona con una alta probabilidad de transmisión vertical (cerca del 80%); sin embargo, la proporción de niños con daño es baja y los bebés suelen nacer sin problemas clínicos, aunque, pueden desarrollar secuelas

posteriormente (Dunn *et al*, 1999; Ambroise-Thomas y Petersen, 2000; Hide *et al*, 2009; Bollani *et al*, 2013). La toxoplasmosis congénita sintomática suele ser grave, con presencia de lesiones neurológicas, oculares e incluso sistémicas, que pueden conducir a la muerte (Weiss y Dubey, 2009; Hampton, 2015).

Otros aspectos relevantes que impactan en la transmisión vertical y en el daño fetal, son la carga parasitaria y la variante de *T. gondii*; apoyando esto Romand y col. (2004) encontraron que la carga parasitaria en el líquido amniótico tiene un fuerte valor pronóstico. Por otro lado, en una revisión sistemática reciente con meta-análisis, Rico-Torres y colaboradores (2016) demostraron que la variante del parásito es relevante para la presentación del cuadro clínico, siendo las cepas tipo II las que dependen del periodo de gestación y no las tipo I, las cuales han sido reportadas como virulentas en ratones y provocan cuadros clínicos severos en todos los casos (Saeij *et al*, 2005).

***Toxoplasma gondii* y la placenta**

Los mecanismos por los cuales *T. gondii* invade la placenta y cruza de la madre al feto son poco conocidos. La interfase entre tejidos fetales y maternos más grande es la que se ubica entre la sangre materna y el sinciciotrofoblasto, por tanto, se ha propuesto que *T. gondii* invade la placenta directamente. Esto ha sido apoyado por Ferro y colaboradores (2002), quienes encontraron que en la placenta del roedor *Calomys callosus*, los parásitos fueron localizados, primero, en leucocitos maternos de la decidua uterina y después, en las células gigantes trofoblásticas (similares a los trofoblastos de las vellosidades humanas). Sin embargo, hay controversia, ya que algunos estudios indican resistencia del sinciciotrofoblasto a la invasión por *T. gondii*. Abbasi y colaboradores (2003) apoyan esta hipótesis, ya que encontraron que los trofoblastos parcialmente sincicializados fueron más resistentes a la invasión por una cepa virulenta que los trofoblastos aislados. Otro estudio, empleando explantes placentarios humanos de primer trimestre del embarazo, los cuales fueron puestos a interactuar con tres cepas de *T. gondii*, RH (tipo I), PRU (tipo II) y CTG (tipo III), se encontró que los parásitos colonizan

preferencialmente trofoblastos extravelosos y el sinciotrofoblasto en menor proporción, lo que indica resistencia de éste último a la invasión. Cuando se comparó la proporción de trofoblastos infectados, no hubo diferencia entre cepas; sin embargo, si hubo un menor grado de replicación de la cepa PRU poco virulenta, lo que podría explicar por qué las variantes más virulentas se asocian siempre a daño fetal. Dicha resistencia del sinciotrofoblasto podría ser explicada por sus propiedades físicas; por lo cual, es de gran interés determinar si esta resistencia es parcialmente debida a aspectos inmunológicos, estructurales o a ambos. Los autores demostraron que el daño sincicial, por otra infección o por daño físico, incrementa la infección parasitaria de las vellosidades, con efectos que dependen de la edad gestacional (Robbins *et al*, 2012). de Oliveira-Gomes y colaboradores (2011) reportaron la edad gestacional es otro factor que influye en la invasión de la placenta, ya que al comparar explantes placentarios de primer y tercer trimestre en contacto con la cepa virulenta RH, encontraron que el número de parásitos fue el doble en trofoblastos y en el estroma fetal de placentas del tercer trimestre. Es importante mencionar que no distinguieron entre la infección del sinciotrofoblasto y la de trofoblastos subsinciciales. Asimismo, se ha observado que los parásitos se replican en citotrofoblastos subsinciciales y en trofoblastos extravelosos; sin embargo, no se ha determinado si la infección focal resulta en la colonización del estroma de las vellosidades placentarias y, por tanto, en la diseminación parasitaria en el feto. Existen datos controversiales en cuanto al grado de replicación del parásito en células BeWo (línea de trofoblastos humanos) ya que un reporte indicó replicación parasitaria más baja, mientras que en otros estudios encontraron crecimiento similar al de otros tipos celulares (Abbasi *et al*, 2003; Oliveira *et al*, 2006; Pfaff *et al*, 2005b; Robbins *et al*, 2012). Otro mecanismo propuesto de invasión de *T. gondii* a la placenta se basa en las observaciones de que monocitos infectados se unen a trofoblastos de líneas celulares, en una forma dependiente de ICAM-1; por lo que, el parásito podría viajar a la decidua en leucocitos maternos circulantes infectados, gracias a que los trofoblastos extravelosos producen citocinas quimiotácticas; y, después de lisar a sus “caballos de Troya” invadirían a los trofoblastos. Otra alternativa de

invasión de la placenta es que leucocitos maternos infectados que llegan a las lagunas se unen directamente al sinciotrofoblasto. Esto se planteó por las observaciones de que la estimulación de explantes placentarios humanos con antígenos de *T. gondii* incrementa la adhesión de monocitos maternos al sinciotrofoblasto, aunque no se sabe si este efecto es diferente para trofoblastos extravellosos (Pfaff *et al*, 2005a; Vieira-Ferro *et al*, 2008; Castro *et al*, 2013).

Por otro lado, en la toxoplasmosis congénita existen datos paradójicos sobre el papel de la respuesta inmune. A este respecto, se sabe que en la toxoplasmosis adquirida la respuesta inmune Th1 es la que se ha asociado a protección, siendo el IFN- γ una citocina clave; sin embargo, en modelos murinos parece tener un papel dual en la toxoplasmosis congénita, ya que su presencia se asoció con transmisión vertical (Abou-Bacar *et al*, 2004a; 2004b; Pfaff *et al*, 2007; Pfaff *et al*, 2008; Senegas *et al*, 2009). En otro estudio observaron que *T. gondii* interactúa directamente con ICAM-1, una molécula que también es parte de la respuesta Th1, y cuyo incremento en su expresión en la placenta se asoció con mayor diseminación transepitelial del parásito (Barragan *et al*, 2005). Asimismo, se sabe que las vellosidades coriónicas de la placenta producen MIF, con lo que atraen macrófagos y desencadenan una respuesta contra *T. gondii*; sin embargo, el incremento en su expresión local se relacionó con mayor transmisión vertical (Vieira-Ferro *et al*, 2008).

Los receptores para Fc y las subclases de IgG, principalmente la IgG1 humana (equivalente a la IgG2a de ratón), participan en la respuesta inmune para el control de la infección por *T. gondii* en la toxoplasmosis adquirida (Erbe *et al*, 1991; Pleass y Woof, 2001; Correa *et al*, 2007b; Ortiz-Alegría *et al*, 2010). Sin embargo, en un trabajo en el que analizamos las subclases de IgG en binomios madre/hijo, se encontró que la IgG1 presente en el suero de las mamás paradójicamente se relacionó con problemas clínicos en los bebés (Cañedo-Solares *et al*, 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El paso transplacentario de *Toxoplasma gondii* origina la toxoplasmosis congénita. La frecuencia de la transmisión vertical aumenta y la severidad del daño disminuye conforme avanza el embarazo. Los cambios en los fenómenos endocrinos que ocurren durante esta etapa, el tamaño y la madurez de la placenta, así como la respuesta inmune del embrión/feto afectan la consecuencia de la infección materna. Es de esperarse que conforme el bebé se desarrolla aumente su capacidad de respuesta inmune y por ende de luchar contra el parásito, por lo que es congruente que el daño generado sea menor en etapas posteriores. Lo que es paradójico es que la frecuencia de la transmisión vertical vaya aumentando, a pesar de que la madre monta una respuesta inmunológica y que aumenta la inmunidad transferida de la madre a su hijo.

Actualmente se cuenta con datos que sugieren fenómenos sorprendentes y paradójicos con respecto a la respuesta materna y su relación con la protección fetal, pues algunas moléculas y células que protegen a la mamá durante la infección, parecen favorecer la transmisión vertical o el daño fetal, como los monocitos, el IFN- γ , el MIF, el ICAM-1 y los anticuerpos de clase IgG (Abou-Bacar *et al*, 2004a; 2004b; Barragan *et al*, 2005; Pfaff *et al*, 2005a; 2005b; 2007; 2008; Cañedo-Solares *et al*, 2008; Vieira-Ferro *et al*, 2008).

Los receptores para Fc y las subclases de IgG, principalmente la IgG1, participan en el control de la infección por *T. gondii* en los individuos inmunocompetentes. No obstante, la relación entre el paso de IgG1, mediante el FcRn y la transmisión vertical a nivel de placenta es prácticamente desconocida. Los pocos datos que existen indican que no es la esperada: en un trabajo en el que se analizaron las subclases de IgG en binomios madre/hijo, se encontró que la IgG1 presente en el suero de las mamás se relacionó con problemas clínicos en los bebés, lo que es contradictorio, ya que tiene un papel protector en la toxoplasmosis adquirida y además, es la que se transporta en mayor proporción a través de la placenta (Leach *et al*, 1996; Simister *et al*, 1996; Ghetie y Ward, 1997; Cañedo-Solares *et al*, 2008; De Souza-E-Silva *et al*, 2012; 2013). Una explicación al fenómeno, es

que los anticuerpos de esta clase faciliten la unión del parásito “opsonizado” a la superficie de las vellosidades coriónicas, por interacción entre su Fc y el FcRn. Esta unión podría tener un efecto concentrador, aumentando así la carga parasitaria en contacto con las vellosidades, e, incluso, podría facilitar el paso del parásito por medio del sistema natural utilizado para transportar la IgG de la madre al hijo. El número de VNTRs del promotor se relacionaría con el nivel de expresión del FcRn, y por ende con la carga de taquizoitos en las células de las vellosidades que lo expresan, es decir, el sinciciotrofoblasto y las células endoteliales de los vasos fetales, siendo mayor la transmisión o el daño en fetos con mayor número de VNTRs y de nivel de expresión del FcRn. En el caso de los polimorfismos del promotor del FcRn de las madres tendrían influencia en los niveles de expresión de su FcRn en células endoteliales de su microvasculatura y por tanto, en los niveles de la IgG circulante, así como de la IgG transportada al feto y por ende tendría efecto en la transmisión vertical de *T. gondii* si es que estos anticuerpos maternos específicos median la transmisión del parásito.

En resumen, se esperaría que el polimorfismo genético del promotor del FcRn de los hijos o de las madres se relacione con la transmisión vertical y por lo tanto, con daño clínico por *T. gondii*; esto se desconoce, así como la frecuencia alélica de este promotor en la población mexicana.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre el polimorfismo del promotor del FcRn con sus niveles de expresión y con la entrada de *Toxoplasma gondii* a células endoteliales, con la transmisión vertical y con la severidad de la toxoplasmosis congénita en seres humanos?

OBJETIVO GENERAL

Asociar el polimorfismo del promotor del FcRn con sus niveles de expresión, con la entrada de *Toxoplasma gondii* a células endoteliales, con la transmisión vertical y con la severidad de la toxoplasmosis congénita en seres humanos.

HIPÓTESIS

El polimorfismo del promotor del FcRn está asociado con sus niveles de expresión, con la entrada de *Toxoplasma gondii* a células endoteliales, con la transmisión vertical y con la severidad de la toxoplasmosis congénita en seres humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 12 se muestra la estrategia general del trabajo. Por un lado, se estandarizó el aislamiento y el cultivo de células endoteliales humanas de cordón umbilical -HUVEC- y el cultivo de células de microvasculatura humana -HMEC-1-. Se realizaron ensayos de invasión con ambos tipos de células endoteliales y con dos cepas de *T. gondii*: una virulenta tipo I (RH) y una no virulenta tipo II (ME49) y se determinó el tiempo y dosis del parásito necesarios para ensayos siguientes. En paralelo, se estandarizaron las condiciones de recubrimiento de los taquizoitos de ambas cepas del parásito con anticuerpos IgG1 humanos. Finalmente, se realizaron experimentos de internalización de los parásitos cubiertos por anticuerpos en ambos tipos celulares. Asimismo, en ambos tipos de células endoteliales se corroboró la expresión del RNA mensajero y de la proteína del FcRn. Por otro lado, se colectaron muestras de sangre de mujeres con infección aguda por *T. gondii* y de sus recién nacidos para determinar si hubo transmisión vertical del parásito, mediante marcadores serológicos y moleculares del parásito. Asimismo, se determinaron los polimorfismos (VNTRs) del promotor de la cadena α del FcRn en cada individuo (mamá y recién nacidos) y se buscó asociación con la transmisión vertical de *T. gondii* y con el daño en los recién nacidos infectados. Con muestras de DNA colectadas a partir de donadores sanos y de los binomios mencionados se determinó la frecuencia de los VNTRs del FcRn en esta determinada población mexicana.

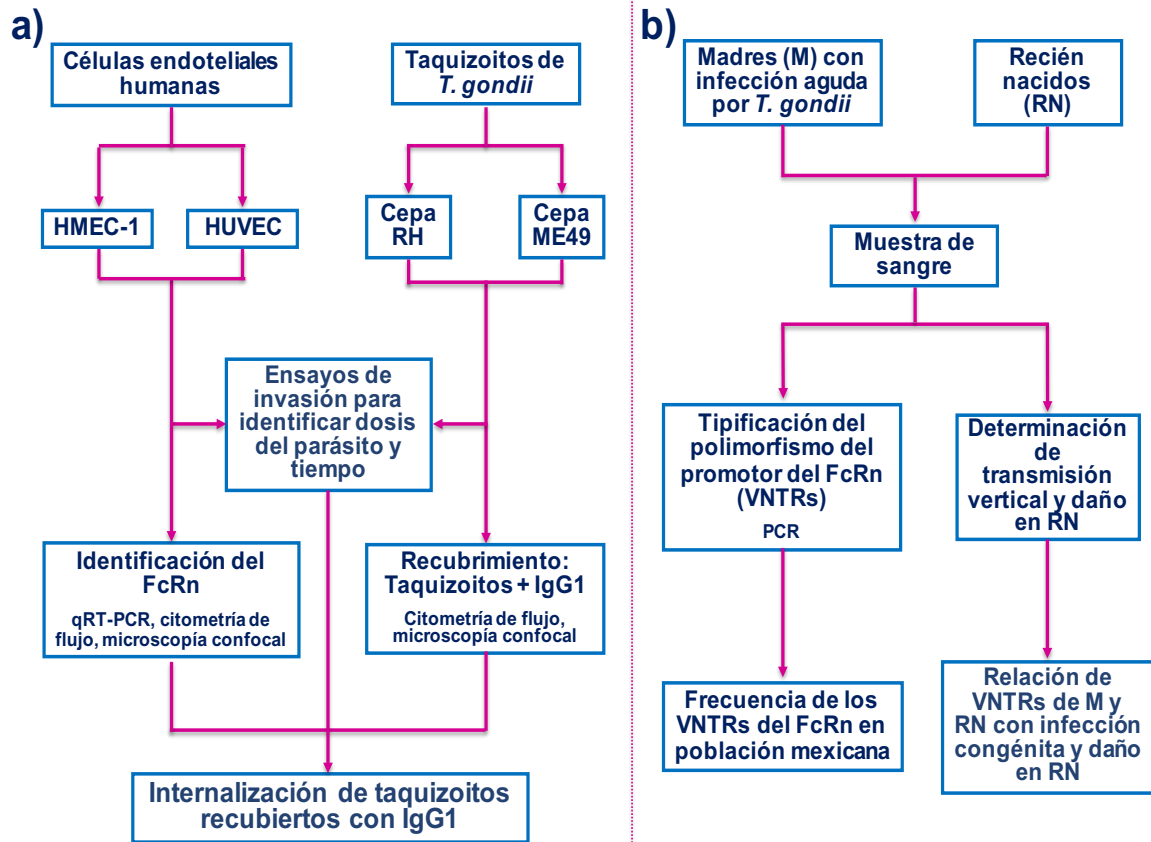


Figura 12. Diagrama de flujo que muestra la estrategia experimental del proyecto. a) Ensayos in vitro para verificar el papel del recubrimiento de taquizoitos de *T. gondii* con IgG1 humana en la invasión a células endoteliales; b) Ensayos con muestras de mujeres embarazadas con infección aguda para verificar el papel de los polimorfismos del FcRn y su asociación con la transmisión vertical de *T. gondii* y con el daño en recién nacidos infectados congénitamente.

1. Cultivos celulares

1.1. Células HMEC-1

Las HMEC-1, de sus siglas en inglés “Human Microvasculature Endothelial Cells”, corresponden a una línea de células endoteliales humanas semi-inmortales (CDC/EU. HMEC-1) capaces de crecer en un medio definido; se ha demostrado que son útiles para estudiar procesos fisiológicos y patofisiológicos del endotelio microvascular (Ades *et al*, 1992); pero no se había demostrado que expresen el FcRn de manera constitutiva, y por ende que se puedan usar para estudiar los procesos mediados por este receptor.

1.1.1. Características de las HMEC-1

Las HMEC-1 fueron aisladas de microvasculatura de piel humana, semi-inmortalizadas por transfección con el vector pSVT, que contiene secuencias codificantes para la proteína transformante SV40 T (Ades *et al*, 1992). Las HMEC-1 han sido analizadas y caracterizadas y se ha reportado que mantienen un crecimiento tipo guijarro, dependiente de unión entre células, con inhibición por contacto y crecimiento en monocapas. Se demostró que no cambian sus características de crecimiento o de morfología y no presentan signos de senescencia después de 95 pases y durante 500 días. Se les realizó análisis cariotípico y no se detectaron alteraciones cromosómicas (Ades *et al*, 1992; Bouiis *et al*, 2001; Unger *et al*, 2002). Estas células sembradas sobre matrigel tienen la capacidad de diferenciarse, formar estructuras tubulares y desarrollar redes, lo que se denomina como reacción angiogénica (Unger *et al*, 2002).

Existe una lista de moléculas específicas de células endoteliales, que expresan las HMEC-1 y que han sido bien estudiadas. Una de las principales es el factor von Willebrand (vWF). También expresan moléculas como ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta a TNF- α o IL-1 α , en un modo dependiente de concentración. Las HMEC-1 no expresan constitutivamente moléculas MHC-II; pero, sí después de la

estimulación con IFN- γ (Xu *et al*, 1994; Lidington *et al*, 1999; Bouïs *et al*, 2001; Unger *et al*, 2002). Otra característica bien conocida es que las HMEC-1 se unen a la lectina *Ulex europaeus* (marcador de endotelio vascular), similar a como lo hacen las células endoteliales de microvasculatura dérmica de cultivos primarios (HDMEC). Asimismo, son capaces de adquirir lipoproteínas acetiladas de baja densidad (LDL), la cual es una prueba para detección de células endoteliales vivas (Ades *et al*, 1992; Unger *et al*, 2002).

1.1.2. Cultivo de las HMEC-1

Las HMEC-1 se mantuvieron en medio MCDB131 (Invitrogen, NE, EUA), suplementado con 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hidrocortisona, una mezcla de penicilina G (100 UI/mL), estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anfotericina B (0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Gibco, NE, EUA), 10% suero fetal bovino (SFB) (Hyclone Logan, UT, EUA), 10 mM L-glutamina y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ factor de crecimiento endotelial bovino (Roche, IN, EUA). Las células se incubaron a 37° C y con 7% de CO₂ hasta confluencia. Las células fueron despegadas de las cajas de cultivo agregando 0.25% Tripsina-EDTA (Gibco, NE, EUA) durante 2-3 minutos y a 37° C. La acción de la Tripsina se detuvo por adición de medio de cultivo complementado con 5% SFB y centrifugación (1200 rpm, siete minutos). Para este estudio se usaron células con un máximo de cuatro pases. La última resiembra de las HMEC-1 se llevó a cabo en cajas de cultivo de 24 pozos, las cuales contenían cubreobjetos redondos y cargados (Thermanox Nunc, NY, EUA), se sembraron 100,000 células por pozo; contabilizadas con cámara de Neubauer y con azul tripano (Sigma, MO, EUA) para determinar su viabilidad. Estos cultivos se mantuvieron por 72 horas, tiempo en el que se conseguía una confluencia celular mayor al 90%.

1.2. Células HUVEC

Las HUVEC, de sus siglas en inglés “Human Umbilical Vein Endothelial Cells”, corresponden a células endoteliales obtenidas a partir de la digestión de la vena de cordones umbilicales humanos. Las HUVEC han sido usadas ampliamente

como un modelo que ha permitido analizar la biología y los procesos patológicos de las células endoteliales. Las ventajas principales de usar estas células son: la facilidad de conseguir cordones umbilicales, las células se aíslan mediante un método relativamente simple, se obtiene una gran cantidad y con pureza alta (Larrivé y Karsan, 2005; Baudin *et al*, 2007).

1.2.1. Características de las HUVEC

Las HUVEC exhiben las propiedades generales de células endoteliales humanas; sin embargo, no representan a todos los subtipos (Larrivé y Karsan, 2005; Baudin *et al*, 2007). Las HUVEC forman monocapas y presentan respuesta angiogénica muy rápida, dentro de las primeras cuatro horas después de sembradas, pues migran de la monocapa celular para formar estructuras tipo redes y tipo capilares (Unger *et al*, 2002). Varias de las moléculas expresadas por las HMEC-1 también son expresadas por las HUVEC.

1.2.2. Aislamiento y cultivo de las HUVEC

Para la obtención de HUVEC se colectaron muestras de cordones umbilicales de bebés con más de 36 semanas de gestación y clínicamente sanos. Las mamás no presentaron complicaciones en embarazos previos, ni en el presente y no tenían infecciones y provenían del Hospital Infantil Inguarán. Las muestras de cordón se colocaron en medio M199 de transporte, el cual contenía 5% SFB y mezcla de antibióticos-antimicótico, y se llevaron al Laboratorio de Inmunología Experimental (INP) para su manejo inmediato. El aislamiento de las HUVEC se realizó dentro de una campana de flujo laminar con el procedimiento descrito por Jaffe y colaboradores (1973). Brevemente, el cordón se limpió externamente con alcohol etílico al 70%; se se fijaron conectores de acero inoxidable con la ayuda de hilo de sutura en ambos extremos de la vena umbilical, la cual se lavó con HEPES, pH 7.2 (Sigma, MO, EUA) para eliminar los restos de sangre. A continuación, se agregó a la vena el volumen suficiente para llenarla de colagenasa tipo II (Sigma, MO, EUA), al 0.02%, durante 30 min y se incubó a 37° C. La acción de la

colagenasa se detuvo con la misma cantidad de medio de transporte y se colectó la suspensión celular, la cual se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos. Las HUVEC obtenidas se resuspendieron en medio M199 (Invitrogen, NE, EUA) suplementado con 20% SFB, 10 mM L-glutamina, 40 µg/mL factor de crecimiento endotelial bovino y la mezcla de antibióticos-antimicótico, compuesta por penicilina G (100 UI/mL), estreptomina (100 µg/mL) y anfotericina B (0.025 µg/mL). Las células se sembraron en cajas de cultivo de 25 cm² y se cultivaron a 37° C con 7% CO₂ hasta confluencia. Las cajas con una confluencia mayor al 95%, se lavaron con 3 mL de HEPES, y se adicionaron 3 mL de 0.05% Tripsina-EDTA durante 2-3 minutos, a 37° C, deteniendo su acción agregando medio de transporte. Posteriormente, las HUVEC se resuspendieron en M199 suplementado y se sembraron en cajas nuevas. Las HUVEC tuvieron tres pases, con la finalidad de obtener un mayor número de células y una pureza superior al 99% (Jaffe *et al*, 1973; Larrivé y Karsan, 2005; Baudin *et al*, 2007; Cheung, 2007). La tercera re-siembra se llevó a cabo en cajas de cultivo de 24 pozos, las cuales contenían cubreobjetos redondos y cargados, se sembraron 100,000 células por pozo; contabilizadas con cámara de Neubauer y azul tripano. Estos cultivos se mantuvieron durante 72 horas, tiempo en el que se conseguía una confluencia celular mayor al 90%.

2. Obtención de taquizoitos de la cepa RH y cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*

Los taquizoitos de la cepa RH y de la cepa ME49 de *T. gondii* fueron mantenidos por pases en peritoneo de ratones BALB/c y C57BL6 RAG2^{-/-}, respectivamente (Blaker, 1961; Khan y Grigg, 2017). El procedimiento de rutina fue el siguiente: los ratones de ambas cepas se infectaron vía intraperitoneal con una dosis de 3×10⁶ taquizoitos, contenidos en 500 µL de PBS estéril, pH 7.2, cuantificados en cámara de Neubauer, determinando la viabilidad con azul Tripano al 0.04%. Cuatro días después de la infección se llevó a cabo el lavado peritoneal de los ratones con

tres mL de PBS y se colectaron aproximadamente 250×10^6 de taquizoitos de la cepa RH y 10×10^6 de la cepa ME49. Con el fin de purificar y propagar ambas cepas, los parásitos colectados se inocularon 20×10^6 de la cepa RH y 10×10^6 de la cepa ME49 en cultivos confluentes de células Vero, en botellas de cultivo de 25 cm² y se mantuvieron a 37° C en una atmósfera de 7% de CO₂, durante 72 horas (Saadatnia *et al*, 2010). Transcurrido este tiempo, se cosecharon aproximadamente, 100×10^6 de taquizoitos de la cepa RH y 44×10^6 de la cepa ME49, los cuales se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en la cantidad necesaria de medio de invasión, el cual corresponde a medio de cultivo MCDB-131 o a medio M199 con 5% SFB.

3. Ensayos de invasión de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH y ME49 en HUVEC y HMEC-1

Para llevar a cabo la interacción entre los taquizoitos de *T. gondii* y las HUVEC o las HMEC-1, se emplearon las células sembradas en placas de 24 pozos con cubreobjetos redondos, que se incubaron durante 72 h, a 37° C y 7% de CO₂. Se despegaron las células de tres pozos para cuantificar y obtener el promedio por pozo y con ello, calcular el número de parásitos necesario. Cada ensayo se realizó por triplicado. De cada pozo se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 400 µL de medio de invasión que contenían la cantidad necesaria de taquizoitos de *T. gondii* para la relación parásito:célula requerida. Posteriormente, las placas se agitaron, para distribuir homogéneamente a los parásitos, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de que bajaran y tuvieran interacción con la monocapa celular. Finalmente, las placas se colocaron en una incubadora a 37° C, con una atmósfera de 7% de CO₂, durante el tiempo elegido. Una vez que transcurrió el tiempo de interacción, los parásitos no adheridos fueron removidos con el sobrenadante y las células endoteliales fueron lavadas dos veces con 300 µL de Hepes (Sigma, MO, EUA) a 37° C. Todo el

sobrenadante se eliminó y la invasión se detuvo por fijación al aire de los cubreobjetos, los cuales se colocaron sobre portaobjetos. Las células fijadas se tiñeron con colorante de Wright (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) por procedimiento estándar. Se determinó la viabilidad y la cantidad de parásitos extracelulares remanentes en los sobrenadantes (Morisaki *et al*, 1995; Kafsack *et al*, 2007).

3.1. Estandarización de los ensayos de invasión de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH y ME49 en HUVEC y HMEC-1

Se realizaron ensayos de invasión con taquizoitos de ambas cepas de *T. gondii* - RH y ME49- en células HMEC-1 y HUVEC en los que se probaron distintas condiciones: confluencia del cultivo celular, presencia de antibióticos-antimicótico, relación parásito:célula, tiempo de interacción y se eligieron aquellas que permitieron obtener un porcentaje de células endoteliales invadidas de alrededor del 50%, lo que permitiría detectar cambios en ensayos siguientes, en los que se emplearían taquizoitos expuestos a distintas condiciones.

3.2. Cuantificación de células endoteliales humanas invadidas por taquizoitos de *Toxoplasma gondii* y teñidas con Wright

Las laminillas de cada experimento se examinaron bajo el microscopio óptico Axiostar Plus (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). Con las condiciones elegidas en la estandarización, se realizaron tres experimentos por triplicado, con cada tipo de células endoteliales y con ambas cepas de *T. gondii*. De cada pozo se analizaron al menos 100 células por laminilla, con un método estandarizado, se cuantificó el número de células invadidas y se expresó como porcentaje. Las células invadidas se consideraron como aquellas con la presencia de al menos un parásito dentro una vacuola parasitófora, bien definida en el citoplasma. Se muestran algunos ejemplos en la figura 13. Asimismo, se cuantificó el número de vacuolas por cada

célula infectada, considerando el número de células infectadas como el 100%. Además, se calculó el número total de taquizoitos por cada 100 células, tomando en cuenta el número total de vacuolas en las 100 células analizadas, a lo que se denominó como “carga parasitaria” (Benedetto *et al*, 1997; Abbasi *et al*, 2003; Contreras-Ochoa, 2012). Se compararon los porcentajes obtenidos en cada tiempo de interacción, entre tipos celulares, entre cepas del parásito y entre condiciones del cultivo y de los parásitos. Las diferencias a lo largo del tiempo (en el caso de los experimentos de cinéticas) y entre grupos se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis, seguida, cuando correspondía, de la prueba U de Mann-Whitney, empleando el programa SPSS V18.0. Se consideró $p < 0.05$ como significativa.

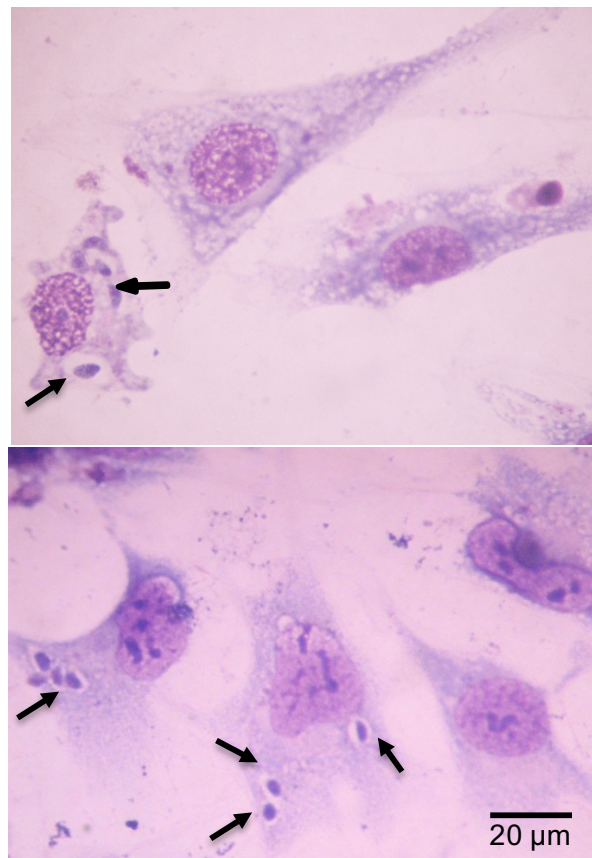


Figura 13. Microfotografías de microscopía de luz de células HUVEC (arriba) y HMEC-1 (abajo) con taquizoitos intracelulares de la cepa RH de *T. gondii* y teñidas con colorante de Wright; las flechas indican taquizoitos dentro de una vacuola.

3.3. Determinación de infección de células endoteliales por taquizoitos de *Toxoplasma gondii* mediante citometría de flujo y microscopía confocal

Debido a que la cuantificación de células endoteliales infectadas por *T. gondii* mediante microscopía óptica es laborioso y tardado se buscó un método alternativo. Se emplearon taquizoitos de las dos cepas de *T. gondii* teñidos en color verde con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE [CellTrace™, Thermo Fisher, CA, EUA]). El primer paso consistió en confirmar que esta molécula tiñe a los taquizoitos de ambas cepas de *T. gondii*, tanto por citometría de flujo como por microscopía confocal (Gonçalves *et al*, 2005; Mota *et al*, 2014). Como se observa en la figura 14, ambas cepas de *T. gondii* se marcan con la CFSE y de manera homogénea en todo el citoplasma.

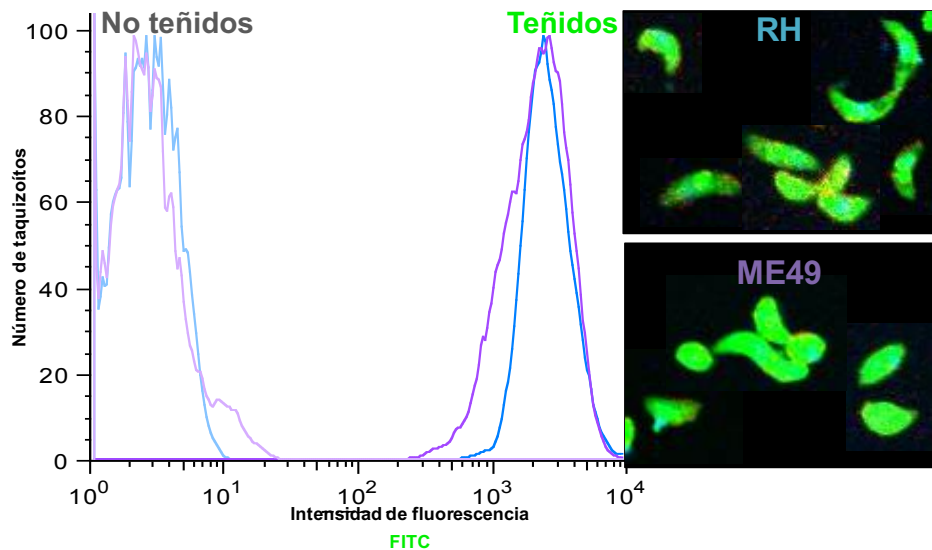


Figura 14. Gráficas de la tinción con CFSE de taquizoitos de dos cepas de *T. gondii*, RH (azul) y ME49 (morado). Las gráficas de la izquierda corresponden a la fluorescencia basal de los parásitos y las de la derecha corresponden a la fluorescencia de los taquizoitos teñidos. La tinción se corroboró por microscopía confocal; los parásitos se observan con marca verde en todo el citoplasma. Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul.

Se realizaron tres ensayos de invasión, por triplicado, con células HMEC-1 y con muestras de HUVEC de individuos diferentes, empleando taquizoitos de ambas

cepas del parásito teñidos con CFSE. Una vez pasado el tiempo de invasión, las células se tripsinizaron, se fijaron con paraformaldehído al 0.5%, se marcaron con el anticuerpo anti-CD105 (como se mencionó anteriormente) y se analizaron por citometría de flujo. Para identificar células positivas a cada marcador se llevaron a cabo lecturas de células no marcadas e infectadas con parásitos no teñidos. Asimismo, se emplearon controles FMO (fluorescence minus one), que correspondían a células con contacto con anticuerpos individuales. Los puntos de corte se determinaron con base en la intensidad de fluorescencia verde de células no infectadas y de aquellas infectadas con parásitos no teñidos. Se calculó el porcentaje de células infectadas tomando en cuenta a las células infectadas como aquellas dobles positivas a CD105 y a CFSE (fluorescencia naranja y verde, respectivamente) y como el 100% de células a todas las marcadas con el anti-CD105. Para las imágenes de microscopía confocal, en las muestras con ambos anticuerpos, se realizaron lecturas individuales y dobles, tanto para células no infectadas e infectadas. Se realizaron análisis de las células con cada marcador individual (APC y FITC), con el láser correspondiente (además del DAPI), con la finalidad de corroborar la positividad de cada uno; en seguida, se llevó a cabo la lectura con los dos láseres para identificar sobreposición y probable co-localización de ambos marcadores.

4. Recubrimiento de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii* con anticuerpos IgG1 humanos específicos

Para analizar el efecto del recubrimiento de los taquizoitos de *T. gondii* con anticuerpos de clase IgG, específicamente de la subclase IgG1, sobre la invasión de células endoteliales humanas, se preparó una mezcla de sueros humanos, obtenidos de un banco del Laboratorio de Inmunología Experimental, que son positivos únicamente a IgG1 anti-*T. gondii* y negativos a las otras subclases de IgG, a IgM, a IgA y a IgE específicas, lo cual fue evaluado mediante ELISA y western blot, técnicas de rutina, reportadas y validadas para el diagnóstico serológico de infección por *T. gondii* (Ortiz-Alegría, 2004; Cañedo-Solares *et al*,

2009; Caballero-Ortega *et al*, 2014). Se emplearon las dos cepas de *T. gondii*: RH y ME49 para el recubrimiento con IgG1 humana específica. Se probaron varias diluciones, en PBS pH 7.2, de la mezcla de sueros, desde 1:100 hasta 1:25,600, empleando como control negativo del recubrimiento a una mezcla de sueros humanos negativos a todas las clases y subclases de anticuerpos específicos. Para identificar la unión de IgG1 a los parásitos se empleó un anticuerpo secundario anti-IgG humana, producido en ratón y marcado con el fluorocromo PE-Cy5 (BD Pharmingen, CA, EUA). Las inmunodetecciones se realizaron a 4° C, en agitación constante, en oscuridad y durante 30 minutos. Se hizo el recubrimiento de los parásitos no marcados y marcados con CFSE y el análisis se hizo mediante citometría de flujo y microscopía confocal.

5. Ensayos de invasión de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii* recubiertos con anticuerpos IgG1 humanos específicos en células HMEC-1

Se realizaron ensayos de invasión de células HMEC-1 con ambas cepas de *T. gondii* en tres condiciones: parásitos sin tratamiento (en PBS), parásitos en contacto con suero negativo a *T. gondii* y parásitos recubiertos con IgG1 humana específica. Los ensayos se realizaron por triplicado de cada condición con la relación parásito:célula 10:1 y dos horas de interacción, como se había establecido previamente. La cuantificación se realizó analizando a las células teñidas con colorante de Wright y bajo el microscopio óptico (como se mencionó anteriormente). Se compararon los porcentajes de células invadidas, de vacuolas parasitóforas y de parásitos totales en 100 células (carga parasitaria) entre los grupos de células infectadas con taquizoitos en las diferentes condiciones.

6. Expresión del FcRn

6.1. Expresión mRNA del FcRn

Los niveles de mRNA de la cadena α del FcRn (*FCGRT*) se determinaron mediante RT-PCR semi-cuantitativa de células de cultivos confluentes de HMEC-1 y de HUVEC del tercer pase. Como controles positivos de expresión del FcRn se emplearon muestras de tejido de vellosidades de placentas humanas con más de 36 semanas de gestación y de bebés clínicamente sanos, en las cuales se encuentran las células endoteliales de los vasos fetales y el sincitiotrofoblasto, que expresan constitutivamente el FcRn (Simister *et al*, 1996; Antohe *et al*, 2001). Se colectaron muestras pareadas de vellosidades placentarias y de HUVEC de tres individuos y se analizó la correlación de los niveles de expresión entre muestras del mismo individuo.

El RNA total se obtuvo con el método de TRIzol® (Life Technologies, NE, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y bajo condiciones libres de RNasas. Brevemente, se agregaron 0.5 mL de Trizol por cada 1×10^6 células endoteliales y 1.0 mL por cada 100 mg de tejido de las vellosidades placentarias. Se adicionaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol empleado. Los tubos se agitaron vigorosamente, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm, por 15 minutos, a 4° C. Se separó la fase acuosa y se agregaron 0.5 mL de isopropanol (Sigma, MO, EUA) por cada mL de Trizol, se centrifugaron a 12000 rpm durante un minuto. El RNA precipitado se lavó con 75% etanol y se dejó secar 15 minutos a temperatura ambiente. La integridad y la concentración del RNA se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Invitrogen, CA, EUA) y lectura de absorbancia en el espectofotómetro NanoDrop ND-1000 a 230, 260 y 280 nm (NanoDrop Technologies, DE, EUA).

El cDNA se obtuvo con el estuche comercial Taqman® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, NE, EUA). Para una reacción se emplearon 0.4 g de RNA total de la muestra, 1.75 mM de $MgCl_2$, 0.5 mM de cada dNTP, 1.0 U de inhibidor de Rnasa, 1.0 U de Transcriptasa reversa, 2.5 μ M de oligo d(T) en 1x del amortiguador RT. Como control negativo se empleó agua en lugar de RNA. La

reacción de amplificación del cDNA se llevó a cabo en un termociclador Veriti de 96 pozos (Applied Biosystems, CA, EUA) bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo
65° C	5 minutos
4° C	2 minutos
37° C	30 minutos
95° C	5 minutos
4° C	Indefinido

Para cuantificar los niveles de mRNA del *FCGRT* mediante RT-PCR en tiempo real, se seleccionó un estuche comercial (ID: Hs01108967_m1, FAM-MGB), de Applied Biosystems, que contiene un par de oligonucleótidos y una sonda marcada con el fluorocromo FAM, que amplifican un fragmento de 107 pb, comprendido entre los exones 3 y 4 del *FCGRT*. Como control positivo de la PCR se utilizó un juego de oligonucleótidos con una sonda marcada con el fluorocromo VIC (RefSeq: NM_004048.2, VIC-MGB) para detección del gen de la β 2-microglobulina humana (*B2M*), cuyo fragmento amplificado es de 71 pb.

6.1.2. Análisis de resultados y pruebas estadísticas

Los resultados correspondían a unidades de fluorescencia de cada gen analizado, los cuales se graficaron como diagramas de cajas, lo que permitió analizar la variabilidad entre individuos. Los cambios en la expresión relativa del *FCGRT* se calcularon mediante el índice de expresión *FCGRT/B2M* y también se graficaron. Se compararon los promedios de las unidades de fluorescencia del *FCGRT* y de la *B2M* y se calcularon las diferencias entre tipo de muestras, usando la prueba U de Mann-Whitney, considerando $p < 0.05$ como significativa estadísticamente.

6.2. Identificación del FcRn a nivel de proteína

Para la identificación de la proteína de la cadena α del FcRn humano se empleó la citometría de flujo y la microscopía confocal. Para la detección por citometría de flujo, las células endoteliales se colocaron en suspensión en solución amortiguadora de NaCl 0.15 M-fosfato de sodio 10 mM, pH 7.4 (PBS), después

del tratamiento con Tripsina descrito anteriormente. Para la detección por microscopía confocal se emplearon células endoteliales sembradas en placas de 24 pozos con cubreobjetos redondos y la inmunodetección se realizó directamente en la monocapa celular. Como marcador específico de células endoteliales humanas se buscó al CD105 (endoglina) (Duff *et al*, 2003; Gregory *et al*, 2014), empleando un anticuerpo monoclonal, producido en ratón, marcado con alofococianina -APC- (BioLegend, CA, EUA) el cual se probó, según las recomendaciones del fabricante, a dos concentraciones: 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Para la inmunodetección de la cadena α del FcRn humano se utilizó un anticuerpo IgG policlonal comercial, producido en conejo (Sigma, MO, EUA) diluido 1:100 y 1:200, y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, producido en cabra y marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Invitrogen, CA, EUA). Como control negativo de la inmunodetección se empleó un suero de conejo no inmune a la dilución equivalente. Todas las inmunodetecciones se realizaron colocando los anticuerpos disueltos en PBS. De cada dilución se agregaron 100 μL por cada 1×10^6 células tripsinizadas (para citometría de flujo) y 150 μL en cada pozo con células en monocapa (para microscopía confocal). Las reacciones se llevaron a cabo durante 30 minutos, a 4° C, en oscuridad y en agitación. Transcurrido el tiempo, se realizó un lavado con 1.0 mL de PBS y en el caso de las muestras para citometría de flujo, centrifugando a 1200 rpm durante 7 minutos.

Para evaluar la localización intracelular del FcRn en las células endoteliales, estas fueron permeabilizadas, usando el juego comercial de soluciones amortiguadoras FOXP3 fix/perm (BioLegend, CA, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El primer paso consistió en la tinción superficial del CD105. Posteriormente, las células se incubaron durante 20 minutos con la solución FOXP3 Fix/Perm. Se realizó un lavado con PBS y otro con el amortiguador FOXP3 Perm. El botón celular se resuspendió en la última solución, se incubó durante 15 minutos y se centrifugó. A continuación, las células se pusieron en contacto con el anticuerpo anti-FcRn diluido en el amortiguador FOXP3 Perm, durante 30 minutos, se lavaron dos veces, se agregó el anticuerpo secundario

diluido en PBS y se incubaron por 30 minutos. Todos los pasos se realizaron en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación.

La citometría de flujo se realizó con un citómetro FACSAria I (BD Pharmingen, CA, EUA) y el programa FlowJo 8.3 (FlowJo LLC, OR, EUA). Las imágenes fueron capturadas utilizando un microscopio de escaneo láser confocal Olympus FluoView™ FV1000 (Olympus America Inc., NY, EUA), equipado con láseres que pueden excitar a las siguientes longitudes de onda: 405, 473, 559 y 635 nm. Para identificar células positivas a cada marcador se realizaron lecturas de células no marcadas y se emplearon controles FMO (fluorescence minus one), que correspondían a células en contacto con anticuerpos individuales. Asimismo, en las muestras con ambos anticuerpos, se realizaron lecturas individuales y dobles, tanto para células no permeabilizadas y permeabilizadas.

Los análisis de microscopía confocal se realizaron para cada marcador individual (APC, FITC y DAPI) con el láser correspondiente, con la finalidad de corroborar la positividad de cada uno; en seguida, se llevó a cabo la lectura con los dos láseres para identificar sobreposición y probable co-localización de ambas marcas. Las imágenes fueron capturadas usando el objetivo de inmersión en aceite 60 NA y fueron procesadas usando el software FV10-ASW 1.7 Viewer. Los ajustes del microscopio fueron iguales para todos los experimentos y se evitó la saturación de las señales. Las imágenes a comparar se contrastaron de la misma forma.

7. Identificación de los polimorfismos (VNTR) del promotor de la cadena α del FcRn humano

Con el fin de determinar la frecuencia de los polimorfismos (VNTRs) del promotor del FcRn en población de México, se colectaron 87 muestras de sangre total de donadores adultos sanos. Para la extracción del DNA se empleó el estuche comercial Gentra Puregene® (Invitrogen, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo de 15 mL se colocaron nueve mL de

solución de lisis de glóbulos rojos y se agregaron tres mL de sangre completa, se mezcló por inversión, se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 x g por dos minutos. Al precipitado se le agregaron tres mL de solución de lisis celular, se agitó y se centrifugó. A continuación, se adicionó un mL de solución de precipitación de proteínas, se agitó en vórtex vigorosamente y se centrifugó cinco minutos a 2000 x g. En un tubo limpio se colocaron tres mL de isopropanol (Sigma, MO, EUA) y se agregó el sobrenadante del paso anterior. Se mezcló por inversión hasta que se observaron las hebras de DNA. El tubo se centrifugó tres minutos a 2000 x g; se agregaron al precipitado tres mL de etanol (Sigma, MO, EUA) al 70% y nuevamente se centrifugó. Al botón se le agregaron 300 µL de solución de hidratación de DNA y se agitó en vórtex hasta su disolución. Se incubó a 65° C durante una hora y después, toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se evaluó la integridad, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y lectura en el espectofotómetro NanoDrop ND-1000 y se determinó la concentración del DNA.

La identificación de los polimorfismos (VNTR1-5) del promotor del FcRn humano se hizo mediante PCR, la cual se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Sachs y colaboradores (2006), empleando los siguientes oligonucleótidos:

5'-TCTCGACACTGGGTCTGA-3'

5'-CTGCTCTTTCTCTCCCT-3'

que amplifican una región de entre 554 y 702 pb, dependiente de los VNTRs que presente el individuo en cada alelo.

Para la PCR se emplearon 10x amortiguador para PCR, 25 mM de MgCl₂ y 1.0 U TaqPolimerasa Gold (Applied Biosystems, CA, EUA), además de una mezcla de 10 µM de cada dNTP (Fermentas, MA, EUA) y 20 µM de cada oligonucleótido (sentido y anti-sentido), en un volumen total de 50 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, CA, EUA), bajo las siguientes condiciones: una primera fase de 95° C por 10 minutos, seguida de 36 ciclos de 95° C por 30 segundos, 57° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto y la última fase de 72° C por 10 minutos. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.6%, en amortiguador 1x

TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA) y tinción con bromuro de etidio al 0.05% (Sigma, MO, EUA). Las fotografías de los geles de agarosa se capturaron en un sistema de adquisición de imágenes MultiDoc-It™ (Upland, CA, EUA).

8. Asociación de los polimorfismos (VNTRs) del promotor de la cadena α del FcRn humano con transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* y con daño en recién nacidos infectados congénitamente

Como parte de un proyecto de investigación más grande, en el que se analiza la relación genotipo/fenotipo de algunas moléculas de la respuesta inmune asociadas con transmisión vertical de *T. gondii* y con daño en recién nacidos infectados congénitamente, se colectaron muestras de sangre total de nueve binomios de mujeres embarazadas con infección aguda y de sus hijos al nacimiento. Mediante técnicas estandarizadas, que se llevan a cabo de rutina en el Laboratorio de Inmunología Experimental (Ortiz-Alegría, 2004; Cañedo-Solares *et al*, 2009) se confirmó el diagnóstico de fase aguda de la infección en las mujeres y de transmisión vertical de *T. gondii*. Los marcadores que se buscaron fueron los siguientes: IgM, IgA, IgG, subclases de IgG y avidéz de IgG anti-*T. gondii* (ELISA y western blot) y por técnicas de biología molecular: presencia de DNA del parásito en sangre y carga parasitaria por PCR en tiempo real, así como el genotipo del parásito, por PCR-RFLP. Asimismo, en los recién nacidos, por evaluación médica, se determinó el perfil clínico que presentaban, el cual se clasificó con base en a) su localización: infecciones neurológicas, neurooftálmicas y diseminada y b) severidad: sin problemas clínicos, moderada y severa (artículo enviado a publicación).

RESULTADOS

1. Ensayos de invasión de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en células endoteliales humanas

1.1. Estandarización de los ensayos de invasión de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH y ME49 en células HUVEC y HMEC-1

Se analizaron algunos factores que podrían influir en la invasión del parásito a las células endoteliales. Uno de ellos era la dosis parasitaria, y como puede observarse en el cuadro 2, la dosis que permitió obtener una mayor proporción de células invadidas fue 10:1, con ambos tipos celulares y con ambas cepas del parásito, por lo cual en los ensayos siguientes se empleó esta relación.

Cuadro 3. Ensayos de invasión de taquizoitos de *T. gondii* en células endoteliales humanas con diferentes relaciones parásito:célula y diferentes tiempos analizados.

Tipo celular	Cepa del parásito	Relación parásito:célula	Tiempo (min)	% invasión	Número máximo de vacuolas/célula
HUVEC	RH	1:1	60	0.0	0
HUVEC	RH	2:1	120	2.8	1
HUVEC	RH	4:1	120	4.0	1
HUVEC	RH	10:1	120	14.6	11
HUVEC	ME49	10:1	120	32.1	24
HMEC-1	RH	10:1	120	33.0	9
HMEC-1	ME49	10:1	120	49.7	23

Otro factor que se analizó fue la confluencia del cultivo, la cual, al realizar ensayos comparativos, se encontró que no hay diferencia entre los cultivos no confluentes (confluencia $\approx 50\%$) y los cultivos confluentes (confluencia $>95\%$) (figura 15). Sin embargo, debido a que se busca tener un modelo experimental que logre representar lo más cercano posible a las condiciones *in vivo*, se decidió que la confluencia para llevar a cabo los ensayos de invasión posteriores sería $\geq 95\%$.

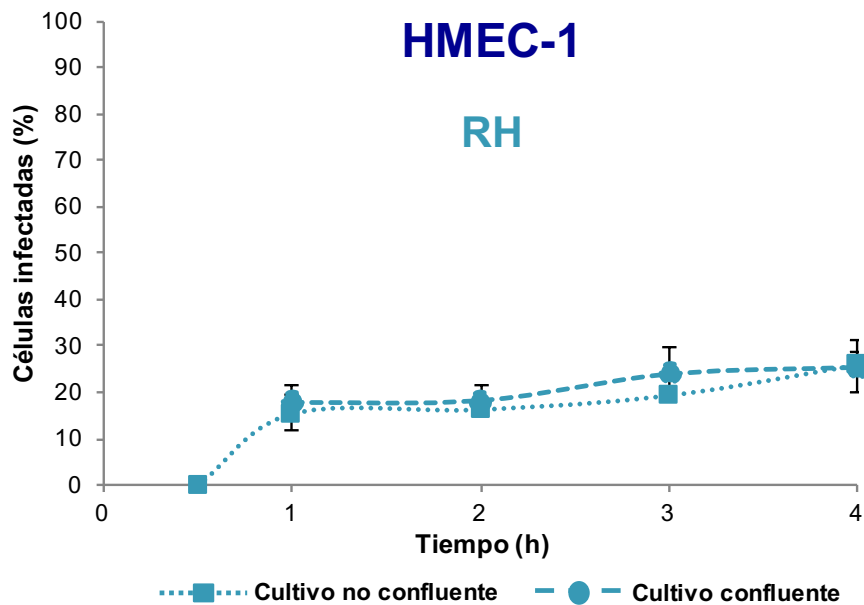


Figura 15. Gráfica de la cinética de invasión de taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii* en cultivos confluentes y no confluentes de HMEC-1. Relación parásito:célula 10:1. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

Cuando se adicionó al medio de invasión la mezcla comercial de antibióticos-antimicótico (penicilina G, estreptomina y anfotericina B), que se usa de manera rutinaria para el cultivo de las células endoteliales, se observó que tanto el porcentaje de células invadidas (figuras 16 y 18), como el número de vacuolas por célula (figuras 17 y 19) fueron menores, con ambas cepas de *T. gondii* y en ambos tipos celulares empleados.

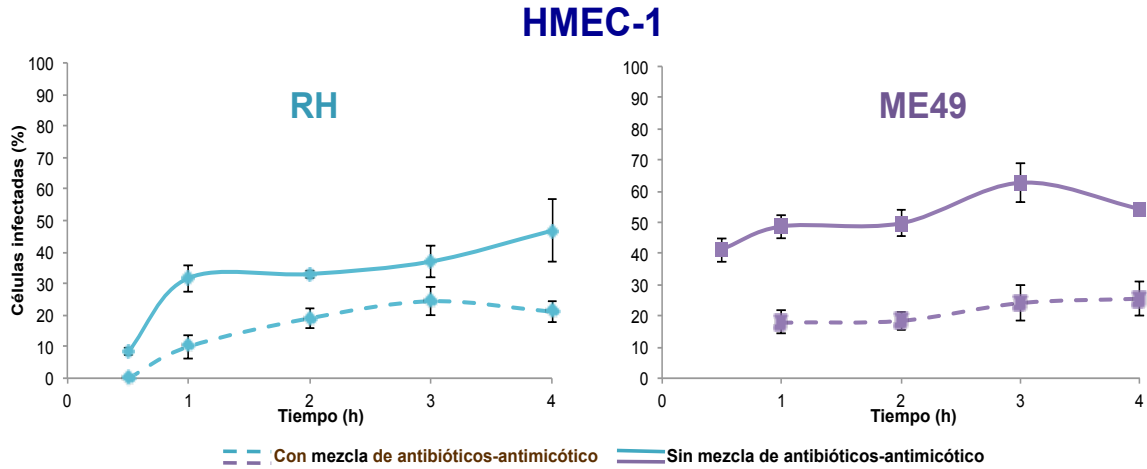


Figura 16. Gráficas de la cinética de invasión de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *T. gondii* en células HMEC-1, en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico en el medio de cultivo. Relación parásito:célula 10:1. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

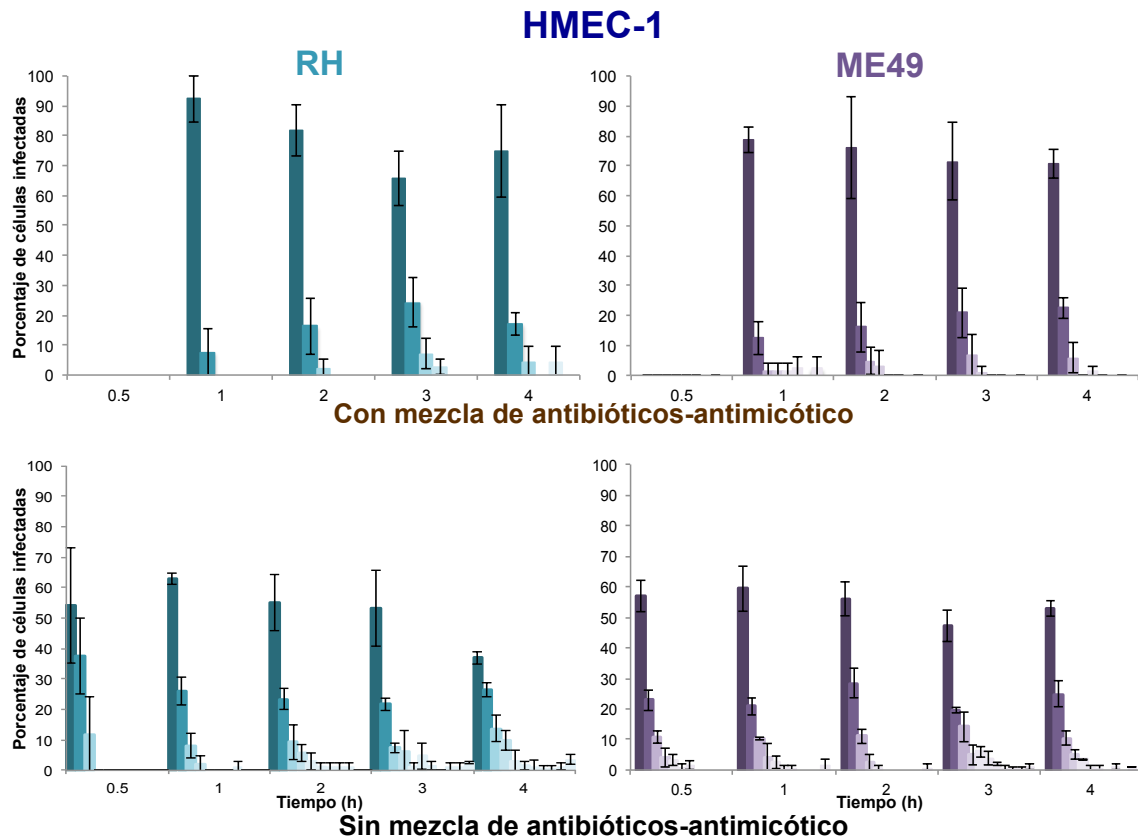


Figura 17. Gráficas del número de vacuolas por célula HMEC-1 infectada, desde 30 minutos hasta 4h, en el 100% de células infectadas con taquizoitos de *T. gondii* de las cepas RH y ME49, en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

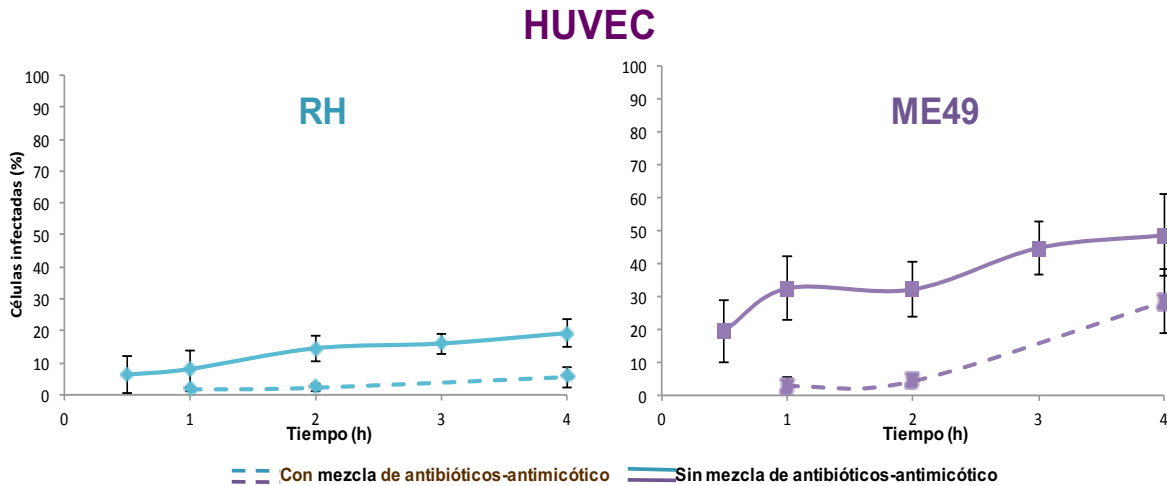


Figura 18. Gráficas de la cinética de invasión de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *T. gondii* en células HUVEC, en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico en el medio de cultivo. Relación parásito:célula 10:1. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

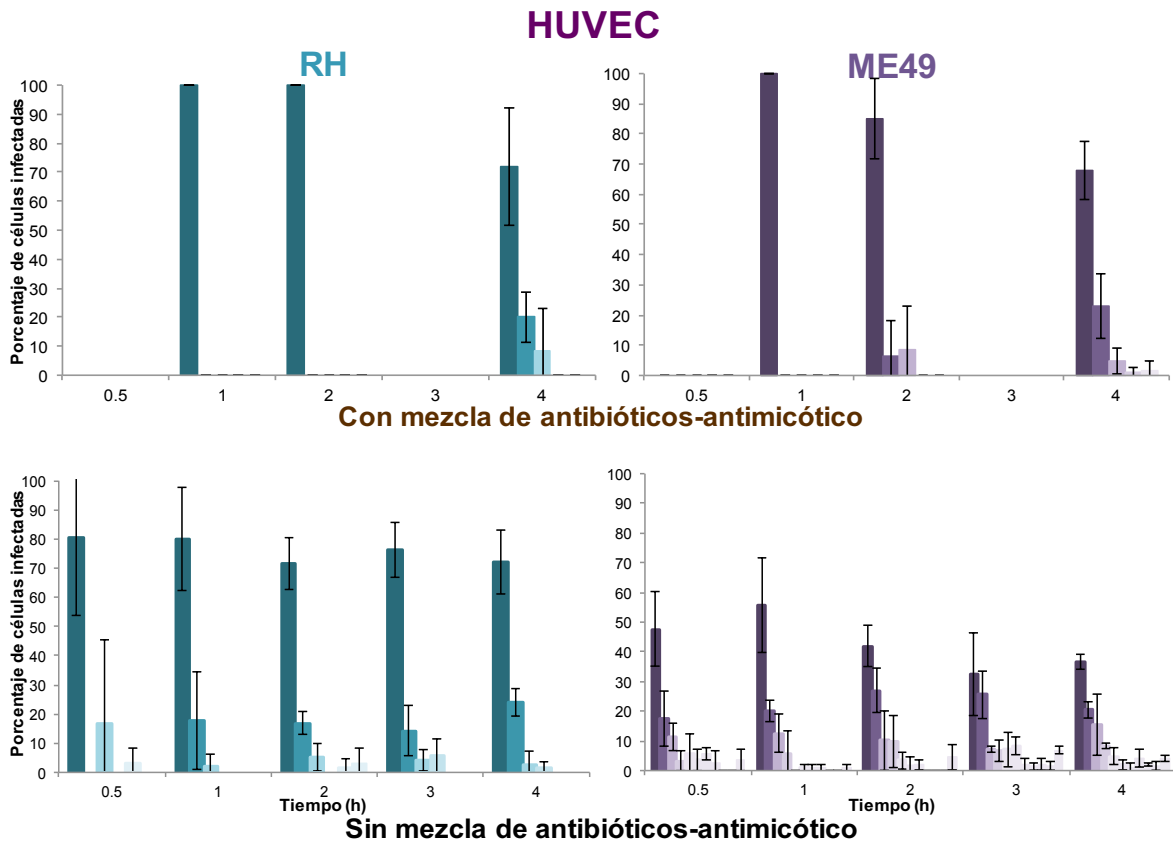


Figura 19. Gráficas del número de vacuolas por célula HUVEC infectada, desde 30 minutos hasta 4h, en el 100% de células infectadas con taquizoitos de *T. gondii* de las cepas RH y ME49, en presencia o ausencia de una mezcla de antibióticos-antimicótico. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

1.2. Cuantificación de invasión de células endoteliales humanas por taquizoitos de *Toxoplasma gondii* por microscopía de luz

Una vez que se encontraron las condiciones óptimas, se realizaron ensayos de cinética invasión de ambos tipos de células endoteliales humanas con las dos cepas, RH y ME49. En la figura 20 se observa que existe la misma tendencia para ambos tipos celulares y con ambas cepas del parásito: el grado de invasión se incrementa conforme al tiempo. Sin embargo, los taquizoitos de la cepa RH (virulenta) tardaron más en entrar a las HMEC-1, ya que a los 30 min sólo el 10% de las células estaban infectadas, mientras que para la cepa ME49 (no virulenta) ya había un 40%. A las cuatro horas ambas cepas alcanzaron entre un 40 y un 50% de infección, excepto para la cepa RH con las HUVEC, para las cuales el porcentaje de infección fue de 12.3% (figura 20).

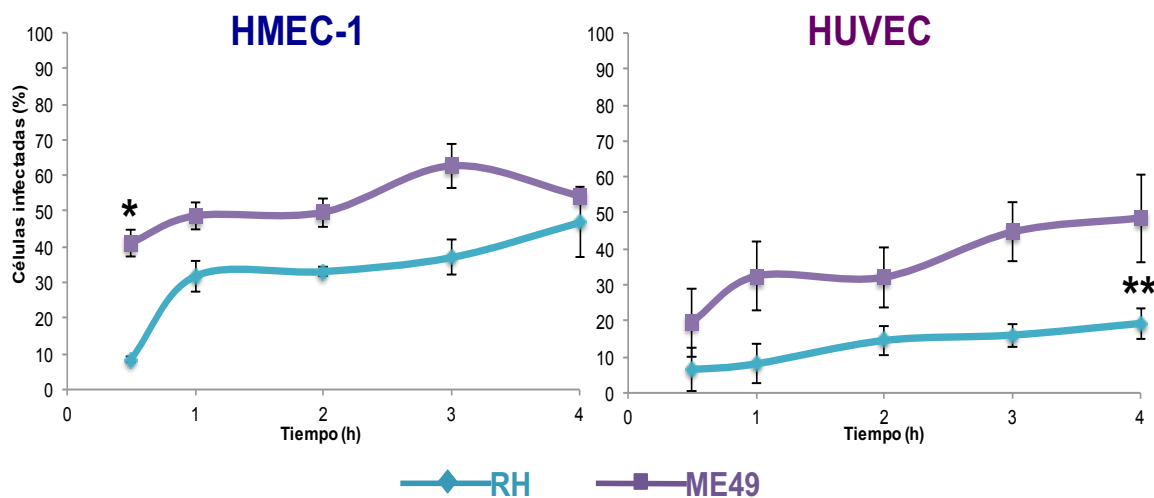


Figura 20. Gráficas comparativas de las cinéticas de invasión de taquizoitos de *T. gondii*, de la cepa RH (líneas azules) y de la cepa ME49 (líneas moradas), en células HMEC-1 y HUVEC. Relación parásito:célula 10:1. Los valores corresponden a la media±DE de tres experimentos por triplicado. *diferencias estadísticamente significativas con las otras tres combinaciones a los 30 minutos (Prueba U de Mann-Whitney, $P<0.05$). **diferencias con los otros tres grupos a lo largo del tiempo (Kruskal-Wallis, $P<0.01$), excepto para HMEC-1 infectadas por la cepa RH a los 30 minutos.

Con estos resultados de las cinéticas de invasión, se puede concluir que la cepa ME49 entra más rápido que la cepa RH a ambos tipos de células endoteliales humanas.

En la figura 21 se muestran ejemplos de microfotografías de microscopía de luz de células HMEC-1 y HUVEC invadidas por taquizoitos de *T. gondii*. Nótese que la mayoría de las células contienen una vacuola parasitófora por célula, que cada vacuola contiene un sólo parásito y que algunas células endoteliales contienen más de una vacuola, siendo este fenómeno más evidente en células endoteliales con mayor tiempo de interacción con los taquizoitos.

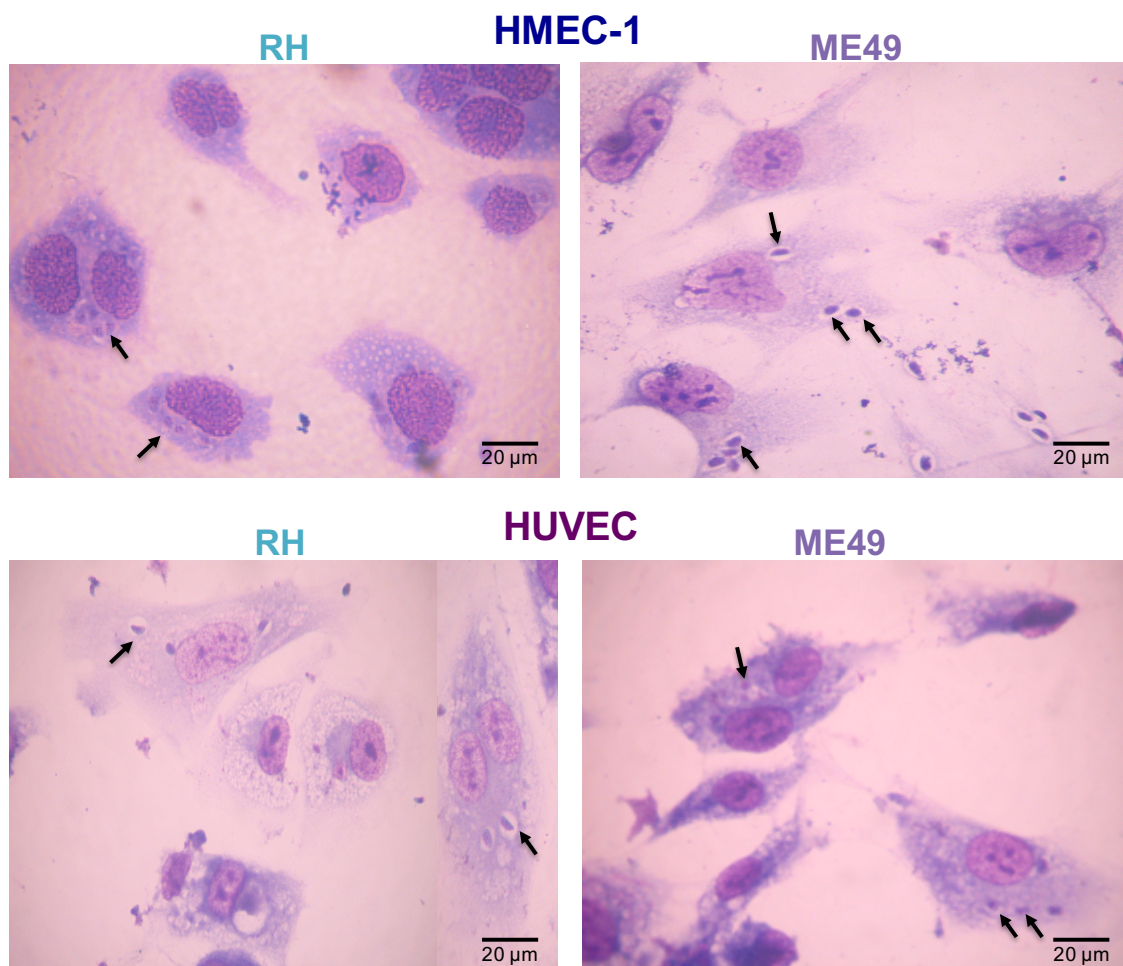


Figura 21. Microfotografías de microscopía de luz de células HMEC-1 y HUVEC infectadas con taquizoitos RH y ME49 de *T. gondii* y teñidas con colorante de Wright. Las flechas indican vacuolas parasitóforas en el citoplasma de la célula, las cuales se distinguen como un halo alrededor de los parásitos.

Se observó que el número de taquizoitos por célula se incrementa conforme avanza el tiempo, siendo más evidente para la cepa ME49 en ambos tipos celulares, debido a que se encontraron células con más de 20 taquizoitos por célula, desde las dos horas de interacción, mientras que con la cepa RH se encontraron hasta 14 y 11 parásitos por célula para las HMEC-1 y para las HUVEC, respectivamente (figura 22).

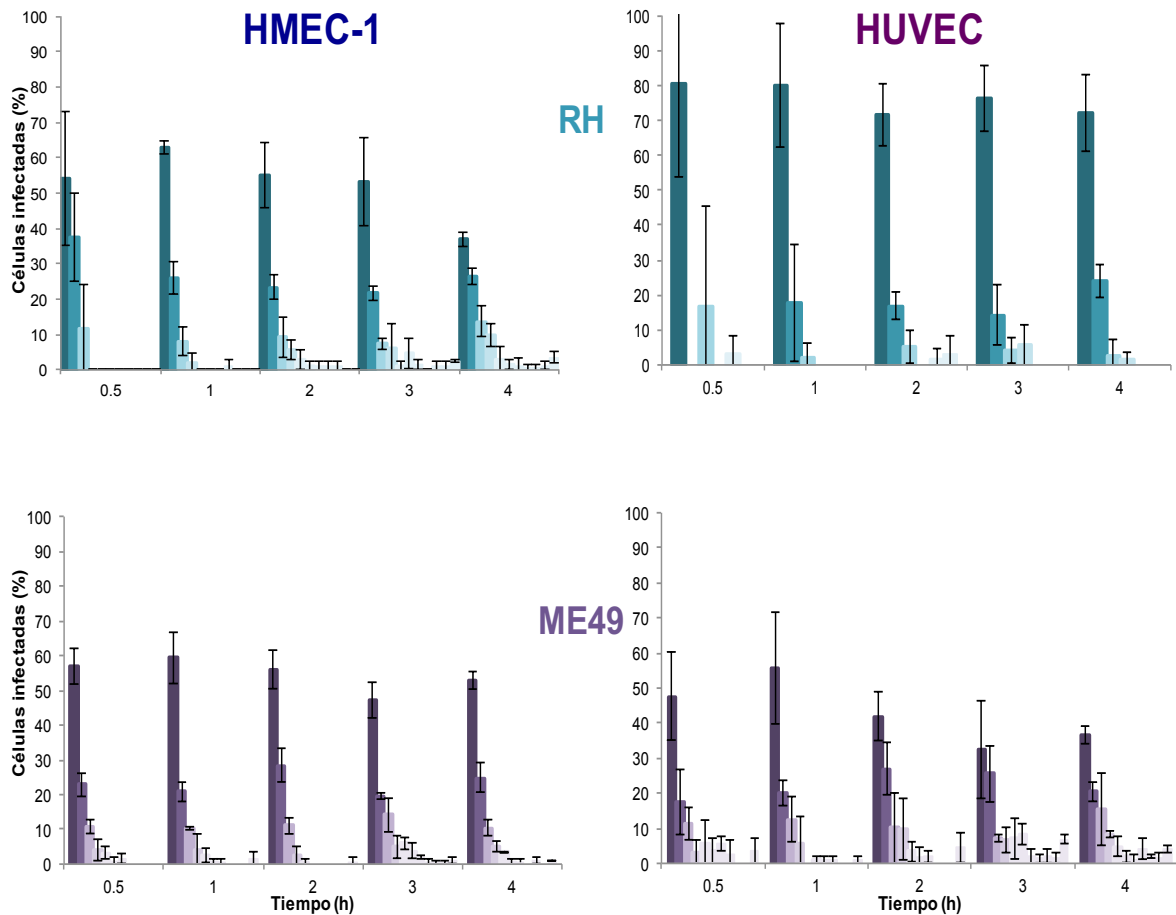


Figura 22. Gráficas comparativas del número de vacuolas por célula HMEC-1 y HUVEC infectada, desde 30 minutos hasta 4h, en el 100% de células infectadas con taquizoitos de *T. gondii* de las cepas RH y ME49. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

Con estos datos se calculó el número total de parásitos por 100 células, tomando en cuenta que cada célula puede tener más de un parásito y a este resultado se le denominó “carga parasitaria”. Se observa que se mantiene la tendencia de aumento conforme al tiempo, para ambas cepas del parásito y con los dos tipos celulares. De manera similar al número de células infectadas, el número ajustado de parásitos por 100 células fue mayor para la cepa ME49 que para la RH, en ambos tipos de células endoteliales, pero más evidente en las HUVEC, principalmente en las tres y cuatro horas de interacción parásito:célula, ya que se cuantificaron 8.3 y 6.5 veces más parásitos de la cepa ME49, respectivamente (figura 23).

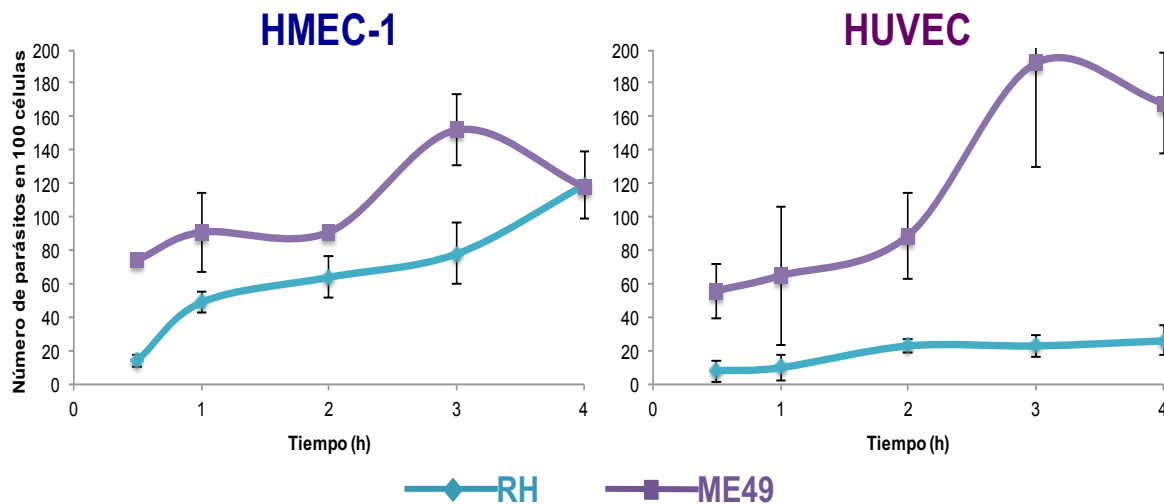


Figura 23. Gráficas comparativas del promedio del número de taquizoitos de *T. gondii* de la cepa RH (líneas azules) y de la cepa ME49 (líneas moradas) por cada 100 células endoteliales en los diferentes tiempos de interacción analizados. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

De acuerdo con los resultados obtenidos se eligió el tiempo de dos horas de invasión, junto con cultivos confluentes y sin antibióticos-antimicótico en el medio de cultivo, dosis 10:1 parásito:célula, para realizar ensayos con parásitos recubiertos de anticuerpos IgG1 humana, ya que para ambos tipos celulares y con

ambas cepas del parásito se pueden identificar cambios en estos porcentajes; además, es un tiempo en el que aún no comienza la replicación parasitaria.

1.3. Determinación de infección de células endoteliales por taquizoitos de *Toxoplasma gondii* mediante citometría de flujo y microscopía confocal

Para determinar el porcentaje de células endoteliales infectadas con taquizoitos de una manera más fácil y rápida, se emplearon parásitos marcados con CFSE y se analizaron las células mediante citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 24 la población de células analizadas y positivas a CD105 se distribuye en tres poblaciones con distinta intensidad de fluorescencia verde (parásitos). La población 1, corresponde a células que son únicamente positivas a CD105 (APC) (células no invadidas). Las poblaciones dobles positivas a APC y a FITC (2 y 3), que corresponderían a células infectadas, contienen distintas intensidades de fluorescencia, siendo la población 3 la de mayor fluorescencia verde (células multi-invasadas). Este fenómeno se detectó tanto para la cepa RH, como para la ME49 de *T. gondii*. Por análisis de microscopía confocal se observaron a las células endoteliales con la superficie en naranja, gracias a la tinción del CD105 y con parásitos verdes intracelulares, lo que indica que los taquizoitos no pierden su capacidad invasiva, y en los mismos campos se detectaron otras células vecinas no invadidas (figura 25).

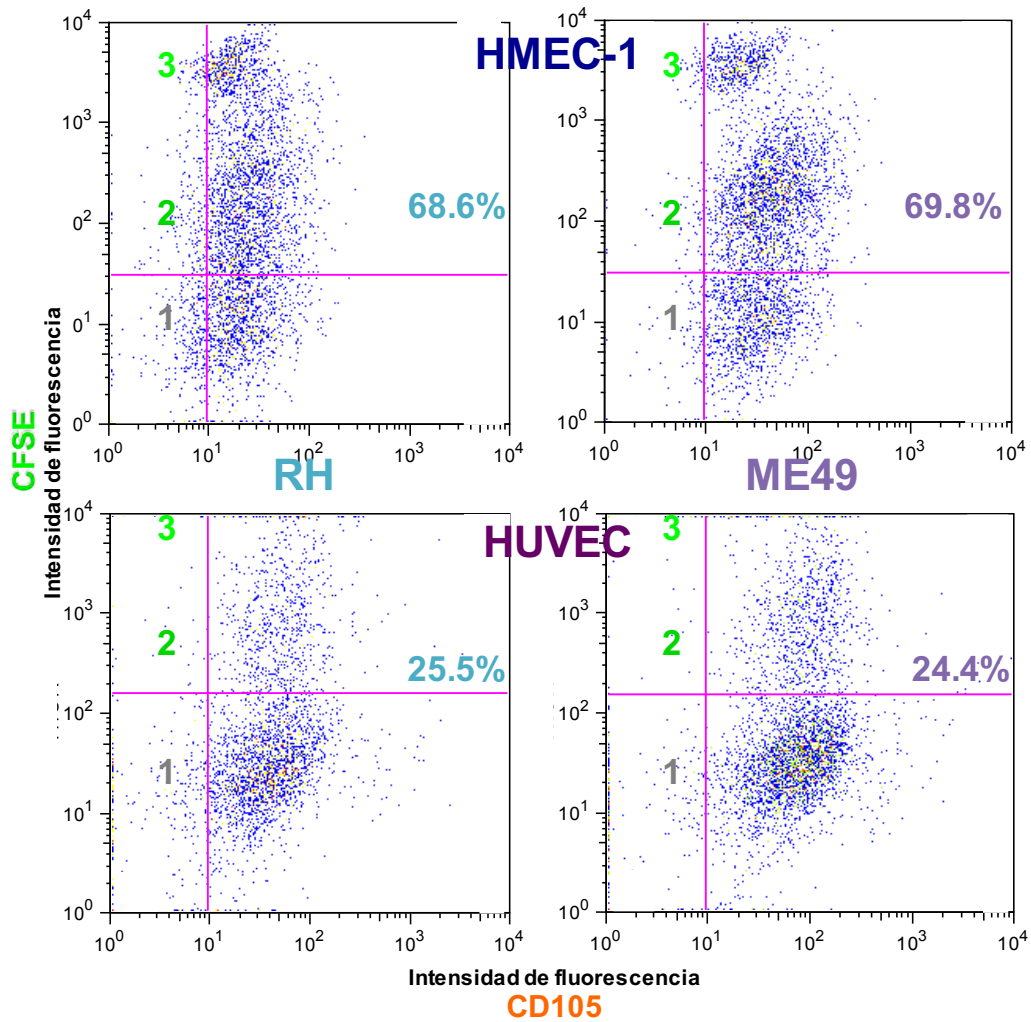


Figura 24. Gráficas de citometría de flujo que muestran las poblaciones de células endoteliales humanas positivas a CD105 y con distintas intensidades de fluorescencia verde, que indican células infectadas con taquizoitos de *T. gondii* teñidos con CFSE. Los puntos de corte se determinaron con base en la intensidad de fluorescencia de células no infectadas y de aquellas infectadas con parásitos no teñidos.

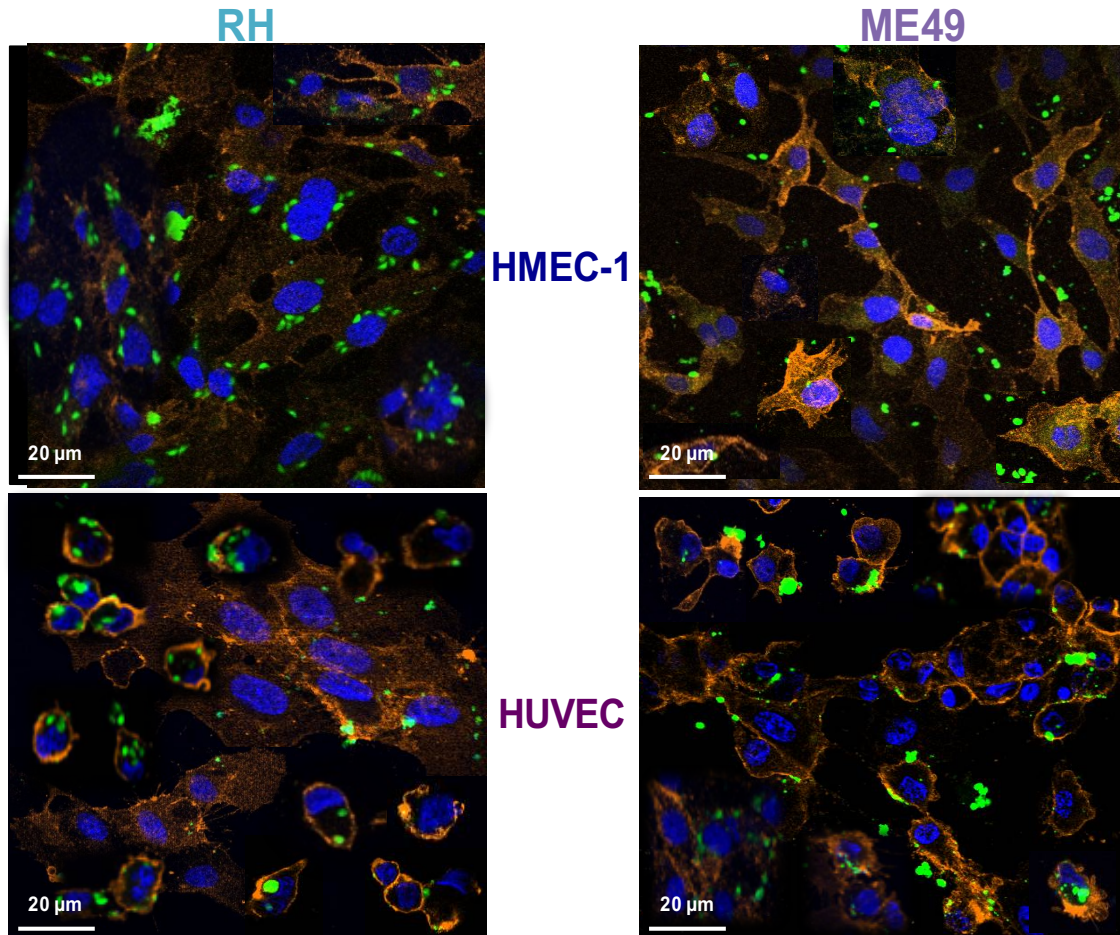


Figura 25. Microfotografías de microscopía confocal que muestran células HMEC-1 y HUVEC invadidas por dos cepas de T. gondii, RH y ME49. La superficie de las células se muestra en naranja, gracias a la tinción con un anticuerpo anti-CD105 marcado con APC. Los taquizoitos de T. gondii están teñidos con CFSE en verde. Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul.

Se realizó una separación celular de las tres poblaciones observadas en las gráficas de citometría de flujo, mediante su paso en un Separador-Analizador Celular MoFlo XDP (Beckman Coulter, Suzhou, China) y se analizaron las poblaciones por microscopia confocal para comprobar que las células si estaban infectadas y con ello calcular la proporción de infección. Por microscopía de fluorescencia se corroboró que la población 1 corresponde a células no infectadas, mientras que la población 2 y 3 son células con parásitos teñidos (figura 26).

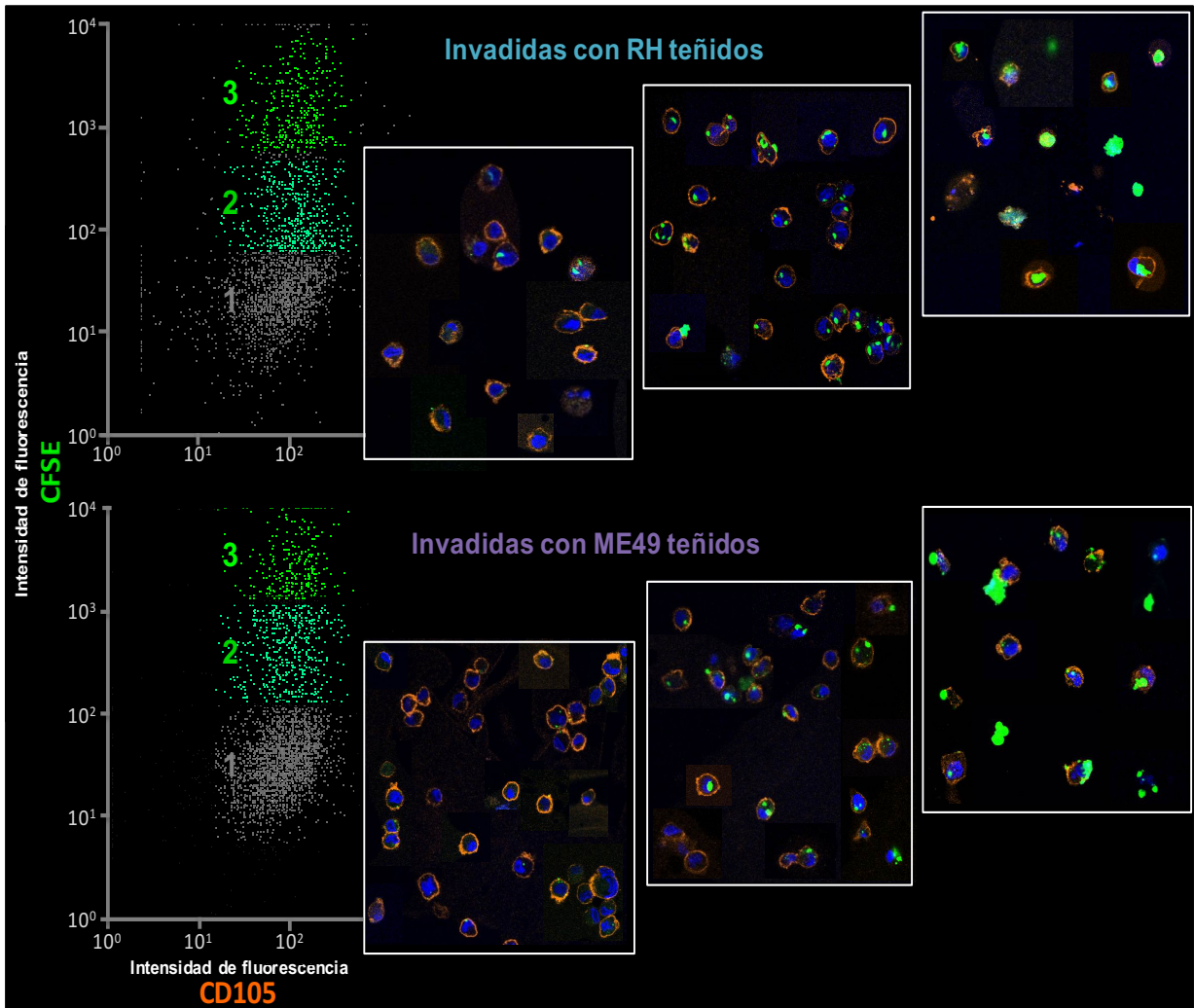


Figura 26. Gráficas de citometría de flujo de células HMEC-1 invadidas por taquizoitos de *T. gondii* teñidos con CFSE, marcadas con un anticuerpo anti-CD105 (naranja) y separadas de acuerdo a su intensidad de fluorescencia verde: (1) células sin marca, (2 y 3) células con marca. Por microscopía confocal se corroboró que la población 1 corresponde a células no infectadas. Las poblaciones 2 y 3 corresponden a células infectadas con parásitos teñidos. Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul.

Una vez que se determinaron los puntos de corte y que se calcularon los porcentajes de células infectadas se puede observar en la figura 27 que hay variabilidad entre muestras de HUVEC de diferentes individuos. Las células HMEC-1 se infectan más que las HUVEC y son homogéneas entre cultivos de diferentes fechas en cuanto al porcentaje de invasión. Asimismo, dado que la

intensidad de fluorescencia de los taquizoitos resultó muy alta, este método debe re-estandarizarse, bajando la concentración de la CFSE, ya que presentó la desventaja de que no fue permitió distinguir el número de parásitos por célula, ni identificar específicamente a las vacuolas parasitóforas (figuras 26 y 27).

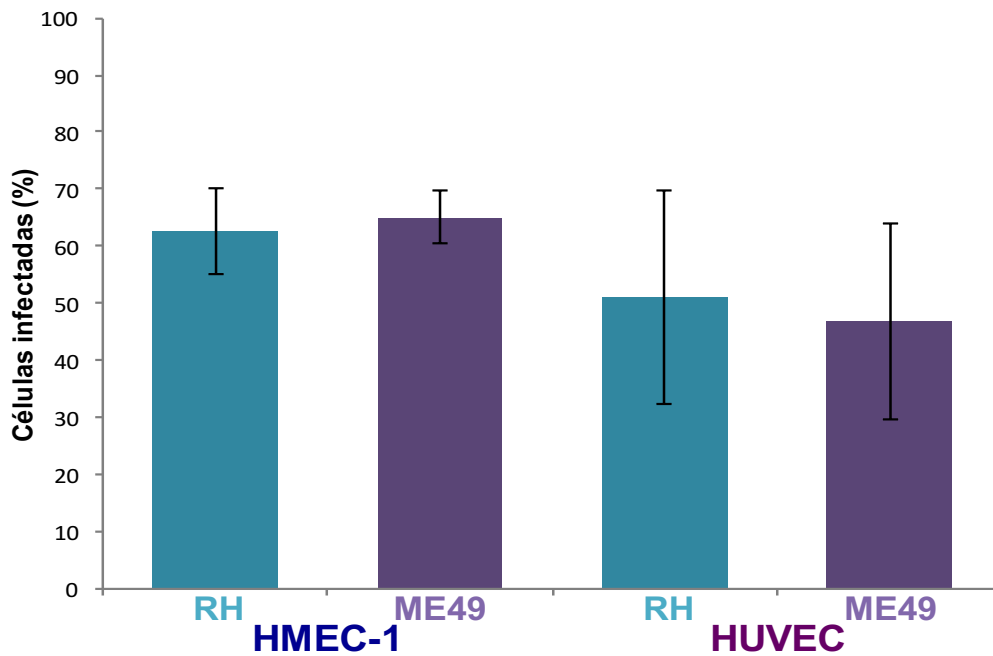


Figura 27. Gráfica de los promedios del porcentaje de células endoteliales infectadas con taquizoitos de dos cepas de *T. gondii* marcados con CFSE. El promedio de las HMEC-1 ($n=4$) con ambas cepas es más alto que para las HUVEC ($n=9$). En las HUVEC hay variación entre muestras de diferentes individuos. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

2. Recubrimiento de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii* con anticuerpos IgG1 humanos específicos

La mezcla de sueros positivos con IgG1 contra *T. gondii* se unió a ambas cepas del parásito, sin reacción inespecífica con el suero negativo (figura 28). Se probaron distintas condiciones de la mezcla de sueros positivos, siendo la mejor dilución de trabajo la de 1:1600 (datos no mostrados). El análisis por microscopía confocal reveló que la tinción es superficial y los anticuerpos no se juntan en zonas pequeñas (patching) ni forman “casquete” (capping). Estos resultados se corroboraron en tres ensayos diferentes y se muestra un ejemplo en la figura 28.

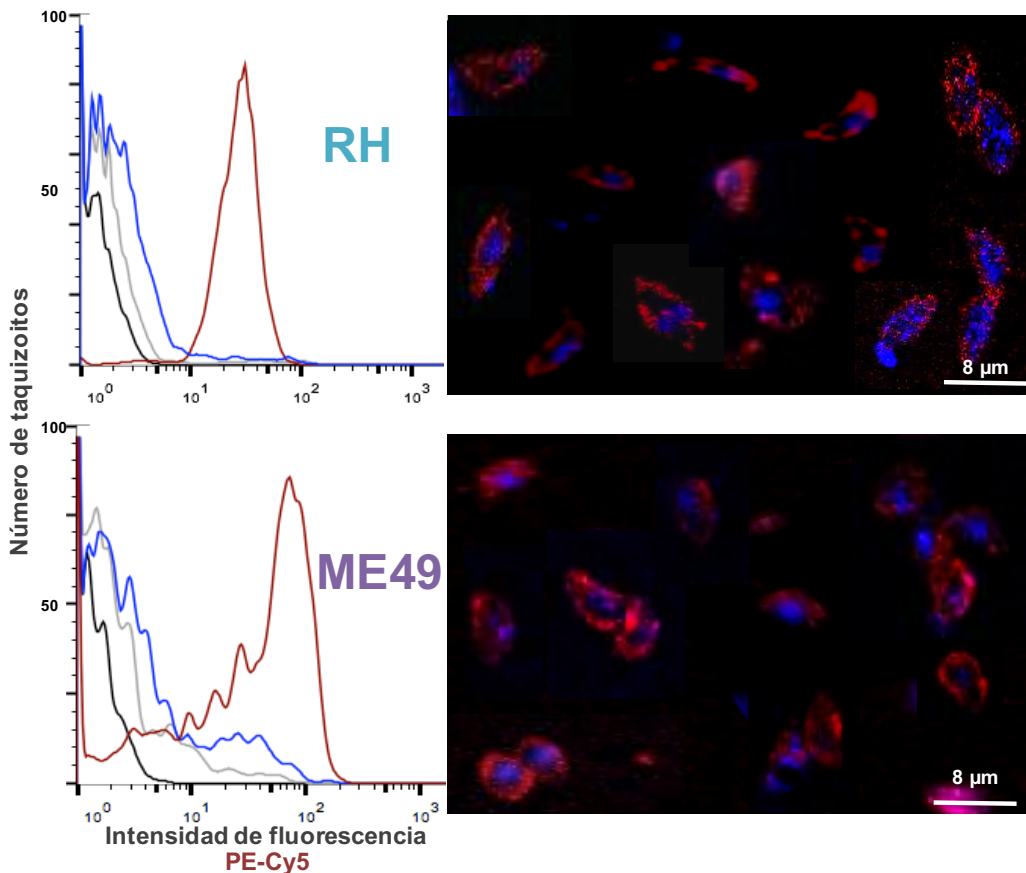


Figura 28. Gráficas de citometría de flujo y microfotografías de microscopía confocal que muestran el recubrimiento con IgG1 humana específica y su revelado con un anticuerpo secundario (anti-IgG humana) marcado con PE-Cy5 (fluorescencia roja) de taquizoitos de *T. gondii* de la cepa RH y ME49. Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul.

Se realizaron tres ensayos para corroborar que los taquizoitos marcados con CFSE (verdes fluorescentes) también se recubrían con anticuerpos IgG1 humanos, para posteriormente realizar ensayos de invasión. Como puede observarse en la figura 29, las gráficas de citometría de flujo muestran una población doble positiva a ambos fluorocromos (verde y rojo), lo cual fue corroborado por microscopía confocal, en donde se observan los parásitos verdes en todo el citoplasma y con su superficie roja.

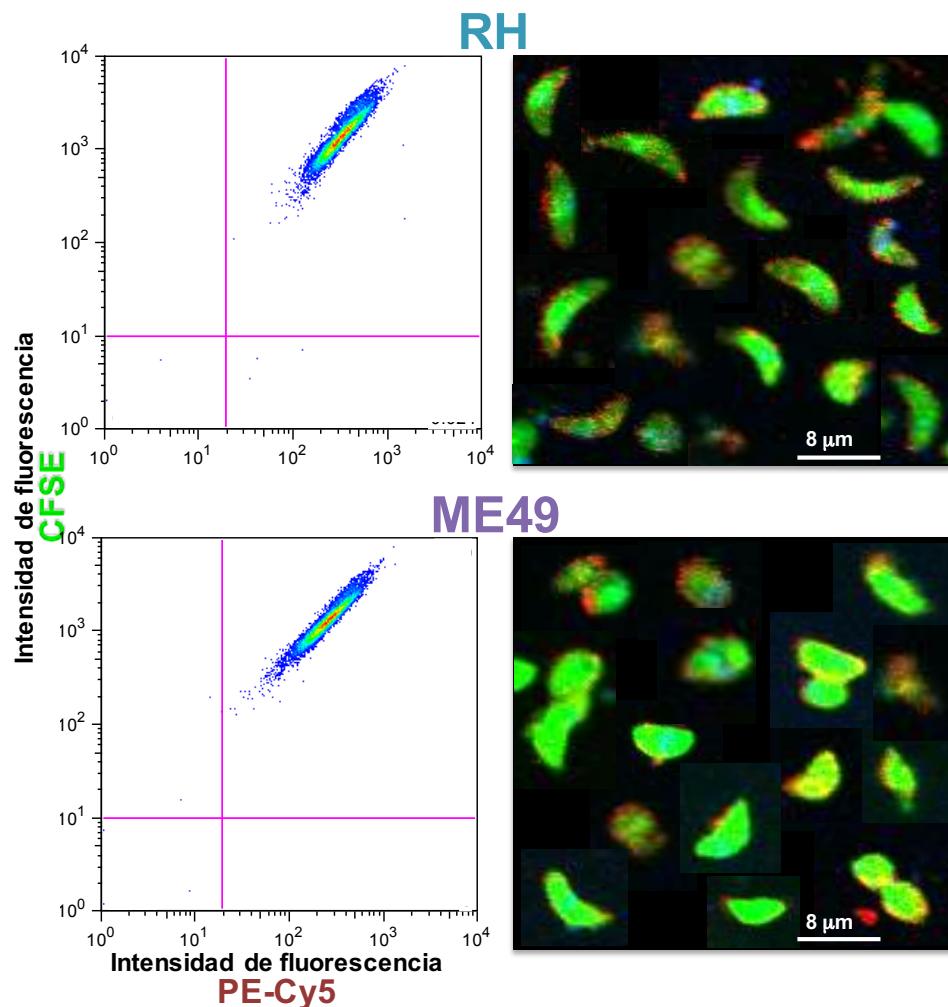


Figura 29. Gráficas de citometría de flujo y microfotografías de microscopía confocal que muestran el recubrimiento con IgG1 humana específica y su revelado con un anticuerpo secundario (anti-IgG humana) marcado con PE-Cy5 (fluorescencia roja) de taquizoitos teñidos con CFSE de *T. gondii*, de la cepa RH y ME49,. Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul.

3. Ensayos de invasión de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii* recubiertos con anticuerpos IgG1 humanos específicos en células HMEC-1

Para los ensayos en los que se determinó el efecto de los anticuerpos IgG1 sobre la entrada de los taquizoitos a las células endoteliales, se decidió emplear únicamente células HMEC-1, debido a su homogeneidad en cuanto al grado de invasión por los parásitos, en cuanto a los niveles de expresión del FcRn (como se verá más adelante) y llevar a cabo la cuantificación de células infectadas y de vacuolas parasitóforas empleando la tinción con colorante de Wright y evaluación por microscopía óptica, debido a que ésta resultó ser la mejor técnica para el análisis (por lo menos bajo estas condiciones). Los resultados de estos ensayos indicaron que el grupo de los parásitos sin tratamiento (incubados con PBS) fue en el que se obtuvo mayor porcentaje de células infectadas: 39.8% para la cepa RH y 45.1% para la cepa ME49. El tratamiento con suero negativo disminuyó la entrada, pero el recubrimiento de los taquizoitos de ambas cepas de *T. gondii* con anticuerpos IgG1 humanos la aumentó: de 30.3.% a 34.2.% para la cepa RH y de 28.7.% a 38.7.% para la cepa ME49 (figura 30).

Se corroboró, por microscopía óptica y confocal, que los parásitos intracelulares, en todas las condiciones del ensayo, estaban bien definidos, aparentemente viables y dentro de una vacuola. Asimismo, las células endoteliales se observan íntegras y viables (figura 31).

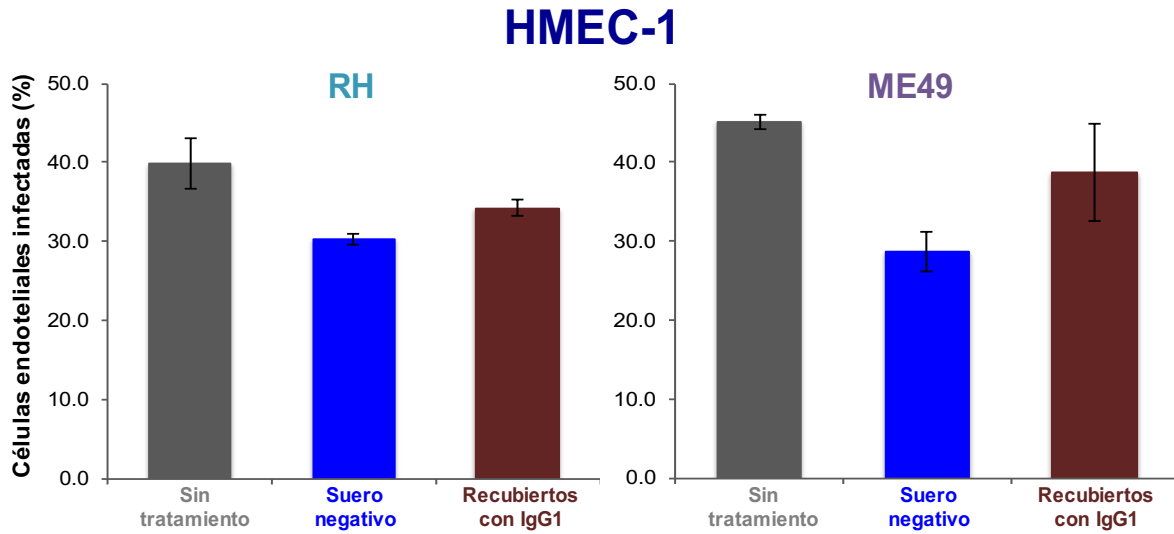


Figura 30. Gráficas comparativas del porcentaje de células HMEC-1 invadidas por taquizoitos de la cepa RH y de la cepa ME49 de *T. gondii* en tres condiciones: parásitos sin tratamiento, parásitos en contacto con suero negativo a *T. gondii* y parásitos recubiertos con IgG1 específica. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

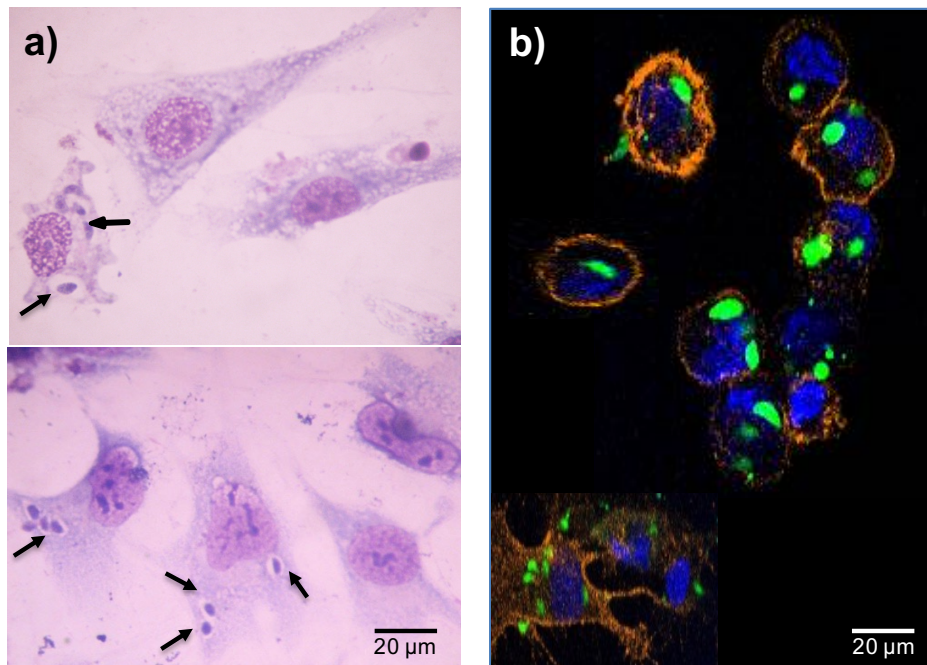


Figura 31. Células HMEC-1 con taquizoitos de *T. gondii* intracelulares. a) Microfotografías de microscopía de luz de células teñidas con colorante de Wright; las flechas indican taquizoitos dentro de una vacuola. b) Microfotografías de microscopía confocal de células con un anticuerpo anti-CD105 (marcador de células endoteliales) en naranja, los parásitos se encuentran teñidos de verde con CSFE y los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul.

Cuando se cuantificó el número de vacuolas por célula, también se detectaron diferencias entre grupos de tratamiento y entre cepas del parásito. Para los taquizoitos de ambas cepas recubiertos con IgG1 hubo mayor número de parásitos por célula, ya que la barra correspondiente a una vacuola por célula es menor y las barras de dos o más parásitos por célula son más altas que en el caso de los parásitos en contacto con suero negativo (figura 32).

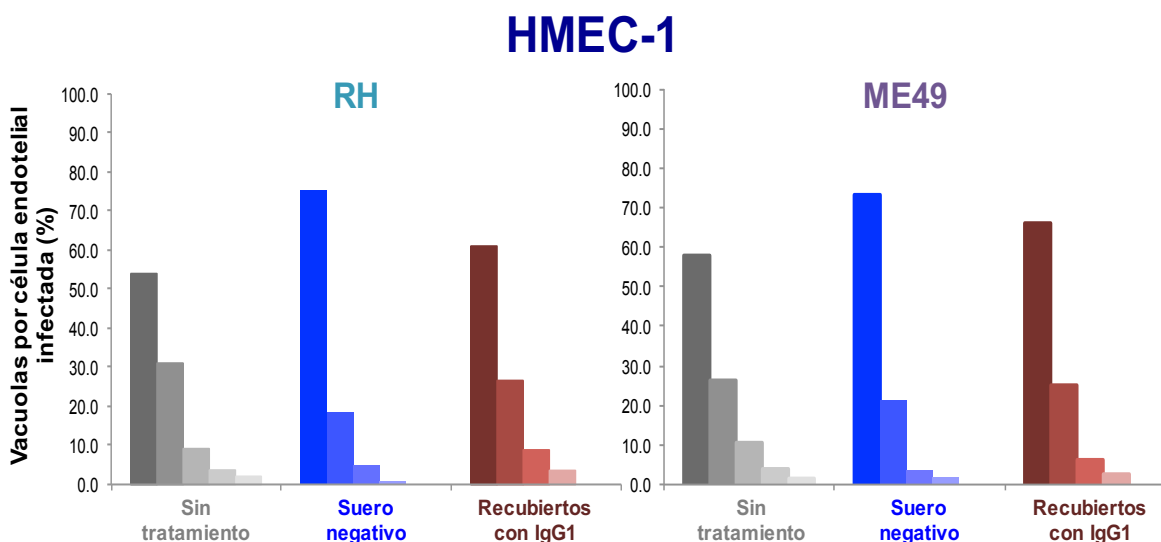


Figura 32. Gráficas comparativas del número de vacuolas por cada célula HMEC-1 infectada, expresada como porcentaje, con taquizoitos de *T. gondii* de la cepa RH y de la cepa ME49 en tres condiciones: parásitos sin tratamiento, parásitos en contacto con suero negativo a *T. gondii* y parásitos recubiertos con IgG1 específica. La barra más alta corresponde al porcentaje de células con una vacuola por célula.

Cuando se calculó el número de parásitos en 100 células, denominado como carga parasitaria, tomando en cuenta el porcentaje de células infectadas y el número total de parásitos por célula, se encontraron diferencias aún mayores entre los grupos analizados y para ambas cepas de *T. gondii*, siendo mayor el número en los grupos de parásitos recubiertos con IgG1 (figura 33).

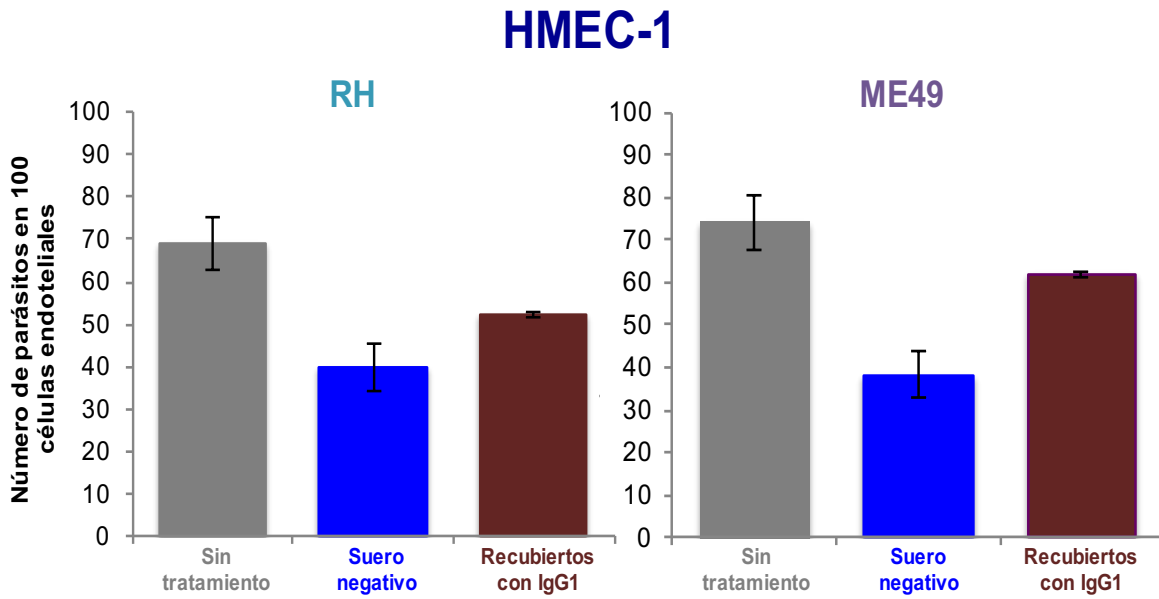


Figura 33. Gráficas comparativas del número total de parásitos de T. gondii por 100 células HMEC-1 infectadas (área bajo la curva). Cepa RH y cepa ME49 en tres condiciones: parásitos sin tratamiento, parásitos en contacto con suero negativo a T. gondii y parásitos recubiertos con IgG1 específica. Las líneas negras corresponden a la desviación estándar.

4. Expresión del FcRn

4.1. Expresión del FcRn a nivel de mRNA

Se identificó que los niveles relativos de mRNA del *FCGRT* y el índice *FCGRT/B2M* son homogéneos entre muestras de cultivos de HMEC-1 de fechas diferentes (n=4) y significativamente más altos, que los niveles de las HUVEC y de las vellosidades placentarias (n=7 de cada muestra) (figura 34).

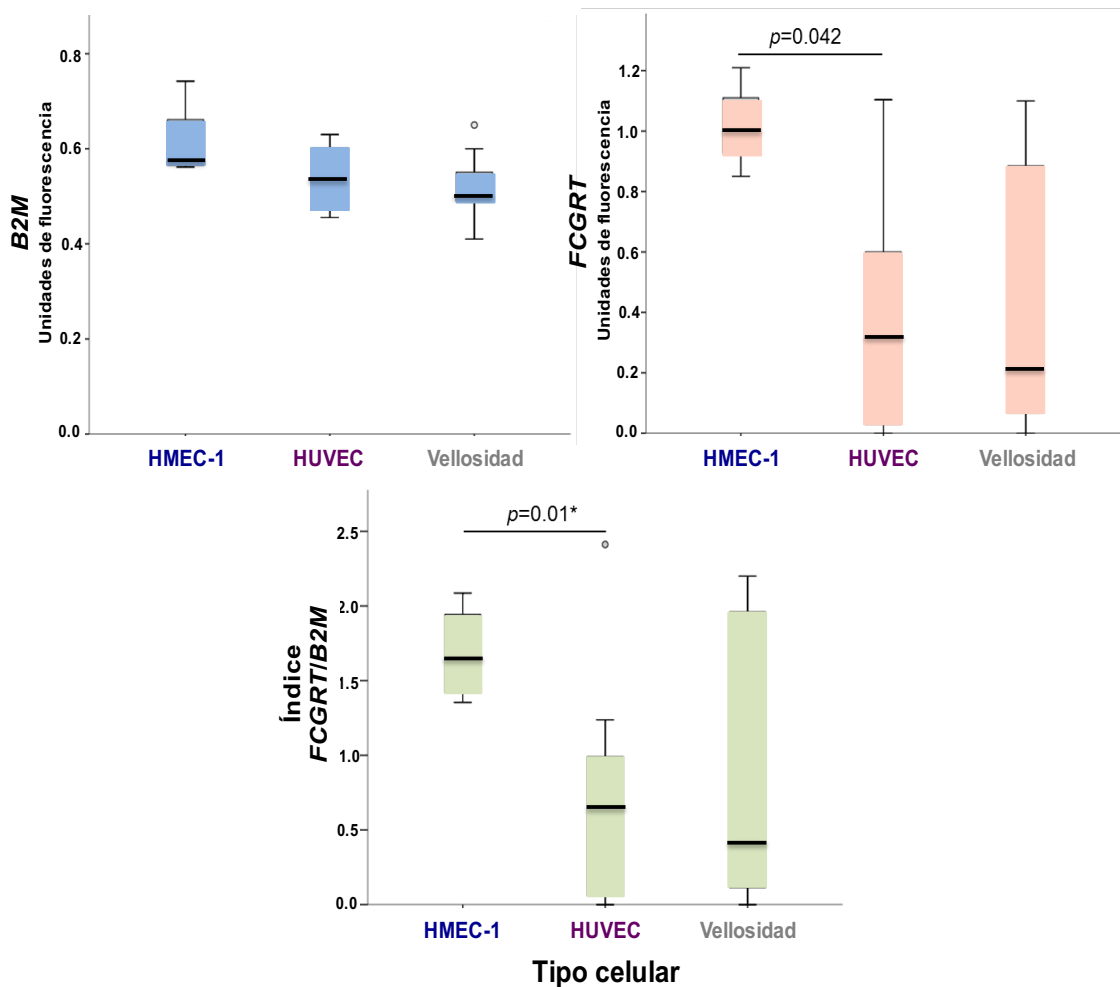


Figura 34. Gráficas de la expresión del mRNA de la beta-2-microglobulina humana (B2M) y de la cadena α del FcRn humano (FCGRT) medida por RT-PCR en tiempo real. Los niveles absolutos (arriba) y el índice *FCGRT/B2M* (abajo) fueron determinados en cultivos de HMEC-1 (n=4), de HUVEC (n=7) y en muestras de vellosidades placentarias (n=7) como controles positivos de expresión. La diferencia estadística fue calculada con la prueba U-de Mann-Whitney. *Esta diferencia fue calculada excluyendo el valor superior extremo; si se incluye la $P=0.074$.

Estas diferencias no se explican por la cantidad o por la calidad del mRNA, ya que los valores del control endógeno *-B2M-* fueron homogéneos, como se muestra en la gráfica superior izquierda. Además, las muestras de HUVEC y de las vellosidades placentarias presentaron niveles heterogéneos entre individuos del *FCGRT* y por ende, del índice *FCGRT/B2M* (figura 34).

4.2. Expresión del FcRn a nivel de proteína

En la figura 35 se muestran gráficas representativas de citometría de flujo para la detección de la cadena α del FcRn humano en HMEC-1 y HUVEC. Como se puede observar, ambos tipos celulares son positivos para la proteína. Aparentemente, las HMEC-1 expresan niveles más bajos en comparación con las HUVEC. Sin embargo, al realizar la microscopía confocal se observan ambos tipos de células marcadas con intensidad y localización similar: la tinción naranja del CD105 co-localiza en la superficie con la del receptor (fluorescencia verde) en la mayoría de las células (figuras 36 y 37); en algunas células el FcRn también se observa en el citoplasma, aparentemente en vesículas. La intensidad de fluorescencia detectada por citometría de flujo y por microscopía confocal fue similar entre HUVEC colectadas de individuos diferentes (datos no mostrados). Estos resultados de expresión del FcRn, a nivel de mRNA y de proteína, no habían sido reportados previamente, por lo cual se publicaron y propusimos a estos dos tipos de células endoteliales humanas como modelos para el estudio de la biología del FcRn *in vitro* (Ortiz-Alegría *et al*, 2016; ver anexo II).

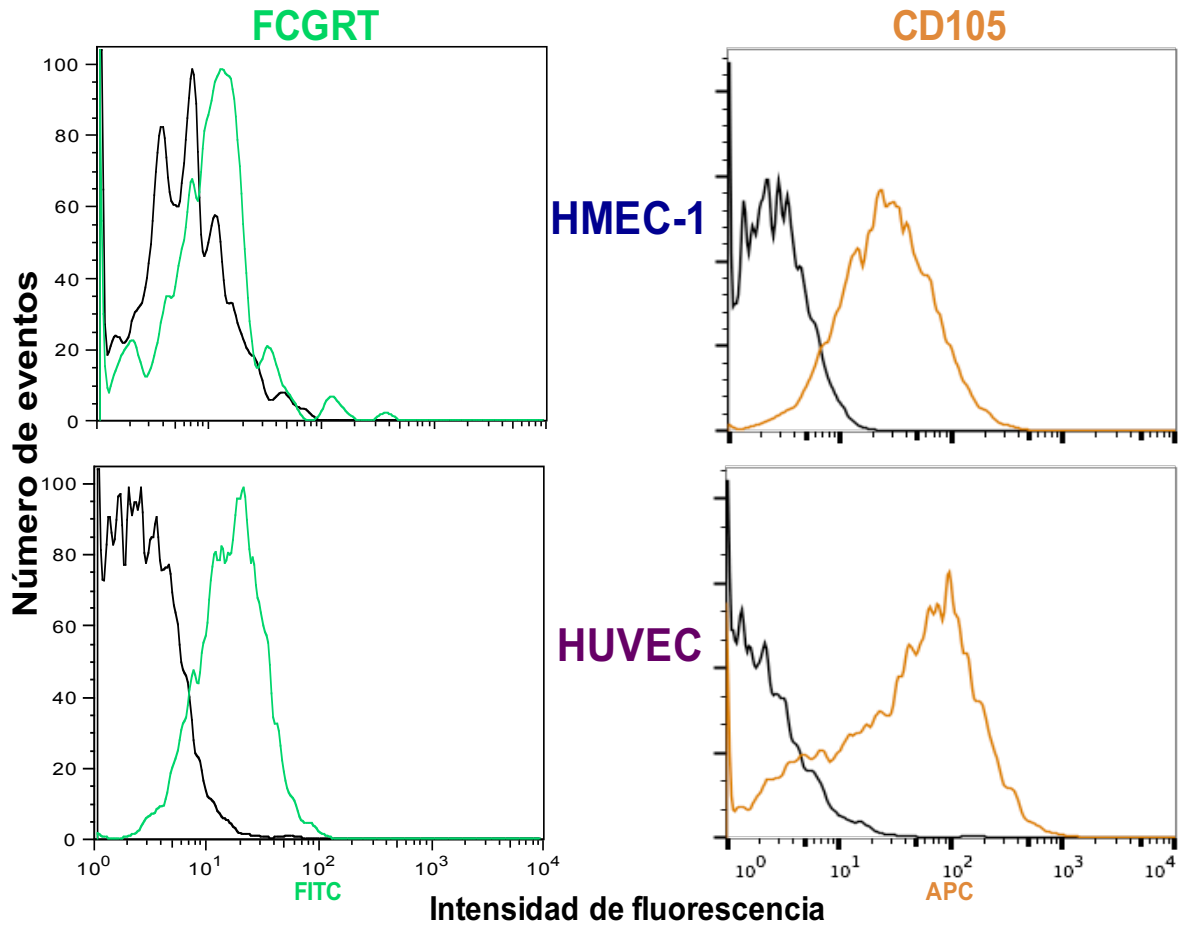


Figura 35. Gráficas de la expresión de la proteína del FcRn en células HMEC-1 y HUVEC, evaluada por citometría de flujo. Para la detección se emplearon simultáneamente anticuerpos para el CD105 humano, como marcador de superficie específico de células endoteliales (con APC en naranja), y para la cadena α del FcRn (con FITC en verde). Las líneas negras en todos los gráficos corresponden a la fluorescencia basal de las células.

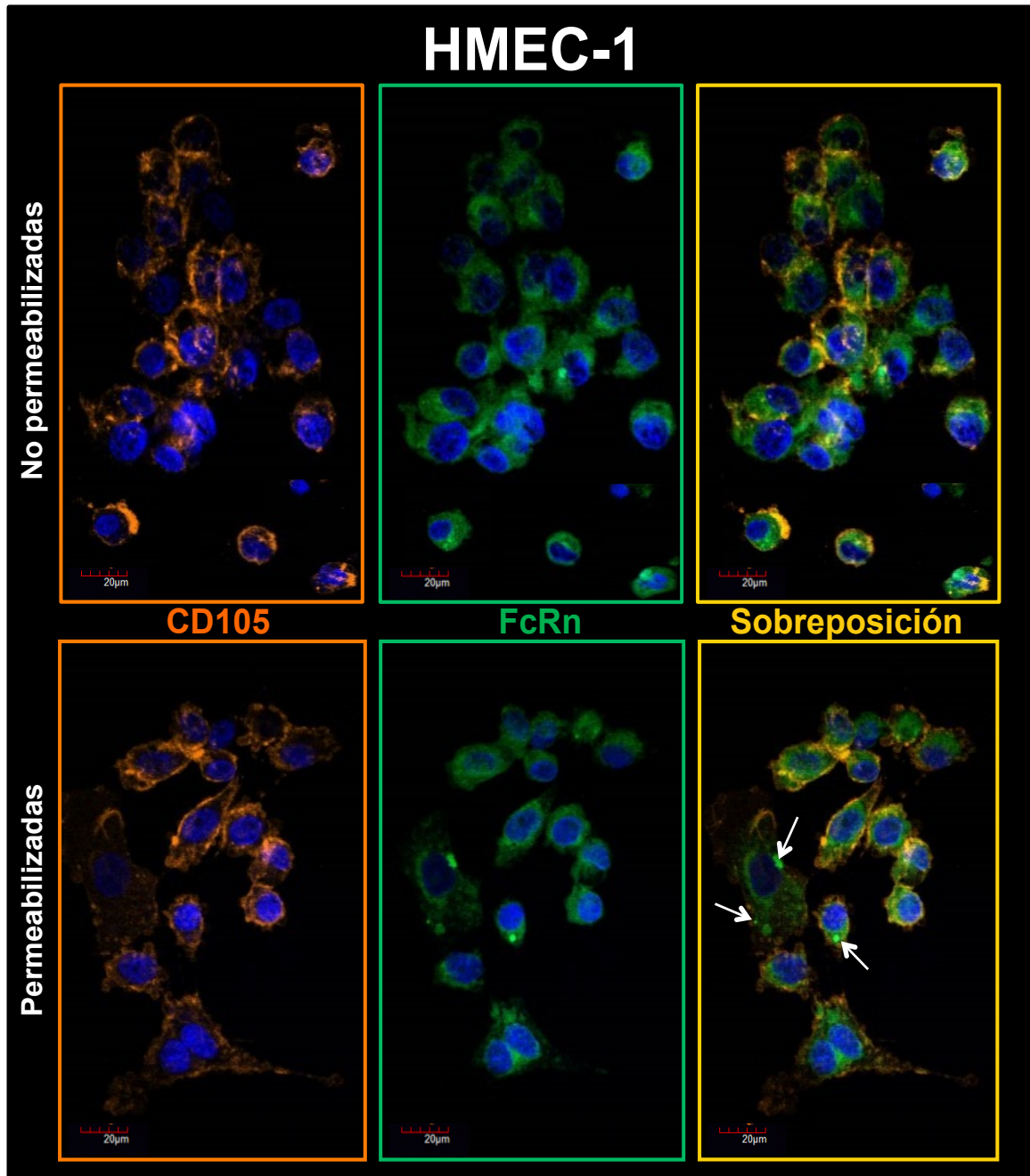


Figura 36. Microfotografías que muestran la expresión de la proteína del FcRn humano en células HMEC-1 evaluada por microscopía confocal. Para la inmunotinción se empleó un anticuerpo anti-CD105 unido a APC (naranja) y un anticuerpo anti-FcRn humano y su anticuerpo secundario marcado con FITC (verde). Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul. Se muestran las fluorescencias individuales y la sobreposición de las tres marcas para identificar co-localización. Las flechas indican al FcRn localizado en vesículas intracelulares.

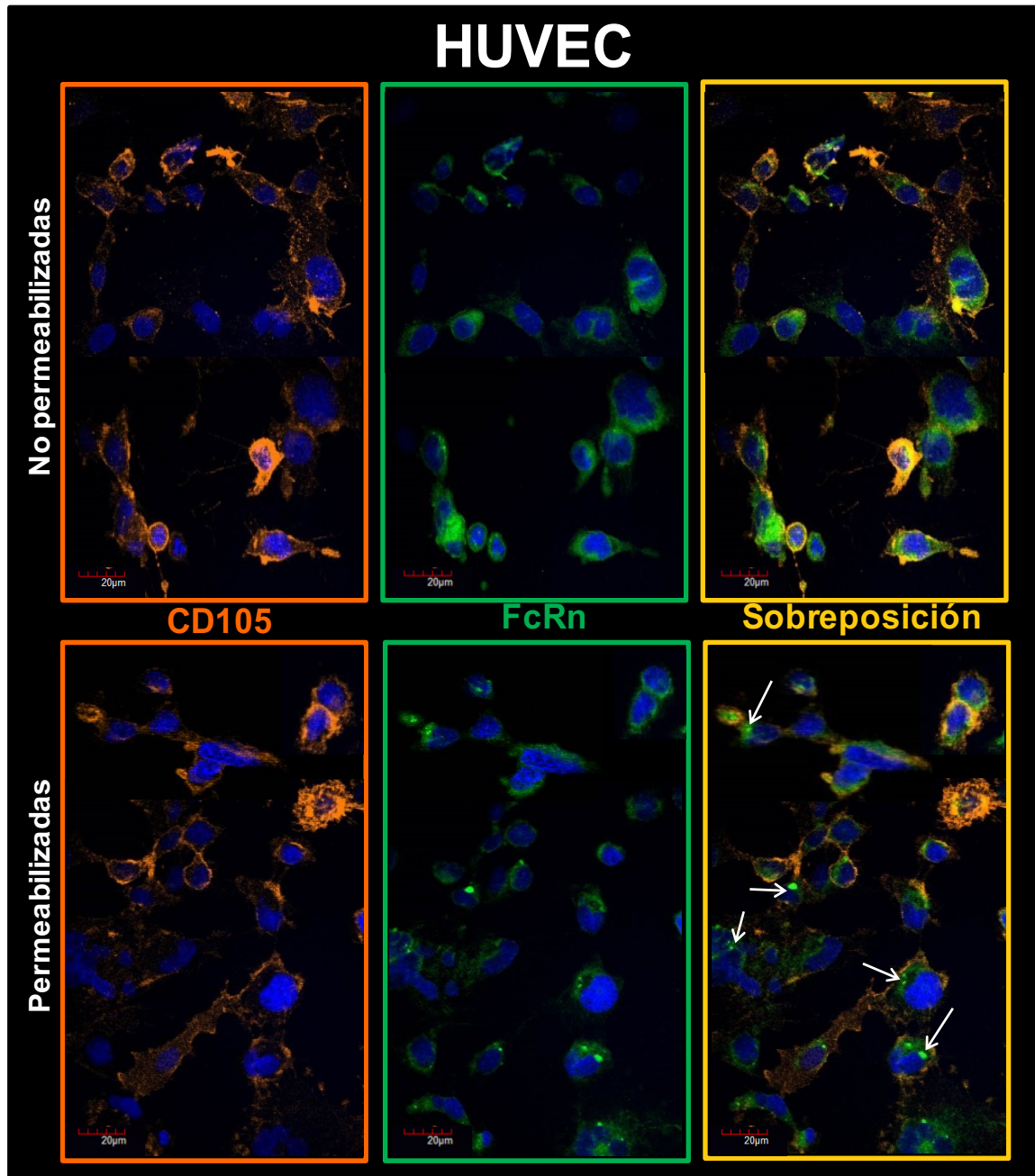


Figura 37. Microfotografías que muestran la expresión de la proteína del FcRn humano en células HUVEC evaluada por microscopía confocal. Para la inmunotinción se empleó un anticuerpo anti-CD105 unido a APC (naranja) y un anticuerpo anti-FcRn humano y su anticuerpo secundario marcado con FITC (verde). Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en azul. Se muestran las fluorescencias individuales y la sobreposición de las tres marcas para identificar co-localización. Las flechas indican al FcRn localizado en vesículas intracelulares.

5. Identificación de los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn humano

5.1. Estandarización de la PCR y análisis del polimorfismo (VNTRs) del promotor del FcRn en individuos mexicanos

En la figura 38 se puede observar un ejemplo de una fotografía de un gel de agarosa al 1.6%, teñido con bromuro de etidio, con los productos de la PCR de nueve donadores, los cuales presentan una banda única (homocigotos) de entre 600 y 650 pb, que corresponde a la de 3 VNTRs.

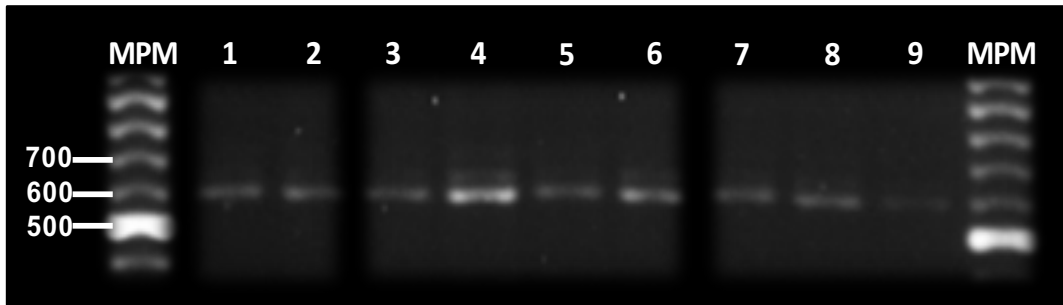


Figura 38. Fotografía de un gel de agarosa (1.6%), teñido con bromuro de etidio, que muestra los productos de PCR para identificar los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn, de nueve muestras de DNA. Todas corresponden a individuos homocigotos para VNTR3, ya que se observa una sola banda de alrededor de 600 pb.

5.2. Frecuencia de los polimorfismos (VNTRs) del promotor de la cadena α del FcRn humano

De los 87 individuos mexicanos muestreados, 83 fueron homocigotos para el alelo VNTR3, tres fueron heterocigotos VNTR2/3 y un individuo resultó homocigoto VNTR2/2 (figura 39). Con estos datos las frecuencias calculadas por alelo fueron:

$$\text{VNTR2} = 2.9\%$$

$$\text{VNTR3} = 97.1\%$$

No se encontraron muestras de individuos que presenten los otros alelos.

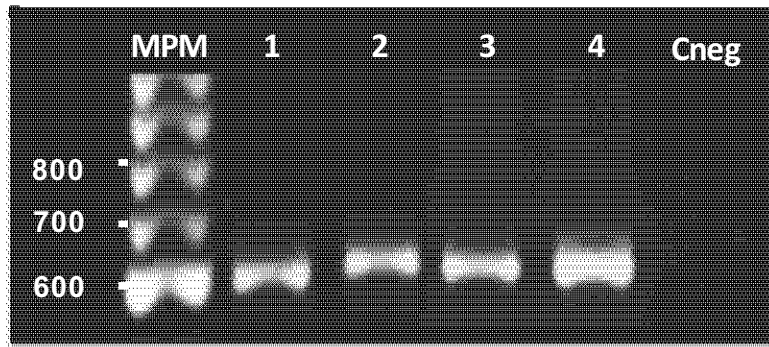


Figura 39. Fotografía de un gel de agarosa (1.6%), teñido con bromuro de etidio, que muestra los productos de PCR para identificar los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn de cuatro individuos. La muestra 1 corresponde a un individuo homocigoto para VNTR2, ya que se observa una banda única de alrededor de 590 pb. Los otros tres individuos son homocigotos para VNTR3, ya que se observa una sola banda de entre 600 y 650 pb.

5.3. Polimorfismos del promotor del gen de la cadena α del FcRn humano en mujeres con infección aguda por *Toxoplasma gondii* y de sus recién nacidos

Se colectaron muestras de sangre total de nueve binomios madre e hijo, cuyas mujeres se confirmó que se encontraban en fase aguda de infección por *T. gondii*. En el cuadro 4 se muestran los resultados de positividad a IgM, IgA, IgG y las cuatro subclases de IgG anti-*T. gondii*, y presencia del DNA del parásito en sangre (determinado por PCR-tiempo real), con los cuales se determinó si hubo transmisión vertical. En algunos casos se logró cuantificar el número de parásitos por mililitro de sangre y el genotipo del parásito. Asimismo, se evaluaron médicamente a los nueve bebés y se capturaron las características clínicas. Por otro lado, de todas las muestras de sangre se determinaron los alelos de los VNTRs del promotor del FcRn presentes en cada individuo.

Cuadro 4. Datos serológicos, de biología molecular, de transmisión vertical y características clínicas de nueve recién nacidos y de sus madres con infección aguda por *T. gondii*.

Binomio	Anticuerpos anti- <i>T. gondii</i>								Detección de <i>T. gondii</i>			Transmisión vertical	Infección neonatal		Genotipo (VNTRs) FcRn	
	IgM	IgA	IgG	Avidez de IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	PCR-TR	Carga parasitaria	Genotipo		Localización	Severidad		
1	Madre	Pos		Neg												3/3
	Neonato	Neg		Neg								No	Sin problemas clínicos			3/3
2	Madre			Pos												3/3
	Neonato			Pos								No	Sin problemas clínicos			3/3
3	Madre	Neg		Pos	Aguda				Pos	ND	Atípico					3/3
	Neonato	Pos		Pos	Inde-terminada				Neg			No	Sin problemas clínicos			3/3
4	Madre	Pos	Neg	Pos		2.5	1.4	0.8	0.6				Si			3/3
	Neonato	Neg	Neg	Pos		2.3	1.4	1.4	0.8					Diseminada	Moderada	3/3
5	Madre	Neg	Neg	Neg		1.3	0.9	1.3	1.0				Si			3/3
	Neonato	Neg	Neg	Neg		1.2	0.9	1.2	0.9	Pos	ND			Diseminada	Severa	3/3
6	Madre	Pos	Neg	Neg	Aguda	2.1	2.1	1.2	0.8	Pos	2,500,000	I	Si			3/3
	Neonato		Neg	Neg	Aguda	1.4	1.0	0.9	0.9	Pos	23,000	I		Diseminada	Severa	3/3
7	Madre	Pos	Pos	Pos		2.5	1.3	1.0	1.3				Si			2/2
	Neonato	Neg	Neg	Pos		0.9	0.8	0.5	0.6	Pos	1,172	Mixta (I+II)		Diseminada	Severa	2/3
8	Madre	Pos	Neg	Pos	Crónica	1.3	1.3	1.1	1.1				Si			2/3
	Neonato	Pos	Neg	Pos	Crónica	1.0	0.5	0.6	0.7	Pos	ND			Diseminada	Severa	2/3
9	Madre	Pos	Pos	Pos	Aguda	0.7	0.9	0.8	0.8	Pos	21,052	Mixta (I+II)	Si			3/3
	Neonato	Pos	Neg	Pos		1.1	0.9	0.8	0.7	Pos	18,354			Diseminada	Severa	3/3

De acuerdo a los resultados mostrados en el cuadro 4, de los nueve binomios analizados, en cinco hubo transmisión vertical de *T. gondii* y en todos estos casos, los bebés presentaron problemas clínicos, con daño en varios órganos y tejidos (localización diseminada) y con manifestaciones clínicas, incluso en dos casos hubo muerte fetal (binomios 5 y 7). Mas aún, en este grupo de binomios con infección congénita, todas las muestras de suero de las mamás resultaron positivas a IgG1 anti-*T. gondii*, con variaciones para las otras clases y subclases de anticuerpos específicos y con variaciones entre los neonatos. Además, en este mismo grupo, hubo detección del parásito por PCR-tiempo real, encontrando diferentes cargas parasitarias y diferentes genotipos del parásito en al menos una de las muestras de sangre de madre o neonato.

En cuanto a los datos del genotipo del FcRn, la mayoría de los individuos fueron homocigotos para VNTR3/3. Sin embargo, en el grupo de binomios con infección congénita, se encontraron individuos con genotipos diferentes: la mamá del binomio siete fue homocigota VNTR2/2, ya que presenta una sola banda de menor tamaño (figura 40). Éste es un caso en el que sí hubo transmisión vertical del parásito, el cual se detectó circulando en la sangre del bebé y correspondía a una infección mixta, es decir, una infección por dos cepas diferentes de *T. gondii*, una tipo I y una tipo II. Además, el niño presentó problemas clínicos severos con una infección diseminada, tuvo daño en varios órganos y afectó gravemente la salud del bebé, incluso causando su muerte *in utero* y resultó heterocigoto VNTR2/3 del genotipo del FcRn (cuadro 4 y figura 40). Otro binomio que resultó con genotipo diferente del FcRn fue el número ocho, en el cual, la mamá y el neonato fueron individuos heterocigotos VNTR2/3. Éste es otro par en el que hubo transmisión vertical, se detectó al parásito circulando y el bebé resultó con infección diseminada y severa (cuadro 4).

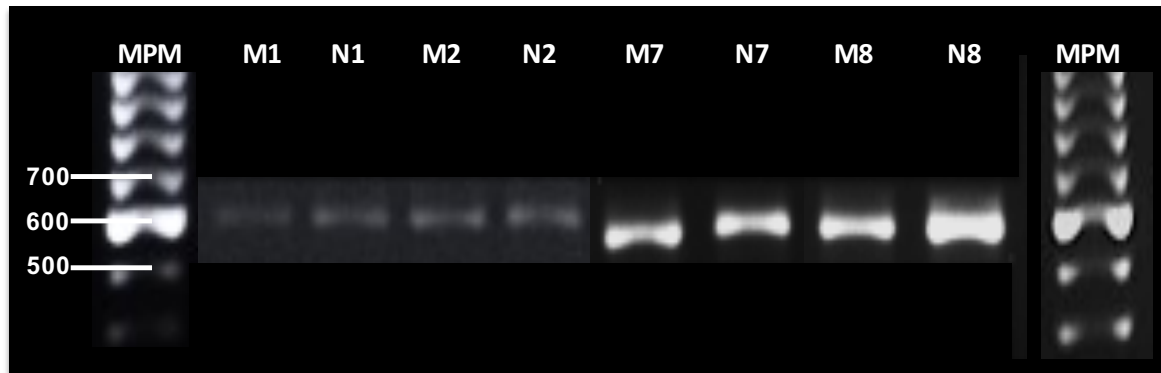


Figura 40. Fotografía del gel de agarosa (1.6%), teñido con bromuro de etidio, que muestra los productos de PCR para identificar los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn de cuatro binomios madre (M) y su neonato (N). Las muestras de los binomios 1 y 2 corresponden a individuos homocigotos VNTR3/3. La M7 presenta un polimorfismo diferente y es homocigota VNTR2/2. La M8 y los neonatos N7 y N8 son individuos heterocigotos VNTR2/3.

DISCUSIÓN

Toxoplasma gondii invade a las células de los organismos hospederos y se replica; para ello utiliza una maquinaria compuesta de diferentes moléculas, principalmente proteínas, contenidas en los organelos del complejo apical, que le permiten mantenerse dentro de una vacuola parasitófora y regular distintas funciones celulares, obteniendo así nutrientes y evadiendo la destrucción intra y extracelular (Carruthers, 1999; Hakimi *et al*, 2017). Se sabe que los taquizoitos de *T. gondii* invaden cualquier célula nucleada, con lo que ganan acceso a los diversos tejidos y atraviesan barreras biológicas como la hemato-encefálica y la placentaria, por lo que pueden producir daño y generar problemas clínicos dentro del cerebro o llegar al feto en desarrollo (Barragan y Sibley, 2003; Carlier *et al*, 2012; Clough y Frickel, 2017). Hasta el momento no se ha demostrado que tengan tropismo por algún tipo celular específico; sin embargo, se ha observado que invaden distintos tipos celulares de un mismo tejido en proporciones diferentes. Por ejemplo, en un estudio encontraron diferencias en el porcentaje de células invadidas a las 24 horas por la cepa RH entre dos tipos celulares de sistema nervioso central humano: astrocitos y neuronas, siendo mayor para los primeros (24.2% vs 10.5%) (Halonen *et al*, 1996). En el presente trabajo también encontramos diferencias en el grado de invasión, ya que detectamos una mayor proporción de células endoteliales de microvasculatura invadidas que de macrovasculatura, independientemente de la cepa de *T. gondii*. La variación en la susceptibilidad puede deberse a diversos factores, como la expresión diferencial de algunas moléculas que podrían reconocer a los taquizoitos en la superficie de las células. Por ejemplo, se ha encontrado que el parásito se une a la molécula de adhesión ICAM-1, expresada en células endoteliales de retina o de cerebro y en trofoblastos humanos, lo que le permite incluso migrar a través de monocapas, y que el propio parásito induce incremento en la expresión de ICAM-1, siendo mayor este efecto con cepas no virulentas como la ME49 (Barragan *et al*, 2005; Pfaff *et al*, 2005a; Juliano *et al*, 2006; Lachenmaier *et al*, 2011; Furtado *et al*, 2012). Se ha demostrado que tanto las HMEC-1 como las HUVEC expresan ICAM-1, y que es mayor la expresión basal en las primeras, lo cual explicaría, por lo menos en parte, por qué se

detectó una mayor proporción de células infectadas y más parásitos por célula (Ades *et al*, 1992; Xu *et al*, 1994; Lidington *et al*, 1999). Otras moléculas descritas que son específicas del tipo de célula hospedera durante la adhesión son el TLR2 y el TLR4 (Faure *et al*, 2000; Fitzner *et al*, 2008). Habría que estudiar estas moléculas en los tipos celulares analizados y comprobar si tienen algún papel en la invasión de *T. gondii*. Otro factor que se ha descrito que influye en la invasión es la etapa del ciclo celular en la que se encuentren las células hospederas (Angeloni *et al*, 2009; 2013). Brenier-Pinchart y colaboradores (2004) identificaron que los trofoblastos humanos de la línea celular BeWo y las células HeLa que se encontraban en fase S se infectaron por la cepa ME49 más que cuando se encontraban en otras fases del ciclo celular. Además, se demostró que el parásito induce a las células del cultivo a entrar a fase S, lo que le permite invadir un mayor número (Brenier-Pichart *et al*, 2004; Lavine y Arrizabalaga, 2009; Angeloni *et al*, 2013). Las HMEC-1 tienen un índice de replicación más alto por ser semi-inmortales, que las HUVEC, de cultivo primario, por lo que hay mayor proporción de células en fase S del ciclo celular, lo que les proporcionaría mayor susceptibilidad a la invasión por *T. gondii*.

Por otro lado, se sabe que el tipo de *T. gondii* tiene una gran influencia en la invasión a las células hospederas (Lambert y Barragan, 2010). Hace algunos años se había planteado que las cepas virulentas, denominadas así por su gran velocidad de replicación y diseminación en ratones, entrarían más rápido y a un mayor número de células (Sibley, 1993; Sibley *et al*, 1999). En contraste, en este estudio encontramos que la cepa no virulenta invadió a ambos tipos de células endoteliales humanas más rápido, en mayor proporción y con más parásitos por célula, que la virulenta *in vitro*. A pesar de una búsqueda exhaustiva en la literatura, no hay estudios en los que se compare la invasión por distintos tipos cepas de *T. gondii* en un solo tipo celular ni de seres humanos, ni de animales o de líneas, lo que hace esta información novedosa, faltando definir si el fenómeno es universal. El único reporte hasta cierto punto parecido fue publicado por Brenier-Pinchart y colaboradores (2010); ellos observaron pequeñas variaciones, de 12 a 18%, en el porcentaje de fibroblastos de piel humana invadidos por cinco cepas tipo II. En contraste, los autores encontraron diferencias mayores en las tasas de replicación. Cabría entonces sugerir que la virulencia está

más relacionada a la replicación que a la invasión. La cepa RH se replica en aproximadamente 4 horas, mientras que la cepa ME49 se replica en alrededor de 7 horas (Radke *et al*, 2001; Shaw *et al*, 2001). Sin embargo, en la toxoplasmosis congénita la mayor proporción de cepas encontradas a nivel mundial son las cepas tipo II, lo que puede deberse a que éstas pueden invadir un número mayor de células y por lo tanto, tienen una mayor diseminación en los tejidos fetales, aunque, con menor o más lenta capacidad de producir daño, debida a su disminuida velocidad de replicación, comparada con las cepas tipo I, las cuales se han asociado con daño más severo en los fetos (Ajzenberg, 2012; McLeod *et al*, 2012; Rico-Torres *et al*, 2016). Otro dato interesante es que en células endoteliales de cerebro de ratas en contacto con taquizoitos de las cepas RH y ME49, se encontró que la cepa ME49 no virulenta inducía una mayor expresión de ICAM-1, lo que generó una mayor adhesión a las células endoteliales y con ello la migración a través de la barrera hemato-encefálica, tanto de parásitos libres como de células presentadoras de antígenos infectadas (Lachenmaier *et al*, 2011). Asimismo, se ha visto incremento de ICAM-1 en otros tipos celulares debida a la infección por *T. gondii* (Deckert-Schlüter *et al*, 1994; Nagineni *et al*, 2000; Barragan *et al*, 2005; Pfaff *et al*, 2005a; Taubert *et al*, 2006; Furtado *et al*, 2012). Lo cual también podría favorecer el paso del parásito a través de esta barrera y de otras como la placenta.

Se ha propuesto que *T. gondii* invade la placenta directamente a partir de la sangre materna (vía hematológica) y la atraviesa para llegar a los tejidos fetales, produciendo infección congénita (Carlier *et al*, 2012). Como se ha descrito, las mujeres embarazadas, como cualquier otro individuo inmunocompetente, producen una respuesta inmune que combate a los taquizoitos de *T. gondii*, mantiene controlada la infección y entonces, evitan problemas clínicos (Miller *et al*, 2009; Muñoz *et al*, 2011; Pifer y Yarovinsky, 2011). Sin embargo, como se describió, existen datos paradójicos acerca del papel que tienen algunas moléculas de la respuesta inmune Th1 (protectora de la infección) en la toxoplasmosis congénita. Entre estas moléculas se encuentran el IFN- γ , el ICAM-1, el MIF y los anticuerpos IgG1 humanos, que normalmente activan diversos mecanismos inmunológicos que facilitan la destrucción de los taquizoitos, pero que en modelos murinos se han asociado con transmisión

vertical o con patología fetal (Hammouda *et al*, 1995; Abou-Bacar *et al*, 2004a; 2004b; Barragan *et al*, 2005; Pfaff *et al*, 2007; Pfaff *et al*, 2008; Vieira-Ferro *et al*, 2008). Los parásitos llegan a la placenta, junto con la sangre materna, rodeados o entran en contacto con estas moléculas de la respuesta inmune materna; de éstas, las que nos interesaron son los anticuerpos IgG, específicamente los de la subclase IgG1, los cuales son mediadores principales de inmunidad humoral materna transferida a los hijos durante el embarazo, gracias a su unión al FcRn; por ello, esperábamos que protegieran en la toxoplasmosis congénita. Sin embargo, en un estudio previo encontramos mayor frecuencia de mujeres positivas a IgG1 anti-*T. gondii*, que transmitieron la infección durante el embarazo y que sus hijos presentaron problemas clínicos (Cañedo-Solares *et al*, 2008). Asimismo, en un trabajo que se está llevando a cabo en el laboratorio con mujeres embarazadas en fase aguda de la infección, los datos refrendan que hay asociación de daño neonatal con mayores niveles de IgG1 específica y en este caso hasta con transmisión vertical (manuscrito en preparación). Este fenómeno paradójico también ha sido observado por otros autores (De Souza *et al*, 2012; 2013).

Es interesante, además, que el aumento en la expresión del FcRn en la placenta, que lleva a cabo el transporte de la IgG materna al hijo, es paralelo al incremento en la tasa de transmisión vertical de *T. gondii*. Aunque estos resultados podrían deberse a otras causas, el recubrimiento de los taquizoitos por anticuerpos IgG1 podría favorecer, directa o indirectamente, su paso a través del sincitiotrofoblasto y de las células endoteliales de las vellosidades placentarias (tipos celulares donde se expresa el FcRn), de dos maneras no excluyentes: 1) indirectamente, debido a un efecto “concentrador” de los parásitos, ya que los taquizoitos recubiertos por IgG1 se unirían al FcRn expresado en el sincitiotrofoblasto y al estar cerca podrían invadir dicha barrera y atravesarla o 2) directamente, usando el mecanismo natural de transferencia de IgG materna a través del FcRn, en el cual los parásitos recubiertos de IgG1 entrarían de manera facilitada a los endosomas del sincitiotrofoblasto y de las células endoteliales, y de allí llegarían directamente a la sangre fetal, como se ha descrito para otros microorganismos como el citomegalovirus y el VIH-1 (Maidji *et al*, 2006; Gupta *et al*, 2013).

La presente tesis se diseñó con el fin de probar esta última hipótesis. Para ello, se realizaron ensayos *in vitro*, usando células endoteliales humanas que expresen el FcRn; los dos modelos más utilizados en la literatura son las HUVEC y las HMEC-1, de las cuales se conocen muchas de sus características, entre ellas, las moléculas que expresan; sin embargo, sólo en una publicación se había demostrado, por inmunohistoquímica, la presencia del FcRn en HUVEC de cortes transversales (Zhao *et al*, 2011). En cuanto a las HMEC-1, hasta donde buscamos, no se había demostrado que expresan el receptor, excepto, células transfectadas, las cuales expresan al FcRn en compartimentos positivos al antígeno-1 de endosomas tempranos (EEA-1) y no en lisosomas positivos a la glicoproteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP-1) (Ober *et al*, 2004). Dentro de los endosomas, el FcRn y el EEA-1 están distribuidos en subdominios discretos; sin embargo, su sublocalización dentro de estos compartimentos parece ser distinta. En una proporción alta de células transfectadas, identificaron una fuerte tinción perinuclear que co-localizó también con un marcador para Golgi (GM130). Esta distribución es similar a la expresión endógena en células endoteliales de placenta o de microvasculatura *in vivo* (Antohe *et al*, 2001; Borvak *et al*, 1998). En esta tesis se demostró que el FcRn es expresado por ambos tipos celulares de micro y de macrovasculatura humanas en compartimentos intracelulares, de naturaleza no probada, pero de localización congruente con endosomas o con Golgi. También se localizó la marca del FcRn en la superficie celular, co-localizando con el marcador de las endoteliales, el CD105. Sin embargo, en estos dos tipos celulares se desconoce si el receptor capta a la IgG y la recicla, participando así en la homeostasis de esta clase de anticuerpos en suero, como se lleva a cabo en las células endoteliales de los vasos de diversos tejidos, o bien si la puede transportar a través de las células, como lo hace en las células endoteliales de la placenta, o lleva a cabo ambos mecanismos (Antohe *et al*, 2001; Borvak *et al*, 1998). Este dato es importante en el presente estudio en relación con los resultados de la entrada de los taquizoitos de *T. gondii* sensibilizados con anticuerpos, pues sugieren que el Fc de la IgG1 podría estar interactuando con el FcRn en la superficie celular y mediar la entrada o facilitar la adhesión del parásito a la placenta, ayudando a su internalización o paso, con lo que ganaría acceso a los tejidos fetales.

Por otro lado, se planteó la pregunta de cómo puede invadir *T. gondii* a pesar de su recubrimiento con IgG1 humana. Esto puede tener varias posibilidades, una de ellas es que los parásitos están invadiendo activamente, ya sea con los anticuerpos pegados o no a su superficie. Otra posibilidad es que los parásitos recubiertos con IgG1 estén siendo reconocidos por alguna molécula de la membrana de la célula hospedera que le permita una internalización facilitada. En otro estudio los autores encontraron que sucede el fenómeno, de los parásitos opsonizados son internalizados en macrófagos y llevados a un fagosoma; sin embargo, *T. gondii* es capaz de formar su propia vacuola parasitófora a partir de la membrana del fagosoma, lo que se denominó como una vía intermedia entre la endocítica y la de penetración del parásito. Además, se demostró que esta vía es usada preferencialmente por cepas no virulentas, como la ME49 (Zhao *et al*, 2014). En nuestro laboratorio demostramos por microscopía electrónica que los parásitos opsonizados de la cepa RH dentro de las células HMEC-1 se encuentran viables y en mayor proporción en vacuolas parasitóforas, lo que indicaría un mayor índice de protección para el parásito por la IgG1 (Castañeda-Huitrón, 2017).

Se ha descrito que los polimorfismos del promotor de la cadena α del FcRn (VNTR1-5) en monocitos humanos influyen en el nivel de expresión de la proteína, siendo mayor para los monocitos de individuos homocigotos VNTR3/3 que para los monocitos de individuos VNTR2/3, y que además unen más IgG *in vitro* (Sachs *et al*, 2006). Sin embargo, se desconoce si estos polimorfismos tienen el mismo efecto en otros tipos celulares y en otras poblaciones de individuos, ya que estos experimentos se realizaron en células de individuos caucásicos. Más recientemente, en individuos de Francia y de Bélgica se ha descrito una asociación del genotipo del promotor del FcRn con la biodistribución en el organismo de anticuerpos monoclonales terapéuticos administrados para el tratamiento de algunas patologías: en pacientes franceses con cáncer colorrectal metastásico, los individuos homocigotos VNTR3/3 tenían menor distribución en el organismo del anticuerpo monoclonal administrado que los pacientes heterocigotos VNTR2/3 y VNTR3/4, sin que el genotipo afectara la eliminación de los anticuerpos (Passot *et al*, 2013). Asimismo, los pacientes de Bélgica con genotipo VNTR2/3 tenían concentraciones séricas menores de anticuerpos monoclonales para

el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal que aquellos homocigotos VNTR3/3 (Billiet *et al*, 2016). En resumen, éstas diferencias entre pacientes con diferentes genotipos del FcRn, podrían influir en la eficacia de los tratamientos administrados, ya que menores niveles de anticuerpos monoclonales distribuidos, debido a la presencia de un alelo VNTR2, influiría en la cantidad que cada tejido puede recibir, el tiempo de permanencia y por tanto, el efecto del anticuerpo terapéutico administrado. Como se ha indicado, son pocos los estudios en los que se han analizado las frecuencias de los VNTRs del promotor del FcRn en diferentes poblaciones del mundo, encontrando que el alelo VNTR3 es el más frecuente, desde 90.2% en población de Bélgica hasta 96.8% en población de Japón (Ishii-Watabe *et al*, 2010; Billiet *et al*, 2016). En la población mexicana no se conocía la frecuencia de los diferentes alelos; lo que encontramos en esta tesis y con esta población estudiada es que el VNTR3 también es el alelo más frecuente (97.1%) y al igual que en las otras poblaciones el VNTR2 fue el segundo en frecuencia (2.9%).

En los casos de mujeres con infección aguda por *T. gondii* y de sus bebés analizados, encontramos que todas las mamás que transmitieron verticalmente la infección eran positivas a anticuerpos IgG1, con variaciones para las otras clases y subclases de IgG específicos, lo que concuerda con lo reportado, que una de las primeras subclases que aparecen, como parte de la respuesta inmune adaptativa es la IgG1. Dentro de los binomios analizados, encontramos una mujer homocigota VNTR2/2, cuyo hijo adquirió la infección *in utero* y además presentó problemas clínicos graves, lo que llevó a pérdida neonatal a las 24 semanas de gestación. Esta mujer era positiva a anticuerpos IgA, IgM e IgG anti-*T. gondii*, y a las cuatro subclases de IgG, pero más a la subclase IgG1, ya que su índice de reactividad era muy alto comparado con las otras subclases. En este grupo de mujeres transmisoras encontramos otra mujer heterocigota VNTR2/3, que también transmitió la infección durante la gestación y su bebé nació con problemas clínicos graves. Esta mujer era positiva a IgM, IgG total y a las cuatro subclases de IgG. Llama la atención que en ambos casos las mujeres tengan al menos un alelo VNTR2 y sean positivas a IgG total y a sus subclases. El mecanismo podría estar relacionado con el papel diferencial del FcRn en la microvasculatura materna versus las vellosidades coriónicas: la mamá podría tener

menores niveles de IgG circulante, cómo se ha reportado en pacientes de Bélgica, a los que se les administraron anticuerpos monoclonales terapéuticos y en ellos encontraron menores niveles séricos para los individuos heterocigotos VNTR2/3 que para aquellos homocigotos VNTR3/3 (Billiet *et al*, 2016). Asimismo, en ratones knockout para el FcRn, se observó que presentan niveles séricos de IgG más bajos, ya que su catabolismo era 10 veces más rápido, que los ratones silvestres (Junghans y Anderson, 1996). Sin embargo, dado que el hijo del binomio 6 tenía un alelo VNTR3 expresaría mayores niveles de FcRn en la placenta y pasaría más IgG y si nuestra hipótesis es cierta, entonces, estaría pasando mayor número de parásitos recubiertos de anticuerpos específicos, con lo que se causaría más daño al bebé. Esto es apoyado por los datos de la frecuencia alélica del VNTR2, que entre mujeres transmisoras fue 7.7 veces mayor que la población general (22.2% vs. 2.9%). Lo que indicaría una relación entre la presencia del alelo VNTR2 y el paso de *T. gondii* a nivel de placenta.

La presencia de anticuerpos IgG maternos específicos en la sangre fetal podría, favorecer la invasión de los taquizoitos de *T. gondii*, adquiridos por transmisión vertical, al endotelio de diversos tejidos y órganos, incluido el cerebro fetal; lo que ocasionaría una infección más diseminada y por lo tanto más severa, lo cual explicaría la asociación entre la IgG1 materna y la severidad de la infección en los estudios previos (Cañedo-Solares *et al*, 2008). Adicionalmente, la IgG1 podría mediar daño tisular del bebé, por su relación con la generación de las anafilatoxinas C3a y C5a al fijar el Complemento, y por la exacerbación de la fagocitosis por macrófagos y por neutrófilos, que generan como productos secundarios TNF- α , radicales libres y un proceso inflamatorio más severo (Kuby, 2007). De hecho, se ha observado que si bien la respuesta Th1 (que induce la producción de anticuerpos IgG1 en humanos) es protectora al estimular la destrucción de los taquizoitos, puede ser dañina si no es regulada (Gazzinelli *et al*, 1996; Mordue *et al*, 2001).

No se ha demostrado que el polimorfismo del promotor del FcRn influya en el nivel de IgG unida y probablemente reciclada o transportada en células endoteliales. La presencia de cada una de las variantes alélicas del FcRn, y por ende, de sus niveles de expresión en las células endoteliales humanas de la placenta, podría explicar las

diferencias en los niveles de IgG materna que llega a los neonatos y su asociación con la entrada o el paso de *T. gondii*. Se requiere aumentar el número de binomios para lograr más claridad sobre esta la asociación entre los polimorfismos del promotor del FcRn y la transmisión de *T. gondii*.

CONCLUSIONES

1. Las cepas RH y ME49 de *T. gondii* presentan cinéticas de invasión diferentes en células endoteliales humanas de microvasculatura -HMEC-1- y de macrovasculatura -HUVEC-.
2. Los anticuerpos IgG1 humanos aumentan la entrada de los taquizoitos de ambas cepas a las células endoteliales de ambos tipos, lo cual podría explicar la relación entre estos anticuerpos en la madre y la transmisión vertical y el daño en los hijos.
3. Las HMEC-1, las HUVEC y las células endoteliales de vellosidades placentarias expresan el FcRn; las primeras muestran el mayor nivel de expresión y las dos últimas presentan variación interindividuo.
4. La frecuencia de los VNTRs del promotor de la cadena α del FcRn en esta población mexicana estudiada indica una alta proporción del alelo VNTR3 y en segundo lugar el VNTR2, lo cual es similar a lo reportado en otras partes del mundo.
5. La frecuencia del alelo VNTR2 del promotor de la cadena α del FcRn en el grupo de mujeres en fase aguda de infección por *Toxoplasma gondii*, que transmitieron la infección y que sus hijos tuvieron problemas clínicos graves fue 7.7 más alta que en población general.

PERSPECTIVAS

1. Realizar ensayos de invasión con células HMEC-1 y HUVEC, tratadas con RNA de interferencia del FcRn humano y con anticuerpos específicos, con taquizoitos de ambas cepas de *T. gondii* recubiertos con IgG humana.
2. Analizar el efecto de cada una de las subclases de IgG humana en la invasión de los taquizoitos de *T. gondii* en células HMEC-1 y HUVEC.
3. Transfectar células HMEC-1 con el promotor del gen de la cadena α del FcRn que contenga diferentes VNTRs y asociarlo con su nivel de expresión y con el paso de taquizoitos de *T. gondii* recubiertos con IgG humana.
4. Aumentar el número de binomios madre/hijo con infección por *T. gondii* en fase aguda y su relación con los polimorfismos del promotor del gen de la cadena α del FcRn.

REFERENCIAS

Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. 2003. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. J Infect Dis. **188**: 608-616.

Abou-Bacar A, Pfaff AW, Georges S, Letscher-Bru V, Filisetti D, Villard O, Antoni E, Klein JP, Candolfi E. 2004a. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. Infect Immun. **72**: 1397-1401.

Abou-Bacar A, Pfaff AW, Letscher-Bru V, Filisetti D, Rajapakse R, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E. 2004b. Role of gamma interferon and T cells in congenital *Toxoplasma* transmission. Parasite Immunol. **26**: 315-318.

Abrahamson DR, Powers A, Rodewald R. 1979. Intestinal absorption of immune complexes by neonatal rats: a route of antigen transfer from mother to young. Science. **206**: 567-569.

Abrahamson DR, Rodewald R. 1981. Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor-mediated transport of IgG across the newborn rat intestine. J Cell Biol. **91**: 270-280.

Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. J Invest Dermatol. **99**: 683-690.

Ahouse JJ, Hagerman CL, Mittal P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Simister NE. 1993. Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. J Immunol. **151**: 6076-6088.

Ajzenberg D. 2012. High burden of congenital toxoplasmosis in the United States: the strain hypothesis? Clin Infect Dis. **54**: 1606-1607.

Akilesh S, Petkova S, Sproule TJ, Shaffer DJ, Christianson GJ, Roopenian D. 2004. The MHC class I-like Fc receptor promotes humorally mediated autoimmune disease. J Clin Invest. **113**: 1328-1333.

Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. 2007. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J Immunol.* **179**: 4580-4588.

Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley PJ, Boothroyd JC. 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* **1**: e17.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* **5**: 266-271.

Alvarado-Esquivel C, Sifuentes-Alvarez A, Narro-Duarte SG, Estrada-Martínez S, Díaz-García JH, Liesenfeld O, Martínez-García SA, Canales-Molina A. 2006. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in a public hospital in northern Mexico. *BMC Infect Dis.* **6**: 113.

Alvarado-Esquivel C, Torres-Castorena A, Liesenfeld O, García-López CR, Estrada-Martínez S, Sifuentes-Alvarez A, Marsal-Hernández JF, Esquivel-Cruz R, Sandoval-Herrera F, Castañeda JA, Dubey JP. 2009. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in rural Durango, Mexico. *J Parasitol.* **95**: 271-274.

Alvarado-Esquivel C, Terrones-Saldívar Mdel C, Hernández-Tinoco J, Muñoz-Terrones MD, Gallegos-González RO, Sánchez-Anguiano LF, Reyes-Robles ME, Jaramillo-Juárez F, Liesenfeld O, Estrada-Martínez S. 2016. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in pregnant women in Aguascalientes City, Mexico: a cross-sectional study. *BMJ Open.* **6**: e012409.

Ambroise-Thomas P, Petersen E. 2000. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Edit. Springer-Verlag. 1a edición. Francia. 324 págs.

Angeloni MB, Silva NM, Castro AS, Gomes AO, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. 2009. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. *Placenta.* **30**: 785-791.

Angeloni MB, Guirelli PM, Franco PS, Barbosa BF, Gomes AO, Castro AS, Silva NM, Martins-Filho OA, Mineo TW, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. 2013. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent

strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. *Placenta*. **34**: 973-982.

Antohe F, Radulescu L, Gafencu A, Ghetie V, Simionescu M. 2001. Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum Immunol*. **62**: 93-105.

Arora N, Sadovsky Y, Dermody TS, Coyne CB. 2017. Microbial vertical transmission during human pregnancy. *Cell Host Microbe*. **21**: 561-567.

Bai Y, Ye L, Tesar DB, Song H, Zhao D, Björkman PJ, Roopenian DC, Zhu X. 2011. Intracellular neutralization of viral infection in polarized epithelial cells by neonatal Fc receptor (FcRn)-mediated IgG transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**: 18406-18411.

Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. 2014. The role of FcRn in antigen presentation. *Front Immunol*. **5**: 1-12.

Bangham DR, Hobbs KR, Tee DE. 1960. Transmission of serum proteins from foetus to mother in the rhesus monkey. In dwelling cannulation of foetus without interruption of pregnancy. *Lancet*. **2**: 1173-1174.

Barbosa BF, Silva DAO, Costa IN, Mineo JR, Ferro EAV. 2008. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. *Clin Exp Immunol*. **151**: 536-545.

Barragan A, Sibley LD. 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol*. **11**: 426-430.

Barragan A, Brossier F, Sibley LD. 2005. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol*. **7**: 561-568.

Barragan A, Hitziger N. 2008. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. *Subcell Biochem*. **47**: 198-207.

Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*. **2**: 481-485.

Baum J, Papenfuss AT, Baum B, Speed TP, Cowman AF. 2006. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Microbiol*. **4**: 621-628.

Benedetto N, Folgore A, Ferrara C, Moliterno M, Galdiero F. 1997. Effects of alpha-adrenergic agonists on *Toxoplasma gondii* replication in human umbilical vein endothelial cells. *Pathol Biol (Paris)*. **45**: 9-18.

Billiet T, Dreesen E, Cleynen I, Wollants WJ, Ferrante M, Van Assche G, Gils A, Vermeire S. 2016. A genetic variation in the neonatal Fc-receptor affects anti-TNF drug concentrations in Inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. **111**: 1438-1445.

Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. **64**: 607-623.

Blader IJ, Saeij JP. 2010. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*. **117**: 458-476.

Blaker RG. 1961. Laboratory maintenance of *Toxoplasma gondii*. *J Bacteriol*. **82**: 315-316.

Bollani L, Strocchio L, Stronati M. 2013. Congenital toxoplasmosis. *Early Hum Dev*. **89S4**: S70–S71.

Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. 1998. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol*. **28**: 3-9.

Borvak J, Richardson J, Medesan C, Antohe F, Radu C, Simionescu M, Ghetie V, Ward ES. 1998. Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int Immunol*. **10**: 1289-1298.

Bouïs D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH. 2001. Endothelium *in vitro*: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*. **4**: 91-102.

Brambell FW, Hemmings WA, Rowlands WT. 1947. Immunization of the mammalian embryo. *Lancet*. **2**: 759.

Brambell FW, Hemmings WA. 1949. The passage into the embryonic yolk-sac cavity of maternal plasma proteins in rabbits. *J Physiol*. **108**: 177-185.

Brambell FW, Hemmings WA, Henderson M, Rowlands WT. 1950. The selective admission of antibodies to the foetus by the yolk-sac splanchnopleur in rabbits. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. **137**: 239-252.

Brambell FW, Hemmings GP, Hemmings WA, Henderson M, Rowlands WT. 1951. The route by which antibodies enter the circulation after injection of immune serum into the exocoel of foetal rabbits. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **138**: 188-195.

Brambell FW, Brierley J, Halliday R, Hemmins WA. 1954. Transference of passive immunity from mother to young. *Lancet.* **266**: 964-965.

Brambell FW, Halliday R. 1956. The route by which passive immunity is transmitted from mother to foetus in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **145**: 170-178.

Brambell FW, Halliday R, Morris IG. 1958. Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **149**: 1-11.

Brambell FW, Hemmings WA, Oakley CL. 1959. The relative transmission of natural and pepsin-refined homologous antitoxin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **150**: 312-317.

Brambell FW, Hemmings WA, Oakley CL, Porter RR. 1960. The relative transmission of the fractions of papain hydrolyzed homologous gamma-globulin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **151**: 478-482.

Brambell RW. 1961. Problems concerning the transmission of immunity from mother to young. *Proc R Soc Med.* **54**: 992-993.

Brambell FW, Hemmings WA, Morris IG. 1964. A theoretical model of gamma-globulin catabolism. *Nature.* **203**: 1352-1354.

Brambell FW. 1966. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet.* **2**: 1087-1093.

Brambell FW. 1969. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. *Proc Nutr Soc.* **28**: 35-41.

Brenier-Pinchart MP, Blanc-Gonnet E, Marche PN, Berger F, Durand F, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. 2004. Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression *in vitro*. *Acta Neuropathol.* **107**: 245-249.

Brenier-Pinchart MP, Villena I, Mercier C, Durand F, Simon J, Cesbron-Delauw MF, Pelloux H. 2006. The *Toxoplasma* surface protein SAG1 triggers efficient *in vitro*

secretion of chemokine ligand 2 (CCL2) from human fibroblasts. *Microbes Infect.* **8**: 254-261.

Brenier-Pinchart MP, Bertini RL, Maubon D, Pelloux H. 2010. *In vitro* differential phenotypic characteristics among type-II *Toxoplasma gondii* strains from congenital toxoplasmosis in humans. *J Parasitol.* **96**: 798-799.

Bright NA, Ockleford CD, Anwar M. 1994. Ontogeny and distribution of Fc gamma receptors in the human placenta. Transport or immune surveillance? *J Anat.* **184**: 297-308.

Bright NA, Ockleford CD. 1995. Cytotrophoblast cells: A barrier to maternofetal transmission of passive Immunity? *J Histochem Cytochem.* **43**: 933-944.

Brossier F, Sibley LD. 2005. *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int J Biochem Cell Biol.* **37**: 2266-2272.

Bundhoo A, Paveglio S, Rafti E, Dhongade A, Blumberg RS, Matson AP. 2015. Evidence that FcRn mediates the transplacental passage of maternal IgE in the form of IgG anti-IgE/IgE immune complexes. *Clin Exp Allergy.* **45**: 1085-1098.

Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. 1994a. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature.* **372**: 336-343.

Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. 1994b. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature.* **372**: 379-383.

Burton GJ, Fowden AL. 2015. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **370**: 20140066.

Burton GJ, Jauniaux E. 2015. What is the placenta? *Am J Obstet Gynecol.* **213**: S6-8.

Bustos-Bahena ML. 2004. Seroprevalencia de infección por *Toxoplasma gondii* y factores de riesgo asociados en mujeres embarazadas de la ciudad de Jojutla, Morelos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.

Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pastén H, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Correa D. 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis

of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **106**: 653-659.

Caballero-Ortega H, Castillo-Cruz R, Murieta S, Ortiz-Alegría LB, Calderón-Segura E, Conde-Glez CJ, Cañedo-Solares I, Correa D. 2014. Diagnostic-test evaluation of immunoassays for anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in a random sample of Mexican population. *J Infect Dev Ctries.* **8**: 642-647.

Caffaro CE, Boothroyd JC. 2011. Evidence for host cells as the major contributor of lipids in the intravacuolar network of *Toxoplasma*-infected cells. *Eukaryot Cell.* **10**: 1095-1099.

Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez ML, Luna-Pastén H, Rodríguez Pérez R, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Figueroa-Damián R, Correa D. 2008. Human congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Ped Infect Dis J.* **27**: 469-474.

Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Figueroa-Damián R, Bustos-Bahena ML, González-Henkel H, Calderón-Segura E, Luna-Pastén H, Correa D. 2009. Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *J Perinatol.* **29**: 668-672.

Cañedo-Solares I, Calzada-Ruiz M, Ortiz-Alegría LB, Ortiz-Muñiz AR, Correa D. 2013. Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains. *Parasitol Res.* **112**: 3029-3033.

Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. 2012. Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop.* **121**: 55-70.

Carruthers VB. 1999. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int.* **48**: 1-10.

Carruthers V, Boothroyd JC. 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol.* **10**: 83-89.

Castañeda-Huitrón AL. 2017. Destino intracelular de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en células endoteliales y efecto de la sensibilización con anticuerpos específicos. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad de México, México. 68 págs.

Castro AS, Alves CM, Angeloni MB, Gomes AO, Barbosa BF, Franco PS, Silva DA, Martins-Filho OA, Mineo JR, Mineo TW, Ferro EA. 2013. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta*. **34**: 240-247.

Cervenak J, Bender B, Schneider Z, Magna M, Carstea BV, Liliom K, Erdei A, Bosze Z, Kacs Kovics I. 2011. Neonatal FcR overexpression boosts humoral immune response in transgenic mice. *J Immunol*. **186**: 959-968.

Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. 2004. Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? *Immunol Lett*. **92**: 207-214.

Chaouat G. 2007. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol*. **29**: 95-113.

Charron AJ, Sibley LD. 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. **115**: 3049-3059.

Chen P, Li C, Lang S, Zhu G, Reheman A, Spring CM, Freedman J, Ni H. 2010. Animal model of fetal and neonatal immune thrombocytopenia: role of neonatal Fc receptor in the pathogenesis and therapy. *Blood*. **116**: 3660-3668.

Cheung AL. 2007. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Curr Protoc Microbiol*. Appendix 4B.

Clark SL Jr. 1959. The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. *J Biophys Biochem Cytol*. **5**: 41-50.

Clough B, Frickel EM. 2017. The *Toxoplasma* parasitophorous vacuole: an evolving host-parasite frontier. *Trends Parasitol*. **33**: 473-488.

Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, Correa D. 2012. *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol Res*. **110**: 2089-2094.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women:

European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. **321**: 142-147.

Correa D, Coballase-Urrutia E, Cañedo-Solares I, Rico-Torres C. 2005. Toxoplasmosis. En: *Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas*. Flisser-Steinbruch A, Pérez-Tamayo R (eds.). Editores de Textos Mexicanos. 1a edición. México, D.F. Págs. 355-368.

Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Becerra-Torres E, Olmedo-Hernández M, Medina-Escutia ME, Murrieta S, Hernández-Islas JL. 2007a. Immunobiology of congenital toxoplasmosis. En: *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*. Terrazas LI (ed.). Edit. Research Signpost. 1a edición. Kerala, India. Págs. 199-224.

Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. 2007b. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol*. **29**: 651-660.

Correa D, Figueroa R. 2014. *Infecciones congénitas y perinatales. Una vision integral*. Edit. Médica Panamericana. 1a. edición. México. 211 págs.

Corvi MM, Berthiaume LG, De Napoli MG. 2011. Protein palmitoylation in protozoan parasites. *Front Biosci (Schol Ed)*. **3**: 1067-1079.

Cuéllar JA, Hernández A, Villegas E, Gómez JE. 2012. Efficiency of *in vitro* culture of *Toxoplasma gondii* in THP1 and Vero cell lines. *Biomedica*. **32**: 461-466.

Dahl M, Djurusic S, Hviid TV. 2014. The many faces of human leukocyte antigen-G: relevance to the fate of pregnancy. *J Immunol Res*. **2014**: 591489.

Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, Wu H, Kiener PA, Langermann S. 2002. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *J Immunol*. **169**: 5171-5180.

Dancis J, Shafran M. 1958. The origin of plasma proteins in the guinea pig fetus. *J Clin Invest*. **37**: 1093-1099.

Dardé ML. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. **40**: 57-63.

Däubener W, Pilz K, Seghrouchni-Zennati S, Bilzer T, Fischer HG, Hadding U. 1993. Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon γ . *J Neuroimmunol.* **43**: 31-38.

De Souza-E-Silva CH, Andrade GQ, Januário JN, Carneiro M, Vasconcelos Santos DV, Vitor RW. 2012. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **107**: 342-347.

De Souza-E-Silva CH, Vasconcelos-Santos DV, De Andrade GQ, Carellos EVM, De Castro Romanelli RM, De Resende LM, Januário JN, Carneiro M, De Aguiar Vasconcelos Carneiro A., De Almeida Vitor RW. 2013. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. *Ped Infect Dis J.* **32**: 13-16.

Deckert-Schlüter M, Schlüter D, Hof H, Wiestler OD, Lassmann H. 1994. Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* **53**: 457-468.

Denkers EY, Gazzinelli RT. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.* **11**: 569-588.

de Oliveira-Gomes A, de Oliveira-Silva DA, Silva NM, de Freitas-Barbosa B, Franco PS, Angeloni MB, Fermino ML, Roque-Barreira MC, Bechi N, Paulesu LR, Dos Santos MC, Mineo JR, Ferro EA. 2011. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. *Am J Pathol.* **178**: 2792-2801.

Dlugońska H. 2014. *Toxoplasma gondii* and the host cells. *Ann Parasitol.* **60**: 83-88.

Dubey JP. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* **28**: 1019-1024.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* **11**: 267-299.

Dubey JP. 2008. The history of *Toxoplasma gondii*-The first 100 years. J Eukaryot Microbiol. **55**: 467-475.

Dubey JP. 2010. Toxoplasmosis of animals and humans. Edit. CRC. 2a edición. Estados Unidos. 317 págs.

Dubremetz JF. 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. Cell Microbiol. **9**: 841-848.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. FASEB J. **17**: 984-992.

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. Lancet. **353**: 1829-1833.

Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Semin Immunopathol. **34**: 793-813.

Erbe DV, Pfefferkorn ER, Fanger MW. 1991. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. J Immunol. **146**: 3145-3151.

Erlebacher A. 2013. Immunology of the maternal-fetal interface. Annu Rev Immunol. **31**: 387-411.

Espinosa de los Reyes V. 1965. Toxoplasmosis humana. Ginecol Obstet Mex. **20**: 749-759.

Estran C, Brenier-Pinchart MP, Pelletier L, Cesbron-Delauw MF, Pelloux H. 2006. *Toxoplasma gondii* in human astrocytes *in vitro*: interleukin (IL)-12 and IL-10 do not influence cystogenesis. J Parasitol. **92**: 1108-1110.

Fadull CE, Channon JY, Kasper LH. 1995. Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. Infect Immun. **63**: 4290-4294.

Famulener. 1912. On the transmission of immunity from mother to offspring: A study upon serum hemolysins in goats. J Infect Dis. **10**: 332-368.

Faulk WP, Jeannet M, Creighton WD, Carbonara A. 1974. Immunological studies of the human placenta. Characterization of immunoglobulins on trophoblastic basement membranes. J Clin Invest. **54**: 1011-1009.

Faulk WP, Johnson PM. 1977. Immunological studies of human placentae: identification and distribution of proteins in mature chorionic villi. *Clin Exp Immunol.* **27**: 365-375.

Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M. 2000. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* **275**: 11058-11063.

Ferguson DJ. 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**: 133-148.

Ferro EA, Silva DA, Bevilacqua E, Mineo JR. 2002. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. *Infect Immun.* **70**: 7089-7094.

Filisetti D, Candolfi E. 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* **40**: 71-80.

Firan M, Bawdon R, Radu C, Ober RJ, Eaken D, Antohe F, Ghetie V, Ward ES. 2001. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of γ -globulin in humans. *Internal Immunol.* **13**: 993-1002.

Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. 2008. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin Vaccine Immunol.* **15**: 138-146.

Freiberger T, Ravcuková B, Grodecká L, Kurecová B, Jarkovský J, Bartonková D, Thon V, Litzman J. 2010a. No association of FCRN promoter VNTR polymorphism with the rate of maternal-fetal IgG transfer. *J Reprod Immunol.* **85**: 193-197.

Freiberger T, Grodecká L, Ravcuková B, Kurecová B, Postránecká V, Vlcek J, Jarkovský J, Thon V, Litzman J. 2010b. Association of FcRn expression with lung abnormalities and IVIG catabolism in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol.* **136**: 419-425.

Furtado JM, Smith JR, Belfort R Jr, Gattey D, Winthrop KL. 2011. Toxoplasmosis: a global threat. *J Glob Infect Dis.* **3**: 281-284.

Furtado JM, Bharadwaj AS, Ashander LM, Olivas A, Smith JR. 2012. Migration of *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells across human retinal vascular endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **53**: 6856-6862.

Gafencu A, Heltianu C, Burlacu A, Hunziker W, Simionescu M. 2003. Investigation of IgG receptors expressed on the surface of human placental endothelial cells. *Placenta.* **24**: 664-676.

Galván-Ramírez ML, Soto-Mancilla JL, Velasco-Castrejón O, Pérez-Medina R. 1995. Incidence of anti-Toxoplasma antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. *Rev Soc Bras Med Trop.* **28**: 333-337.

Gaynor LM, Colucci F. 2017. Uterine Natural Killer cells: functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Front Immunol.* **8**: 467.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A. 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol.* **157**: 798-805.

Gendrin C, Mercier C, Braun L, Musset K, Dubremetz JF, Cesbron-Delauw MF. 2008. *Toxoplasma gondii* uses unusual sorting mechanisms to deliver transmembrane proteins into the host-cell vacuole. *Traffic.* **9**: 1665-1680.

Ghaebi M, Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Jadidi-Niaragh F, Ahmadi M, Yousefi M. 2017. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomed Pharmacother.* **88**: 61-73.

Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen MF, Lee Y, Ward ES. 1996. Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur J Immunol.* **26**: 690-696.

Ghetie V, Ward ES. 1997. FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. *Immunol Today.* **18**: 592-598.

Girardi G, Bulla R, Salmon JE, Tedesco F. 2006. The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol Immunol.* **43**: 68-77.

Givens MD, Marley MS. 2008. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology.* **70**: 270-285.

Gonçalves R, Vieira ER, Melo MN, Gollob KJ, Mosser DM, Tafuri WL. 2005. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infect Dis.* **5**: 39.

Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M. 2014. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta.* **35**: S93-99.

Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res.* **114**: 397-407.

Gunraj CA, Fernandes BJ, Denomme GA. 2002. Synonymous nucleotide substitutions in the neonatal Fc receptor. *Immunogenetics.* **54**: 139-140.

Gupta S, Gach JS, Becerra JC, Phan TB, Pudney J, Moldoveanu Z, Joseph SB, Landucci G, Supnet MJ, Ping LH, Corti D, Moldt B, Hel Z, Lanzavecchia A, Ruprecht RM, Burton DR, Mestecky J, Anderson DJ, Forthal DN. 2013. The neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS Pathog.* **9**: e1003776.

Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. 2017. Toxoplasma effectors targeting host signaling and transcription. *Clin Microbiol Rev.* **30**: 615-645.

Halliday R. 1955. The absorption of antibodies from immune sera by the gut of the young rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **143**: 408-413.

Halliday R. 1958. The absorption of antibody from immune sera and from mixtures of sera by the gut of the young rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **148**: 92-103.

Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. 1996. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol.* **55**: 1150-1156.

Hammouda NA, Abo el-Naga I, Hussein ED, Rashwan EA. 1995. Opsonization and intracellular killing of *Toxoplasma gondii* by human mononuclear phagocytes. *J Egypt Soc Parasitol.* **25**: 11-17.

Hampton MM. 2015. Congenital toxoplasmosis: A review. *Neonatal Netw.* **34**: 274-278.

Harris LK. 2010. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta.* **31** Suppl: S93-98.

Henderson LA, Baynes JW, Thorpe SR. 1982. Identification of the sites of IgG catabolism in the rat. *Arch Biochem Biophys.* **215**: 1-11.

Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH, Thomasson D, Wright EA, Williams RH, Murphy RG, Smith JE. 2009. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. **136**: 1877-1885.

Khan A, Grigg ME. 2017. *Toxoplasma gondii*: Laboratory maintenance and growth. *Curr Protoc Microbiol*. **44**: 20C.1.1-20C.1.17.

Huber AH, Kelley RF, Gastinel LN, Bjorkman PJ. 1993. Crystallization and stoichiometry of binding of a complex between a rat intestinal Fc receptor and Fc. *J Mol Biol*. **230**: 1077-1083.

Hunt JS, McIntire RH, Petroff MG. 2006. Immunobiology of human pregnancy. En: Jimmy D. Neill (ed). *Knobil and neill's physiology of reproduction*. Edit. Elsevier. 3a. edición. Págs. 2759-2785.

Hunt JS, Langat DL. 2009. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. *Curr Opin Pharmacol*. **9**: 462-469.

Huppertz B, Ghosh D, Sengupta J. 2014. An integrative view on the physiology of human early placental villi. *Prog Biophys Mol Biol*. **114**: 33-48.

Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. 1989. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol*. **27**: 2031-2038.

Huynh MH, Carruthers VB. 2006. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog*. **2**: e84.

Ishii-Watabe A, Saito Y, Suzuki T, Tada M, Ukaji M, Maekawa K, Kurose K, Kaniwa N, Sawada J, Kawasaki N, Yamaguchi T, Nakajima TE, Kato K, Yamada Y, Shimada Y, Yoshida T, Ura T, Saito M, Muro K, Doi T, Fuse N, Yoshino T, Ohtsu A, Saijo N, Hamaguchi T, Okuda H, Matsumura Y. 2010. Genetic polymorphisms of FCGRT encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab Pharmacokinet*. **25**: 578-587.

Ishikawa T, Takizawa T, Iwaki J, Mishima T, Ui-Tei K, Takeshita T, Matsubara S, Takizawa T. 2015. Fc gamma receptor IIb participates in maternal IgG trafficking of human placental endothelial cells. *Int J Mol Med*. **35**: 1273-1289.

Israel EJ, Simister N, Freiberg E, Caplan A, Walker WA. 1993. Immunoglobulin G binding sites on the human foetal intestine: a possible mechanism for the passive transfer of immunity from mother to infant. *Immunology*. **79**: 77-81.

Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D, Simister NE. 1996. Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology*. **89**: 573-578.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. **52**: 2745-2756.

James JL, Carter AM, Chamley LW. 2012a. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta*. **33**: 327-334.

James JL, Carter AM, Chamley LW. 2012b. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part II: Tools to model the crucial first days. *Placenta*. **33**: 335-342.

Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. 2006. Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis*. **12**: 1638-1643.

Jasso-Gutiérrez L. 2006. Infecciones congénitas poco habituales de transmisión vertical. *Bol Med Hosp Infant Mex*. **63**: 55-63.

Jiang L, Wang J, Solorzano-Vargas RS, Tsai HV, Gutierrez EM, Ontiveros LO, Kiela PR, Wu SV, Martín MG. 2004. Characterization of the rat intestinal Fc receptor (FcRn) promoter: transcriptional regulation of FcRn gene by the Sp family of transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **286**: G922-931.

Johnson PM, Trenchev P, Faulk WP. 1973. Immunological studies of human placentae. Binding of complexed immunoglobulin by stromal endothelial cells. *Clin Exp Immunol*. **22**: 133-138.

Johnson PM, Faulk WP, Wang AC. 1976. Immunological studies of human placentae: subclass and fragment specificity of binding of aggregated IgG by placental endothelial cells. *Immunology*. **31**: 659-664.

Johnson PM, Natvig JB, Ystehede UA, Faulk WP. 1977. Immunological studies of human placentae: the distribution and character of immunoglobulins in chorionic villi. *Clin Exp Immunol.* **30**: 145-153.

Johnson PM, Faulk WP. 1978. Immunological studies of human placentae: identification and distribution of proteins in immature chorionic villi. *Immunology.* **34**: 1027-1035.

Jones EA, Waldmann TA. 1972. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J Clin Invest.* **51**: 2916-2927.

Juliano PB, Blotta MH, Altemani AM. 2006. ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. *Placenta.* **27**: 750-757.

Jung C, Lee CY, Grigg ME. 2004. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int J Parasitol.* **34**: 285-296.

Junghans RP, Anderson CL. 1996. The protection receptor for IgG catabolism is the b2 microglobulin-containing intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 5512-5516.

Junghans RP. 1997. Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol Res.* **16**: 29-57.

Kafsack BF, Carruthers VB, Pineda FJ. 2007. Kinetic modeling of *Toxoplasma gondii* invasion. *J Theor Biol.* **249**: 817-825.

Kandil E, Noguchi M, Ishibashi T, Kasahara M. 1995. Structural and phylogenetic analysis of the MHC class I-like Fc receptor gene. *J Immunol.* **154**: 5907-5918.

Kandil E, Egashira M, Miyoshi O, Niikawa N, Ishibashi T, Kasahara M. 1996. The human gene encoding the heavy chain of the major histocompatibility complex class I-like Fc receptor (FCGRT) maps to 19q13.3. *Cytogenet Cell Genet.* **73**: 97-98.

Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D. 2004. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol.* **34**: 401-409.

Kaufmann P, Castelluci M. 1997. Extravillous trophoblast in the human placenta. *Trophoblast Res.* **10**: 21-65.

Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A. 1999. Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* **84**: 2188-2194.

Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES. 1994. Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur J Immunol.* **24**: 542-548.

Kim JK, Firan M, Radu CG, Kim CH, Ghetie V, Ward ES. 1999. Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn. *Eur J Immunol.* **29**: 2819-2825.

Kim J, Mohanty S, Ganesan LP, Hua K, Jarjoura D, Hayton WL, Robinson JM, Anderson CL. 2009. FcRn in the yolk sac endoderm of mouse is required for IgG transport to fetus. *J Immunol.* **182**: 2583-2589.

King A, Loke YW. 1999. The influence of the maternal uterine immune response on placentation in human subjects. *Proc Nutr Soc.* **58**: 69-73.

Krause RM. 1999. Paul Ehrlich and O.T. Avery: pathfinders in the search for immunity. *Vaccine.* **17** Suppl 3: S64-67.

Kristoffersen EK, Ulvestad E, Vedeler CA, Matre R. 1990. Fc gamma receptor heterogeneity in the human placenta. *Scand J Immunol.* **32**: 561-564.

Kristoffersen EK, Matre R. 1996. Co-localization of the neonatal Fc gamma receptor and IgG in human placental term syncytiotrophoblasts. *Eur J Immunol.* **26**: 1668-1671.

Kuby J. 2007. *Immunology*. Edit. W.H. Freeman. 6a. edición. New York, EUA. 553 págs.

Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O. 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol.* **232**: 119-130.

Laliberté J, Carruthers VB. 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* **65**: 1900-1915.

Lambert H, Barragan A. 2010. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* **12**: 292-300.

Larrivéé B, Karsan A. 2005. Isolation and culture of primary endothelial cells. En: *Methods in Molecular Biology: Basic Cell Culture Protocols*. Helgason CD y Miller CI (eds.). Edit. Humana Press Inc. 3a edición. NJ, EUA. 365 págs.

Lavine MD, Arrizabalaga G. 2009. Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. *Mol Biochem Parasitol*. **164**: 95-99.

Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. 1996. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol*. **157**: 3317-3322.

Li G, Huang W, Xia Q, Yang K, Liu R, Zhu H, Jiang W. 2008. Role of uterine natural killer cells in angiogenesis of human decidua of the first-trimester pregnancy. *Sci China C Life Sci*. **51**: 111-119.

Li Z, Palaniyandi S, Zeng R, Tuo W, Roopenian DC, Zhu X. 2011. Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**: 4388-4393.

Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML. 1999. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol*. **7**: 239-246.

Linden CD, Roth TF. 1978. IgG receptors on foetal chick yolk sac. *J Cell Sci*. **33**: 317-328.

Liu X, Ye L, Christianson GJ, Yang JQ, Roopenian DC, Zhu X. 2007. NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. *J Immunol*. **179**: 2999-3011.

Liu X, Ye L, Bai Y, Mojidi H, Simister NE, Zhu X. 2008. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *J Immunol*. **181**: 449-463.

Lopes FM, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. 2007. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Braz J Infect Dis*. **11**: 496-506.

Lourido S, Tang K, Sibley LD. 2012. Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion. *EMBO J*. **31**: 4524-4534.

Madrid L, Varo R, Siteo A, Bassat Q. 2016. Congenital and perinatally-acquired infections in resource-constrained settings. *Expert Rev Anti Infect Ther*. **14**: 845-861.

Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. 2006. Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am J Pathol*. **168**: 1210-1226.

Malek A. 2003. *Ex vivo* human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine*. **21**: 3362-3364.

Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. 2010. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest*. **120**: 1016-1025.

Martín MG, Wu SV, Walsh JH. 1993. Hormonal control of intestinal Fc receptor gene expression and immunoglobulin transport in suckling rats. *J Clin Invest*. **91**: 2844-2849.

Martin AM, Liu T, Lynn BC, Sinai AP. 2007. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol*. **54**: 25-28.

Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. 2009. Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)? *Clin Dev Immunol*. **2009**: 374696.

Matre R. 1977. Similarities of Fc γ receptors on trophoblasts and placental endothelial cells. *Scand J Immunol*. **6**: 953-958.

Matre R, Haugen A. 1978. The placental Fc γ receptors studied using immune complexes of peroxidase. *Scand J Immunol*. **8**: 187-193.

McClure EM, Goldenberg RL. 2009. Infection and stillbirth. *Semin Fetal Neonatal Med*. **14**: 182-189.

McClure EM, Dudley DJ, Reddy UM, Goldenberg RL. 2010. Infectious causes of stillbirth: a clinical perspective. *Clin Obstet Gynecol*. **53**: 635-645.

Mcfarlane AS. 1957. The behavior of I 131-labeled plasma proteins *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci*. **70**: 19-25.

McGirr JL. 1947. Colostral transmission of antibody substances from mother to offspring; a review. *Br Vet J.* **103**: 345-356.

McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. 2009. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**: 320-344.

McLeod R, Boyer KM, Lee D, Mui E, Wroblewski K, Karrison T, Noble AG, Withers S, Swisher CN, Heydemann PT, Sautter M, Babiarz J, Rabiah P, Meier P, Grigg ME; Toxoplasmosis Study Group. 2012. Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clin Infect Dis.* **54**: 1595-1605.

Mercier C, Cesbron-Delauw MF. 2015. Toxoplasma secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol.* **31**: 60-71.

Mikulska JE, Pablo L, Canel J, Simister NE. 2000. Cloning and analysis of the gene encoding the human neonatal Fc receptor. *Eur J Immunogenet.* **27**: 231-240.

Mikulska JE, Simister NE. 2000. Analysis of the promoter region of the human FcRn gene. *Biochim Biophys Acta.* **1492**: 180-184.

Mikulska JE. 2015. Analysis of response elements involved in the regulation of the human neonatal Fc receptor gene (FCGRT). *PLoS One.* **10**: e0135141.

Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* **39**: 23-39.

Moffett-King A, Entrican G, Ellis S, Hutchinson J, Bainbridge D. 2002. Natural killer cells and reproduction. *Trends Immunol.* **23**: 332-333.

Mohanty S, Kim J, Ganesan LP, Phillips GS, Hua K, Jarjoura D, Hayton WL, Robinson JM, Anderson CL. 2010. IgG is transported across the mouse yolk sac independently of FcγRIIb. *J Reprod Immunol.* **84**: 133-144.

Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* **363**: 1965-1976.

Mor G, Cardenas I. 2010. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol.* **63**: 425-33.

Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med.* **190**: 1783-1792.

Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol.* **167**: 4574-4584.

Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci.* **108**: 2457-2464.

Morris B, Morris R. 1974. The absorption of 125I-labelled immunoglobulin G by different regions of the gut in young rats. *J Physiol.* **241**: 761-770.

Mota CM, Ferreira MD, Costa LF, Barros PS, Silva MV, Santiago FM, Mineo JR, Mineo TW. 2014. Fluorescent ester dye-based assays for the *in vitro* measurement of *Neospora caninum* proliferation. *Vet Parasitol.* **205**: 14-19.

Muñoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. 2011. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev.* **240**: 269-285.

Nagineeni CN, Detrick B, Hooks JJ. 2000. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun.* **68**: 407-410.

Nakata K, Kobayashi K, Ishikawa Y, Yamamoto M, Funada Y, Kotani Y, Blumberg RS, Karasuyama H, Yoshida M, Nishimura Y. 2010. The transfer of maternal antigen-specific IgG regulates the development of allergic airway inflammation early in life in an FcRn-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* **395**: 238-243.

Nam HW. 2009. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol.* **47** Suppl: S29-37.

Nelson JB. 1932. The maternal transmission of vaccinal immunity in swine. *J Exp Med.* **56**: 835-840.

Neyer LE, Grüng G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* **65**: 1675-1682.

Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES. 2001. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol.* **13**: 1551-1559.

Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Ward ES. 2004. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J Immunol.* **172**: 2021-2029.

Olguín JE, Fernández J, Salinas N, Juárez I, Rodriguez-Sosa M, Campuzano J, Castellanos C, Saavedra R. 2015. Adoptive transfer of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells to C57BL/6J mice during acute infection with *Toxoplasma gondii* down modulates the exacerbated Th1 immune response. *Microbes Infect.* **17**: 586-595.

Oliveira JG, Silva NM, Santos AA, Souza MA, Ferreira GL, Mineo JR, Ferro EA. 2006. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. *Placenta.* **27**: 691-698.

Opitz C, Soldati D. 2002. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* **45**: 597-604.

Ortiz-Alegría LB. 2004. Validación de técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F., México. 87 págs.

Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, Correa D. 2010. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun.* **11**: 363-373.

Ortiz-Alegría LB, Cérbulo-Vázquez A, Cañedo-Solares I, González-Jiménez MA, Vargas-Villavicencio JA, Calzada-Ruiz M, Besné-Mérida A, Correa-Beltrán MD. 2014. Inmunobiología del embarazo y respuesta inmune del neonato. En: Correa y Figueroa (eds.). *Infecciones congénitas y perinatales. Una vision integral.* Edit. Médica Panamericana. 1a. edición. México. Págs. 3-9.

Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. 2012. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Develop Immunol.* **2012**: 985646.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* **39**: 1385-1394.

Passot C, Azzopardi N, Renault S, Baroukh N, Arnoult C, Ohresser M, Boisdron-Celle M, Gamelin E, Watier H, Paintaud G, Gouilleux-Gruart V. 2013. Influence of FCGRT gene polymorphisms on pharmacokinetics of therapeutic antibodies. *MAbs*. **5**: 614-619.

Paveglio S, Puddington L, Rafti E, Matson AP. 2012. FcRn-mediated intestinal absorption of IgG anti-IgE/IgE immune complexes in mice. *Clin Exp Allergy*. **42**: 1791-1800.

Pazos M, Sperling RS, Moran TM, Kraus TA. 2012. The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunol Res*. **54**: 254-261.

Pelloux H, Ricard J, Nissoufl MF, Renversez JC, Vuillez JP, Meunier A, Ambroise-Thomas P. 1994. Infection with *Toxoplasma gondii* does not alter TNF- α and IL-6 secretion by a human astrocytoma cell line. *Mediators of Inflammation*. **3**: 291-295.

Pelloux H, Pernod G, Polack B, Coursange E, Ricard J, Verna JM, Ambroise-Thomas P. 1996. Influence of cytokines on *Toxoplasma gondii* growth in human astrocytoma-derived cells. *Parasitol Res*. **82**: 598-603.

Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Tabata T. 2005. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol*. **13**: 164-174.

Perez-Montoyo H, Vaccaro C, Hafner M, Ober RJ, Mueller W, Ward ES. 2009. Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**: 2788-2793.

Petersen E. 2007. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. **12**: 214-223.
Peterson PK, Gekker G, Hu S, Chao CC. 1995. Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Infect Dis*. **171**: 516-518.

Pfaff AW, Georges S, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Klein JP, Mousli M, Candolfi E. 2005a. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. *Immunol Cell Biol*. **83**: 483-489.

Pfaff AW, Villard O, Klein JP, Mousli M, Candolfi E. 2005b. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. *Int J Parasitol*. **35**: 1569-1576.

Pfaff AW, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M, Candolfi E. 2007. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology*. **134**: 1895-1902.

Pfaff AW, Mousli M, S negas A, Marcellin L, Takikawa O, Klein JP, Candolfi E. 2008. Impact of foetus and mother on IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase expression in murine placenta following *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol*. **38**: 249-258.

Pifer R, Yarovinsky F. 2011. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol*. **27**: 388-393.

Pleass RJ, Woof JM. 2001. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol*. **17**: 545-551.

Popov S, Hubbard JG, Kim J, Ober B, Ghetie V, Ward ES. 1996. The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. *Mol Immunol*. **33**: 521-530.

Pyzik M, Rath T, Lencer WI, Baker K, Blumberg RS. 2015. FcRn: The architect behind the immune and nonimmune functions of IgG and albumin. *J Immunol*. **194**: 4595-4603.

Qiao SW, Lencer WI, Blumberg RS. 2006. How the controller is controlled - neonatal Fc receptor expression and immunoglobulin G homeostasis. *Immunology*. **120**: 145-147.

Qiao SW, Kobayashi K, Johansen FE, Sollid LM, Andersen JT, Milford E, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**: 9337-9342.

Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Silasi M, Mor G. 2014. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. **72**: 107-116.

Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, White MW. 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. **115**: 165-175.

Radulescu L, Antohe F, Jinga V, Guetie V, Simionescu M. 2004. Neonatal Fc receptor discriminates and monitors the pathway of native and modified immunoglobulin G in placental endothelial cells. *Human Immunol*. **65**: 578-585.

Raghavan M, Chen MY, Gastinel LN, Bjorkman PJ. 1994. Investigation of the interaction between the class I MHC-related Fc receptor and its immunoglobulin G ligand. *Immunity*. **1**: 303-315.

Raghavan M, Wang Y, Bjorkman PJ. 1995. Effects of receptor dimerization on the interaction between the class I major histocompatibility complex-related Fc receptor and IgG. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 11200-11204.

Regal JF, Gilbert JS, Burwick RM. 2015. The complement system and adverse pregnancy outcomes. *Mol Immunol*. **67**: 56-70.

Rico-Torres CP, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. 2016. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **35**: 1079-1088.

Rimington C, Bickford JA. 1947. Pre- and post-natal development of immunity; serum-albumin and serum-globulin levels in maternal and cord bloods of premature infants. *Lancet*. **1**: 78-75.

Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC, Bakardjiev AI. 2012. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. **80**: 418-428.

Roberts DM, Guentert M, Rodewald R. 1990. Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat. *J Cell Biol*. **111**: 1867-1876.

Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. 1996. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. **64**: 897-904.

Roch E, Bravo-Becherelle MA. 1962. Incidencia de toxoplasmosis congénita en una muestra de 2186 nacidos vivos en la ciudad de México. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. **22**: 31-49.

Roch E, Varela G. 1966. Various aspects of the investigation on toxoplasmosis in Mexico. Results obtained in 29,883 Sabin and Feldman reactions carried out from 1953 to 1965. *Rev Invest Salud Publica*. **26**: 31-49.

Rodewald R. 1970. Selective antibody transport in the proximal small intestine of the neonatal rat. *J Cell Biol*. **45**: 635-640.

Rodewald R. 1980. Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat. *J Cell Biol.* **85**: 18-32.

Rodewald R, Kraehenbuhl JP. 1984. Receptor-mediated transport of IgG. *J Cell Biol.* **99**: 159s-164s.

Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, Dumon H, Peyron F, Thulliez P, Picot S. 2004. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol.* **190**: 797-802.

Roopenian DC, Akilesh S. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Rev.* **8**: 715-725.

Rougier S, Montoya JG, Peyron F. 2017. Lifelong persistence of *Toxoplasma* cysts: A questionable dogma? *Trends Parasitol.* **33**: 93-101.

Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A, Rahmah N. 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop Biomed.* **27**: 125-130.

Sachs UJH, Socher I, Braeunlich CG, Kroll H, Bein G, Santoso S. 2006. Variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor α -chain promoter. *Immunology.* **119**: 83-89.

Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* **21**: 476-481.

Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. 1999. Dynamics of immunoglobulins at the feto–maternal interface. *Rev Reprod.* **4**: 81-89.

Sakuma Y, Baba R, Arita K, Morimoto H, Fujita M. 2014. Food allergens are transferred intact across the rat blood-placental barrier *in vivo*. *Med Mol Morphol.* **47**: 14-20.

Sanfelice RA, da Silva SS, Bosqui LR, Miranda-Sapla MM, Barbosa BF, Silva RJ, Ferro EA, Panagio LA, Navarro IT, Bordignon J, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, Almeida RS, Costa IN. 2017. Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. *Acta Trop.* **167**: 208-215.

Sappenfield E, Jamieson DJ, Kourtis AP. 2013. Pregnancy and susceptibility to infectious diseases. *Infect Dis Obstet Gynecol.* **2013**: 752852.

Schechtman AM, Abraham KC. 1958. Passage of serum albumins from the mother to the foetus. *Nature.* **181**: 120-121.

Schneider H. 1991. The role of the placenta in nutrition of the human fetus. *Am J Obstet Gynecol.* **164**: 967-973.

Schröder H. 1992. Classics revisited: Joseph Needham: 'Chemical Embryology'--Cambridge 1931. *Placenta.* **13**: 91-94.

Senegas A, Villard O, Neuville A, Marcellin L, Pfaff AW, Steinmetz T, Mousli M, Klein JP, Candolfi E. 2009. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon-gamma-induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofetal interface. *Int J Parasitol.* **39**: 481-487.

Shaw MK, Roos DS, Tilney LG. 2001. DNA replication and daughter cell budding are not tightly linked in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* **3**: 351-362.

Sibley LD. 1993. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. *Semin Cell Biol.* **4**: 335-344.

Sibley LD, Mordue D, Howe DK. 1999. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. *Immunobiology.* **201**: 210-224.

Sibley CP. 2009. Understanding placental nutrient transfer--why bother? New biomarkers of fetal growth. *J Physiol.* **587**: 3431-3440.

Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **364**: 2749-2761.

Sibley LD. 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev.* **240**: 72-91.

Simister NE, Rees AR. 1985. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol.* **15**: 733-738.

Simister NE, Mostov KE. 1989. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature.* **337**: 184-187.

Simister NE. 1993. IgG Fc receptors that resemble class I major histocompatibility complex antigens. *Biochem Soc Trans.* **21**: 973-976.

Simister NE, Story CM, Chen HL, Hunt JS. 1996. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol.* **26**: 1527-1531.

Simister NE, Story CM. 1997. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol.* **37**: 1-23.

Sinai AP. 2008. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem.* **47**: 155-164.

Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG. 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res.* **107**: 253-260.

Smith T. 1905. Degrees of susceptibility to diphtheria toxin among by guinea-pigs. Transmission from parents to offspring. *J Med Res.* **13**: 341-348.

Smith T. 1907. The degree and duration of passive immunity to diphtheria toxin transmitted by immunized female guinea-pigs to their immediate offspring. *J Med Res.* **16**: 359-379.

Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* **31**: 1293-1302.

Speer CA, Dubey JP. 2005. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol.* **35**: 193-206.

Spinillo A, Iacobone AD, Calvino IG, Alberi I, Gardella B. 2014. The role of the placenta in feto-neonatal infections. *Early Hum Dev.* **90** Suppl 1: S7-9.

Staun-Ram E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* **3**: 56-68.

Story CM, Mikulska JE, Simister NE. 1994. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J Exp Med.* **180**: 2377-2381.

Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii*

isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc Natl Acad Sci USA. **109**: 5844-5849.

Sullivan WJ Jr, Jeffers V. 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. FEMS Microbiol Rev. **36**: 717-733.

Sweet LC, Abrams GD, Johnson AG. 1965 The fate of radioactive bovine γ -globulin during the primary antibody response in the mouse. J Immunol. **94**: 105-110.

Szekeres-Bartho J. 2002. Immunological relationship between the mother and the fetus. Int Rev Immunol. **21**: 471-495.

Taubert A, Krüll M, Zahner H, Hermosilla C. 2006. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. Vet Immunol Immunopathol. **112**: 272-283.

Tenorio EP, Fernández J, Castellanos C, Olguín JE, Saavedra R. 2011. CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. Eur J Immunol. **41**: 3529-3541.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. **30**: 1217-1258.

Tesar DB, Björkman PJ. 2010. An intracellular traffic jam: Fc receptor-mediated transport of immunoglobulin G. Curr Opin Struct Biol. **20**: 226-233.

Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. 2000. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. Curr Opin Immunol. **12**: 731-737.

Tiwari B, Junghans RP. 2005. Functional analysis of the mouse Fcgrt 5' proximal promoter. Biochim Biophys Acta. **1681**: 88-98.

Toxodb: toxodb.org/

Tressler RL, Roth TF. 1987. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. J Biol Chem. **262**: 15406-15412.

Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. 2002. *In vitro* expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells

and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc Res.* **64**: 384-397.

Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez Mde L, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C, Correa D. 2005. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* **72**: 142-144.

Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C, Llausás A, Tapia-Conyer R, Gutiérrez G, Sepúlveda J. 1992. Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico. *Salud Publica Mex.* **34**: 222-229.

Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers FE, de Haas M, van de Winkel JG. 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood.* **108**: 3573-3579.

Vieira-Ferro EA, Mineo JR, Letta F, Bechi N, Romagnoli R, Oliveira-Silva DA, Sorda G, Bevilacqua E, Ricci-Paulesu L. 2008. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. *Am J Pathol.* **172**: 50-58.

Vigliani MB, Bakardjiev AI. 2014. Intracellular organisms as placental invaders. *Fetal Matern Med Rev.* **25**: 332-338.

Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brezin AP, Thulliez P, Wallon M, King L, Goulet V; Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis. 2010. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill.* **15**: 19600.

Waldmann TA, Strober W. 1969. Metabolism of immunoglobulins. *Prog Allergy.* **13**: 1-110.

Wallace PK, Howell AL, Fanger MW. Role of Fc gamma receptors in cancer and infectious disease. 1994. *J Leukoc Biol.* **55**: 816-826.

Weetman AP. 1999. The immunology of pregnancy. *Thyroid.* **9**: 643-646.

Weflen AW, Baier N, Tang QJ, Van den Hof M, Blumberg RS, Lencer WI, Massol RH. 2013. Multivalent immune complexes divert FcRn to lysosomes by exclusion from recycling sorting tubules. *Mol Biol Cell*. **24**: 2398-2405.

Weiss LM, Dubey JP. 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*. **39**: 895-901.

Whipple GH, Hill RB Jr, Terry R, Lucas FV, Yuile CL. 1955. The placenta and protein metabolism; transfer studies using carbon 14-labeled proteins in dogs. *J Exp Med*. **101**: 617-626.

Xiao J, Garcia-Lloret M, Winkler-Lowen B, Miller R, Simpson K, Guilbert LJ. 1997. ICAM-1-mediated adhesion of peripheral blood monocytes to the maternal surface of placental syncytiotrophoblasts: implications for placental villitis. *Am J Pathol*. **150**: 1845-1860.

Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, Bosse D, Ades EW, Lawley TJ. 1994. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol*. **102**: 833-837.

Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. 2004. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*. **20**: 769-783.

Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, Bry L, Glickman JN, Claypool SM, Kaser A, Nagaishi T, Higgins DE, Mizoguchi E, Wakatsuki Y, Roopenian DC, Mizoguchi A, Lencer WI, Blumberg RS. 2006a. Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J Clin Invest*. **116**: 2142-2151.

Yoshida M, Masuda A, Kuo TT, Kobayashi K, Claypool SM, Takagawa T, Kutsumi H, Azuma T, Lencer WI, Blumberg RS. 2006b. IgG transport across mucosal barriers by neonatal Fc receptor for IgG and mucosal immunity. *Springer Semin Immunopathol*. **28**: 397-403.

Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS, Choi WY. 1991. Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Kor J Parasitol*. **29**: 121-128.

Zeldovich VB, Clausen CH, Bradford E, Fletcher DA, Maltepe E, Robbins JR, Bakardjiev AI. 2013. Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. *PLoS Pathog.* **9**: e1003821.

Zhao Y, Liu Y, Chen Z, Korteweg C, Gu J. 2011. Immunoglobulin g (IgG) expression in human umbilical cord endothelial cells. *J Histochem Cytochem.* **59**: 474-488.

Zhao Y, Marple AH, Ferguson DJ, Bzik DJ, Yap GS. 2014. Avirulent strains of *Toxoplasma gondii* infect macrophages by active invasion from the phagosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* **111**: 6437-6442.

Zhou XJ, Yu L, Zhu L, Hou P, Lv JC, Yu F, Zhang H. 2009. Association between polymorphisms in the FCGRT gene and lupus nephritis in Chinese patients. *Clin Exp Rheumatol.* **27**: 609-614.

Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, Wang Y, Robert C, Wu B, Smith PD, Lencer WI, Blumberg RS. 2001. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol.* **166**: 3266-3276.

ANEXOS

Anexo I. Descripción de los casos clínicos incorporados en este estudio y aspectos éticos relacionados

Este trabajo forma parte del proyecto: “Toxoplasmosis congénita. Relación de los polimorfismos de genes del parásito y de la respuesta inmune de la madre y del hijo con la expresión, la actividad biológica, la transmisión vertical y la patogenia fetal”, el cual fue aprobado por los Comités de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría y cuyo número de registro es INP 060/2011.

Todas las pacientes y sus recién nacidos tuvieron manejo clínico: se les administró tratamiento a las mujeres que durante el embarazo tenían infección aguda (para prevenir transmisión vertical), así como a los bebés infectados congénitamente y éstos tuvieron seguimiento en los servicios de Infectología, Oftalmología, Audiología, Neurodesarrollo y Neurología del INP para la atención correspondiente de los problemas clínicos. Asimismo, el diagnóstico de laboratorio fue gratuito y se realizó diferencial para CMV.

Cuadro 5. Datos clínicos de los binomios de madres y de sus recién nacidos incorporados en este estudio.

Binomio	Edad madre (años)	Embarazos previos	Semanas de gestación	Problemas clínicos del embarazo	Sexo RN	Manifestaciones clínicas del feto	Peso al nacimiento (g)	Manifestaciones clínicas del recién nacido
1	Madre			Ninguno				
	Neonato				F	Ninguna		Ninguna
2	Madre			Ninguno				
	Neonato				M	Ninguna		Ninguna
3	Madre		40	Ninguno				
	Neonato				F	Ninguna	3210	Retinocoroiditis
4	Madre	21	0	41	Ninguno			
	Neonato				M	Oligohidramnios	2838	Espasticidad, RM, HM, cabeza en forma de gota
5	Madre	27	1	30.6	Ninguno			
	Neonato				F	HF, M, PH, óbito	-	-
6	Madre	30		38	Ninguno			
	Neonato				M	Hidrocefalia		Retinocoroiditis, RM, MA, CA, IC, colestasis
7	Madre	18	0	24	Ninguno			
	Neonato				M	HF, óbito a las 24 semanas	-	-
8	Madre	33	1	38	Neuro-psicológica (crónica)			
	Neonato				F	Ninguna	2840	RM, HM
9	Madre	30	0	36.6	Preeclampsia			
	Neonato				F	RIU	1615	HMI, CA, RAMA, BRCO y RM con atrofia

HF: hidrops fetal; M: malformaciones; PH: polihidramnios; RIU: retraso en el crecimiento intrauterino; RM: retraso psicomotor; MA: macrocefalia; IC: ictericia; HM: hepatomegalia; CA: calcificaciones; hipotono de miembros inferiores; RAMA: retraso en área motora y adaptativa; BRCO: baja respuesta cortical en ojos

Original Research Paper

Potential of HMEC-1 Line and HUVEC Primary Culture Cells to Study the Neonatal IgG Fc Receptor *in vitro*

^{1,2}Luz Belinda Ortiz-Alegría, ¹Irma Cañedo-Solares, ³Felipe Vadillo-Ortega, ³Marisol Castillo-Castrejón and ¹Dolores Correa

¹Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México D.F., México

²Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

³Unidad de Vinculación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, México D.F., México

Article history

Received: 15-01-2016

Revised: 19-03-2016

Accepted: 21-03-2015

Corresponding Author:

Dolores Correa
Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México D.F., México
Tel: +52 (55) 10840900, ext 1860 or 1873
Email: mariadol@yahoo.com

Abstract: The neonatal IgG Fc receptor (FcRn) plays an important role in IgG homeostasis and immunity passive transfer. Fine points regarding these mechanisms, however, are still emerging. In order to obtain information about these phenomena, it is essential to have *in vitro* models of endothelium that express this receptor. In this study we chose two widely used models of human endothelial cells: the semi-immortalized and stable cell line HMEC-1 (CDC/USA) and the Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) which maintain morphological, phenotypical and functional characteristics of human micro and macro-vasculature endothelia, respectively. We found that both cells express the FcRn mRNA and protein using real-time RT-PCR, flow cytometry and confocal microscopy, respectively. We detected differences in mRNA expression levels in HUVECs among individuals. The protein was found on the cell surface but also intracellularly within vesicles. This study supports the use of two cell types as models of FcRn expression, allowing either to understand or to manipulate the mechanisms in which the receptor is involved *in vivo*.

Keywords: FcRn, Endothelial Cells, HMEC-1, HUVECs

Introduction

Half a century ago Francis Brambell and collaborators proposed that a saturable receptor for Fc of IgG (FcRn) was responsible both for transcytosis across the intestinal epithelium or the placenta and for protection of IgG from catabolism, extending its half-life in serum (Brambell *et al.*, 1964).

This receptor, composed by an alpha chain (FCGRT) in association with Beta-2-Microglobulin (B2M), is expressed in different cell types of various organs and systems, in a wide variety of animal species, but endothelial cells are considered the main mediators of FcRn-IgG processes (Johnson *et al.*, 1975; Rodewald, 1980; Ghetie *et al.*, 1996; Borvak *et al.*, 1998; Cianga *et al.*, 2011; Rath *et al.*, 2013). It has been demonstrated in endothelial cells of the lung, term placenta villi and retino-choroids (Borvak *et al.*, 1998; Antohe *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2003; Radulescu *et al.*, 2004; Perez-Montoyo *et al.*, 2009;

Powner *et al.*, 2014). The FcRn thus seems widely distributed in the human body. It is constitutively expressed, is up-regulated by TNF- α and LPS and down-regulated by IFN- γ (Liu *et al.*, 2007; 2008).

Although, there are many recent articles related to FcRn, most are focused in therapeutic uses. Several advances in engineering antibodies had been made, for half-life delay and pH-dependent binding, with consequent improvements in efficacy (Ward *et al.*, 2015). Also, the inhibition of FcRn reduces IgG levels in the organism and clears pathogenic and autoreactive antibodies, ameliorating some diseases, like idiopathic thrombocytopenic purpura, myasthenia gravis, arthritis and multiple sclerosis in mouse models (Ellinger and Fuchs, 2012; Ward *et al.*, 2015). Nevertheless, these studies have not been confirmed in humans and little is known in relation to expression levels in many cell subtypes, or whether it performs the same functions. The FcRn is an unusual receptor, because it binds IgG at acidic pH; however, specific mechanisms remain to be

elucidated (Rath *et al.*, 2013). It is not clear whether IgG uptake occurs via fluid phase pinocytosis or whether this is a receptor-mediated phenomenon at the surface level; neither is it certain whether this mechanism depends on the cellular type. Knowledge about how FcRn carries out its function in human cells is of relevance to understand how IgG levels are regulated (Borvak *et al.*, 1998).

FcRn not only binds to monomeric IgG but also to antigen/antibody complexes. In some cases it facilitates efficient immune responses towards opsonized antigens or pathogens (Johnson *et al.*, 1975; Qiao *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2012; 2014). In other cases this route could serve microorganisms to traverse epithelial barriers, e.g., Cytomegalovirus covered with human IgG, is suggested to traverse the syncytiotrophoblast and the fetal endothelium at the villi, reaching the fetus (Maidji *et al.*, 2006). Likewise, HIV-1 transcytosis across epithelia is enhanced by this receptor (Gupta *et al.*, 2013). Furthermore, IgG transfer offers opportunities for delivery of therapeutic antibodies or coupled proteins, so it is of great interest to examine and characterize the Fc-FcRn interaction on IgG transport, due to its potential effect on their *in vivo* pharmacokinetic dynamics (Mathur *et al.*, 2013).

In order to examine these phenomena at sub-cellular level and their regulation, *in vitro* cultures of endothelial cells expressing FcRn would be useful. Two widely used models of human endothelial cells are the semi-immortalized and stable cell line HMEC-1 (CDC/USA) obtained and transformed in 1992 by Ades *et al.* (1992) and the Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), originally isolated by Jaffe *et al.* (1973). The first shares similar morphological, phenotypical and functional characteristics with human microvascular endothelial cells (Ades *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1994; Unger *et al.*, 2002). Even though they have been used to assess the intracellular route of the FcRn protein by means of transfection experiments with the gene recombined to green fluorescent protein, it has not been reported that these cells are able to express the endogenous gene (Ober *et al.*, 2004a).

The second cell type is probably the most frequently used model of normal human endothelia, since it is more readily available than those obtained from other vessels, is commonly free of pathological processes and is physiologically relevant (Marin *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003). The presence of FcRn has been shown in endothelial cells of the arteries and the vein of cord samples by immunohistochemistry (Zhao *et al.*, 2011). Yet, the location and function of the FcRn in these cells are unknown; this is relevant because they form the wall of large vessels, where these aspects are intriguing.

Thus, we performed assays to determine the expression (both messenger and protein) and location of this receptor in HMEC-1 and HUVECs and present our findings in the following pages.

Materials and Methods

Human Cords and Ethical Aspects

This project was sanctioned by the Research and Ethics Committees of the National Institute of Pediatrics, of the Ministry of Health of Mexico (No.060/2011), which abides by national and international research regulations.

HUVECs were isolated from seven term human cords (38-40 gestation weeks) from indicated caesarean delivery, with neither active labor nor clinical or microbiological evidence of infection. Patients were recruited at the Hospital Materno Infantil Inguaran of the Ministry of Health of Mexico City, Mexico and gave their informed consent. Samples were immediately transferred to suitable media composed by M199 medium (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA), an antibiotic-antimycotic mixture [100 U mL⁻¹ penicillin, 100 µg mL⁻¹ streptomycin sulfate and 0.25 µg mL⁻¹ amphotericin B] (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Hyclone Logan, Utah, USA); and transported in sterile conditions to the laboratory within one hour after collection.

Cell Culture

Isolation of HUVECs was carried out according to the procedure described by Paez *et al.* (2005). Briefly, cells were collected by 0.2% collagenase type II digestion (Roche, Hertfordshire, UK) for 30 min at 37°C, then, cells were plated on 25 cm² cell culture flasks (Beckton Dickinson, NJ, USA) and cultured until confluence, at 37°C in a 7% CO₂ atmosphere, in M199 medium (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA) supplemented with antibiotic-antimycotic mixture (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA); 10% heat-inactivated FCS (Hyclone Logan, Utah, USA); 40 µg mL⁻¹ bovine endothelial cell growth factor (bECGF; Roche, IN, USA); 5 IU MI⁻¹ porcine heparin, 10 mM HEPES and 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO, USA). Confluent HUVECs were subcultured twice after 0.05% Trypsin-EDTA treatment (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA); therefore, the cells used in all experiments were of the third pass (if > 95% viable). HMEC-1 cells were cultured according to Ades *et al.* (1992) in MCDB131 medium (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA), supplemented with 1.0 µg mL⁻¹ hydrocortisone, penicillin G (100 IU mL⁻¹), streptomycin (100 µg mL⁻¹) and amphotericin B (0.025 µg mL⁻¹) (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA), 10% FCS (Hyclone Logan, Utah, USA), 10 mM L-glutamine and 20 µg mL⁻¹ bovine endothelial cell growth factor (bECGF; Roche, IN, USA) at 37°C, with 7% CO₂, until confluence. They were detached using 0.25% Trypsin-

EDTA (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) for 2-3 min at 37°C. Only cells with a maximum of four passages were used in this study. Four samples of HMEC-1 were taken from different cultures and tested to detect FcRn mRNA in triplicate. The action of Trypsin was stopped in both cases by adding media complemented with 5% FCS and then by centrifugation (1200 rpm for seven min).

FcRn α -Chain (FCGRT) mRNA Detection by Real-Time RT-PCR

RNA was isolated using TRIzol® (Ambion, Life Technologies, Grand Island, USA) according to manufacturer instructions, under RNase-free conditions, added directly to the culture flasks at 0.5 mL/1×10⁶ HMEC-1 or HUVEC cells and 1.0 mL/100 mg human microvilli, used as positive controls (Simister *et al.*, 1996). The concentration and quality of extracted RNA were verified using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA) and 1% agarose gel electrophoresis. cDNA was obtained by Reverse Transcription (RT) from 0.4 µg total RNA, in a volume of 20 µL, using the TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, USA) and according to manufacturer instructions. Validated Real time PCR primers and TaqMan probes designed by Applied Biosystems were: FCGRT (assay ID: Hs01108967_m1, FAM-MGB) and B2M (TaqMan endogenous control, RefSeq: NM_004048.2, VIC-MGB). PCR was performed in a final volume of 10 µL, using 5 µL of 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2.5 and 1.25 µL of FCGRT and B2M TaqMan set probes, respectively and 250 ng of cDNA per sample, in an Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaction conditions were: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. In some cases it was possible to obtain paired samples of placental villi and umbilical cord, which were analyzed simultaneously. The fluorescence intensity values of FCGRT and B2M were plotted; the medians were compared and the differences were calculated by Mann-Whitney U-test, considering $p < 0.05$ statistically significant. Relative expression changes of the FCGRT gene were calculated using the FCGRT/B2M index.

FcRn α -Chain Protein Detection by Flow Cytometry and Confocal Microscopy

Human endothelial cells were evidenced with APC-labeled anti-human CD105 (endoglin) antibody, produced in mouse (BioLegend, San Diego, CA, USA) at 1:50 dilution (25 µg mL⁻¹).

Detection of FcRn α -chain was carried out with the anti-human FCGRT antibody, produced in rabbit (Sigma St.

Louis, MO, USA) at a 1:100 dilution and as a secondary antibody a FITC goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, USA) at 2.4 µg mL⁻¹. As a negative control a non-related rabbit serum, at equivalent dilution, was used.

For surface immunodetection, cells were incubated with 100 µL of combined primary antibodies, at 4°C, for 30 min and washed with PBS. Afterwards, 100 µL of FcRn secondary antibody was aggregated and cells were newly incubated at 4°C, for 30 min and washed. To assess the intracellular location, both endothelial cell types were permeabilized, using the FOXP3 fix/perm buffer set solution (BioLegend, CA, USA), according to manufacturer instructions. Briefly, CD-105 surface staining was done first. Afterwards, cells were incubated for 20 min with FOXP3 Fix/Perm solution and washed once with PBS and once again with FOXP3 Perm buffer. The pellets were resuspended in the latter, incubated for 15 min and centrifuged. Next, they were incubated for 30 min with the anti-FcRn antibody diluted in FOXP3 Perm buffer, washed twice and resuspended in PBS. All incubations were performed in the dark and at room temperature.

For flow cytometry, cells were detached from the culture dish by incubation for 3-5 min at 37°C with Trypsin-EDTA (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) at 0.05 and 0.25%, for HUVECs and HMEC-1, respectively. Later, 10⁵ cells per tube were subjected to intracellular or surface immunodetection. Finally, cells were resuspended in 0.5% buffered paraformaldehyde and analyzed on a Becton Dickinson FACSAria flow cytometer and using the FlowJo 8.3 software (San Jose CA, USA).

For confocal microscopy, cells were grown directly in 24 wells plates (Corning, NY, USA) with round coverslips (Nunc, Thermanox, NY, USA) and after confluence they were subjected to surface or intracellular immunodetection. DAPI was utilized to counterstain cell nuclei (DNA). Confocal images were captured using an Olympus FluoView™ FV1000 Confocal Laser Scanning Microscope (Olympus America Inc., NY, USA), equipped with lasers providing excitations at 405, 473, 559 and 635 nm. The images were captured using a 60 NA oil immersion objective and processed using FV10-ASW 1.7 Viewer. All system settings were kept identical for all experiments and signal saturation was avoided. Images to be compared were always contrast-enhanced identically.

Results

FcRn α -Chain mRNA Levels

The human FCGRT mRNA relative levels and the FCGRT/B2M index were homogeneous among HMEC-1 cells of different cultures and significantly higher when compared to HUVECs and villi (Fig. 1A and 1B). These differences were not due to amounts or quality of mRNA, since the B2M endogenous control was homogeneous (Fig. 1C).

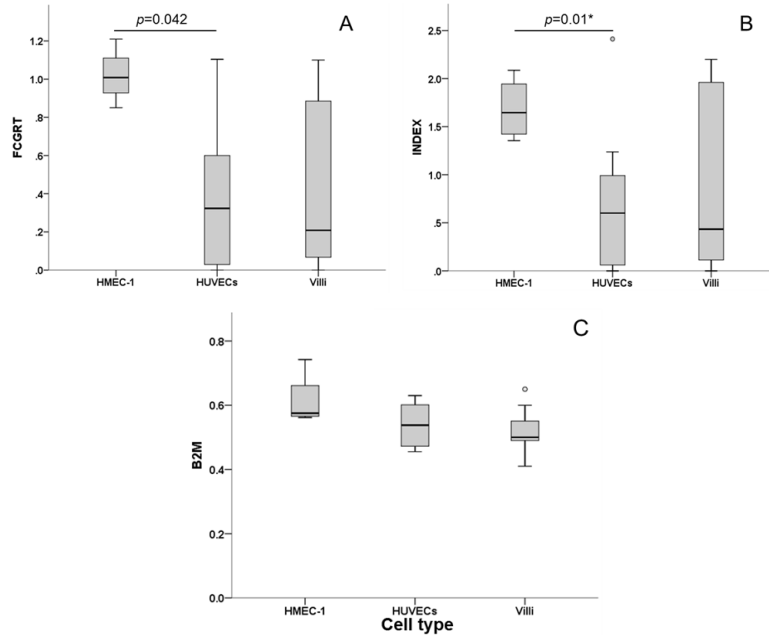


Fig. 1. FCGR2 and B2M mRNA expression measured by semi-quantitative RT-PCR. Absolute levels (A and C) and FCGR2/B2M index (B) were determined for HMEC-1 cultures (n = 4) or HUVECs and villi samples (n = 7 each). Statistical significance was calculated by Mann-Whitney U-test. *This difference was calculated excluding the upper extreme value; the value including it was $p = 0.074$

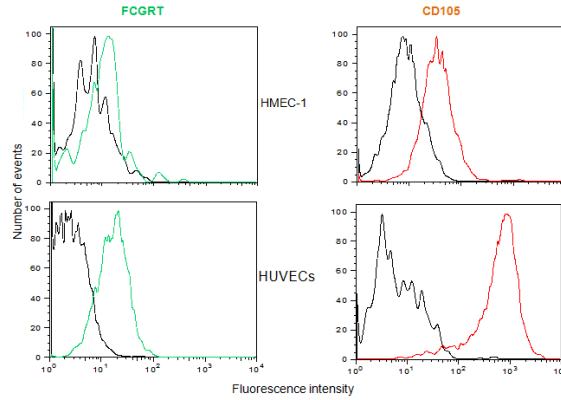


Fig. 2. Expression of the FcRn by HMEC-1 and HUVECs assessed by immunostaining and flow cytometry. Antibodies against CD105 (specific endothelial surface marker in orange) and the alpha chain of the FcRn (green) were simultaneously used to determine expression at the protein level. The black curves correspond to negative controls

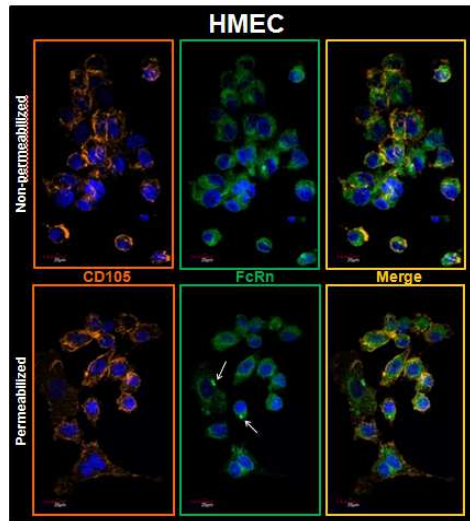


Fig. 3. Expression of the FcRn by HMEC-1 assessed by immunostaining and confocal microscopy. Antibodies against CD105 (specific endothelial surface marker in orange) and the alpha chain of the FcRn (green) were simultaneously used to determine co-localization (yellow). Nuclei are marked with DAPI (blue). Arrows point FcRn located in intracellular vesicles

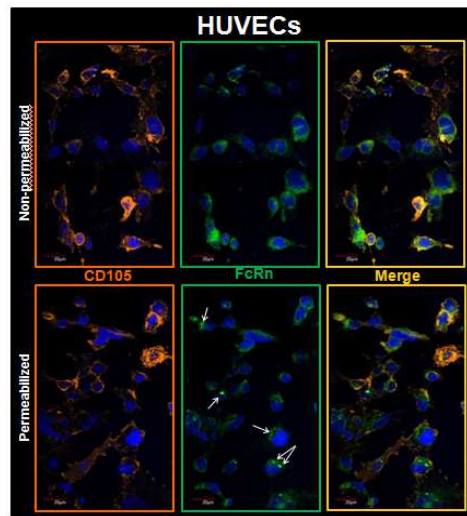


Fig. 4. Expression of the FcRn by HUVECs assessed by immunostaining and confocal microscopy. Antibodies against CD105 (specific endothelial surface marker in orange) and the alpha chain of the FcRn (green) were simultaneously used to determine co-localization (yellow). Nuclei are marked with DAPI (blue). Arrows point FcRn located in intracellular vesicles

An aspect worth remarking is the heterogeneity of FCGRT expression among individuals who donated HUVECs or villi both determined in absolute levels or index.

FcRn α -Chain Protein Detection

Representative cytometry graphs of human FcRn α -chain protein expression by HMEC-1 and HUVECs are shown in Fig. 2. As it can be observed, both cell types are positive for this protein, although HMEC-1 apparently expressed lower levels in comparison to HUVECs. However, they loom similarly stained in the confocal microscopy images; the location is also similar, co-localizing with the orange stain of CD-105 in the majority of cells (Fig. 3 and 4). The FcRn α -chain fluorescence was throughout the cell surface; however, when the cells were permeabilized the fluorescence was also detected in the cytoplasm, including vesicles. The FcRn fluorescence intensity detected by cytometry and confocal microscopy was similar among HUVECs of different individuals (data not shown).

Discussion

Human FcRn is a receptor involved in two important mechanisms of IgG-mediated passive protection and homeostasis, described long ago: Transcytosis and internalization (Ward and Ober, 2009), which are performed by epithelial and endothelial cells (Borvak *et al.*, 1998). It is probably also related to amelioration of pathogenic events, but this has not been confirmed in humans. Furthermore, due to controversy about sub-cellular mechanisms underlying these phenomena, it is important to have human cell models that express FcRn.

In this study we demonstrate that two varieties of human endothelial cells, HMEC-1 and HUVECs, of microvasculature and of macrovasculature, respectively, express the receptor and its location. We chose these two cell subtypes because they are easy to obtain and grow *in vitro* and they have specific characteristics of endothelia (Ades *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1994; Unger *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2003). Using RT-PCR, cytometry and confocal microscopy we found that both cell types express FCGRT mRNA and protein and can therefore be used as models to study processes mediated by this receptor. Zhao *et al.* (2011) detected the FcRn in the cytoplasm of both arterial and venous endothelial cells by immunohistochemistry in sections of umbilical cords from full-term healthy pregnant women; so our results are consistent with theirs. However, we could semi-quantify mRNA of the alpha chain of the receptor and we found expression heterogeneity among individuals. Also, we located the molecule both superficially and intracellularly.

Regarding HMEC-1, Ober *et al.* (2004a; 2004b) used FcRn-Green Fluorescent Protein (GFP)-transfected HMEC-1 cells to analyze the trafficking of the receptor and its IgG ligand. They demonstrated the capacity of these cells to express both B2M and FcRn alpha chain genes if transfected, but they did not show expression of the endogenous gene. In this study we confirmed that HMEC-1 cells are expressing this molecule on the surface, where it co-localized with CD105, but also within vesicle-like structures in the cytoplasm.

It was interesting to find that HMEC-1 cells homogeneously express higher mRNA levels than HUVECs and villi. In the later two, mRNA expression differed among individuals. This could be due to gender, gestational age or the part of the cord taken to isolate the cells. This was reinforced by the fact that different levels were found with the samples of the same individual (not shown). Another explanation is differential gene regulation. In this regard, Liu *et al.* (2007) found that stimulation of intestinal epithelial cell lines, macrophage-like THP-1 and freshly isolated human monocytes with TNF- α up-regulated FcRn gene expression. In addition, the TLR ligands LPS and CpG oligodeoxynucleotide enhanced FcRn expression, specifically in THP-1 and monocytes. Addition of NF- κ B in TNF-stimulated THP-1 resulted in down-regulation of the FcRn gene. Likewise, the same group showed that IFN- γ down-regulated FcRn expression at both mRNA and protein level, which was STAT-1 signaling pathway-dependent in the same cells but detected a relative inability of IFN- γ to down-regulate FcRn production in Caco-2 cells (Liu *et al.*, 2008). These findings indicate that control mechanisms of FcRn transcription regulation differ among cell types (Liu *et al.*, 2008).

In our study, the protein amount seemed not to vary as assessed by confocal microscopy, but we found differences between HMEC-1 and HUVECs by flow cytometry, in this case being HMEC-1 cells less positive. Nevertheless, this could be due to the fact that they were detached with higher concentrations of trypsin; the receptor may be sensitive to the action of the protease, which is reinforced by a similarly lower label of the endothelial marker CD105 (Fig. 2).

In permeabilized cells of both types, some vesicle-like structures filled with FcRn, but not CD105 were seen, which supports that the location of the receptor is superficial and intracellular (probably in endosomes).

The results suggest that the HMEC-1 line could serve as a good model to study FCGRT related processes. However, it is important to consider that it is a transformed line and some of the regulatory mechanisms could be altered. In fact, mRNA levels of FCGRT are much higher in these cells than in HUVECs or villi, although for B2M they were similar (Fig. 1).

One question that remains unclear is the biological function of the FCGRT in HUVECs *in vivo*, for these cells are not likely to be involved in transcytosis. Since they belong to macro-vasculature endothelium, it is also unlikely that they have an important role in IgG level regulation, like microvasculature cells do, but this cannot be ruled out. Of interest is that the absolute and relative mRNA expression of both FCGRT and B2M genes were similar between HUVECs and chorionic villi, but important differences among individuals were found.

Conclusion

HMEC-1 and HUVEC endothelial cells express the neonatal Fc gamma receptor on the surface as well as intracellularly, enabling them as models for FcRn expression. This grants the possibility of understanding and manipulating the mechanisms in which the receptor is involved. Of importance is that expression of the alpha chain varies of among HUVECs from different individuals.

Acknowledgement

This article is part of the PhD Thesis of OALB within the "Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)". She also was granted with scholarship 174371 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

We are indebted to Dr. Araceli-Paez Arenas and Dr. Felipe Alonso Masso-Rojas, from the National Institute of Cardiology, for their training in HUVECs and HMEC-1 isolation and culture and to Dr. Anaclara Castro-Santana for critical conceptual and language review.

Funding Information

This work had partial support from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT, grant No. 139721) and Federal Funds from INP (No. 060/2011).

Author's Contributions

All authors read and approved the final manuscript.

Luz Belinda Ortiz-Alegria: Design and conduction of work; data analysis and manuscript writing.

Irma Cañedo-Solares: Experiments design and conduction; review and correction of the manuscript.

Felipe Vadillo-Ortega: Intellectual expertise, review and correction of design and manuscript.

Marisol Castillo-Castrejón: Collection of samples; review and correction of the manuscript.

Dolores Correa: Research line leader, who conceived and designed the study. Data analysis and interpretation and manuscript writing.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicting interest in this work.

References

- Ades, E.W., F.J. Candal, R.A. Swerlick, V.G. George and S. Summers *et al.*, 1992. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.*, 99: 683-690. PMID: 1361507
- Antohe, F., L. Radulescu, A. Gafencu, V. Ghetie and M. Simionescu, 2001. Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum. Immunol.*, 62: 93-105. DOI: 10.1016/S0198-8859(00)00244-5
- Baker, K., T. Rath, W.I. Lencer, E. Fiebigler and R.S. Blumberg, 2012. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70: 1319-1334. DOI: 10.1007/s00018-012-1100-8
- Baker, K., T. Rath, M. Pyzik and R.S. Blumberg, 2014. The role of FcRn in antigen presentation. *Front. Immunol.*, 5: 408-408. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00408
- Borvak, J., J. Richardson, C. Medesan, F. Antohe and C. Radu *et al.*, 1998. Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int. Immunol.*, 10: 1289-1298. DOI: 10.1093/intimm/10.9.1289
- Brambell, F.W., W.A. Hemmings and I.G. Morris, 1964. A theoretical model of γ -globulin catabolism. *Nature*, 203: 1352-1354. DOI: 10.1038/2031352a0
- Cianga, C., P. Cianga, P. Plamadela and C. Amalinei, 2011. Nonclassical major histocompatibility complex I-like Fc neonatal Receptor (FcRn) expression in neonatal human tissues. *Hum. Immunol.*, 72: 1176-1187. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.08.020
- Ellinger, I. and R. Fuchs, 2012. HFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport: Protection of and threat to the human fetus and newborn. *Wien. Med. Wochenschr.*, 162: 207-213. DOI: 10.1007/s10354-012-0085-0
- Ghetie, V., J.G. Hubbard, J.K. Kim, M.F. Tsen and Y. Lee *et al.*, 1996. Abnormally short serum half-lives of IgG in β 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, 26: 690-696. DOI: 10.1002/eji.1830260327
- Gupta, S., J.S. Gach, J.C. Becerra, T.B. Phan and J. Pudney *et al.*, 2013. The Neonatal Fc Receptor (FcRn) enhances Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS Pathog.*, 9: e1003776-e1003776. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003776

- Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker and C.R. Miinick, 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, 52: 2745-2756. DOI: 10.1172/JCI107470
- Johnson, P.M., P. Trenchev and W.P. Faulk, 1975. Immunological studies of human placentae. Binding of complexed immunoglobulin by stromal endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 22: 133-138. PMID: 765018
- Lang, I., M.A. Pabst, U. Hiden, A. Blaschitz and G. Dohr *et al.*, 2003. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Cell. Biol.*, 82: 163-173. DOI: 10.1078/0171-9335-00306
- Liu, X., L. Ye, Y. Bai, H. Mojidi and N.E. Simister *et al.*, 2008. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN- γ can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *J. Immunol.*, 181: 449-463. DOI: 10.4049/jimmunol.181.1.449
- Liu, X., L. Ye, G.J. Christianson, J.Q. Yang and D.C. Roopenian *et al.*, 2007. NF- κ B Signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. *J. Immunol.*, 179: 2999-3011. DOI: 10.4049/jimmunol.179.5.2999
- Maidji, E., S. McDonagh, O. Genbacev, T. Tabata and L. Pereira, 2006. Maternal antibodies enhance or prevent Cytomegalovirus infection in the placenta by Neonatal Fc Receptor-mediated transcytosis. *Am. J. Pathol.*, 168: 1210-1226. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050482
- Marin, V., G. Kaplanski, S. Gres, C. Farnarier and P. Bongrand, 2001. Endothelial cell culture: Protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J. Immunol. Meth.*, 254: 183-190. DOI: 10.1016/S0022-1759(01)00408-2
- Mathur, A., T. Arora, L. Liu, J. Crouse-Zeineddini and V. Mukku, 2013. Qualification of a homogeneous cell-based neonatal Fc Receptor (FcRn) binding assay and its application to studies on Fc functionality of IgG-based therapeutics. *J. Immunol. Meth.*, 390: 81-91. DOI: 10.1016/j.jim.2013.01.011
- Ober, R.J., C. Martinez, X. Lai, J. Zhou and E.S. Ward, 2004a. Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: An analysis at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11076-11081. DOI: 10.1073/pnas.0402970101
- Ober, R.J., C. Martinez, C. Vaccaro, J. Zhou and E.S. Ward, 2004b. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J. Immunol.*, 172: 2021-2029. DOI: 10.4049/jimmunol.172.4.2021
- Paez, A., A.R. Méndez-Cruz, E. Varela, E. Rodriguez and J. Guevara *et al.*, 2005. HUVECs from newborns with a strong family history of myocardial infarction over express adhesion molecules and react abnormally to stimulating agents. *Clin. Exp. Immunol.*, 141: 449-458. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02858.x
- Perez-Montoyo, H., C. Vaccaro, M. Hafner, R.J. Ober and W. Mueller *et al.*, 2009. Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 2788-2793. DOI: 10.1073/pnas.0810796106
- Pownner, M.B., J.A. McKenzie, G.J. Christianson, D.C. Roopenian and M. Fruttiger, 2014. Expression of neonatal Fc receptor in the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 55: 1607-1615. DOI: 10.1167/iovs.13-12574
- Qiao, S.W., K. Kobayashi, F.E. Johansen, L.M. Sollid and J.T. Andersen *et al.*, 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *PNAS*, 105: 9337-9342. DOI: 10.1073/pnas.0801717105
- Radulescu, L., F. Antohe, V. Jinga, V. Ghetie and M. Simionescu, 2004. Neonatal Fc receptors discriminates and monitors the pathway of native and modified Immunoglobulin G in placental endothelial cells. *Hum. Immunol.*, 65: 578-585. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.02.029
- Rath, T., T.T. Kuo, K. Baker, S.W. Qiao and K. Kobayashi *et al.*, 2013. The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG. *J. Clin. Immunol. Suppl.*, 1: S9-17. DOI: 10.1007/s10875-012-9768-y
- Rodewald, R., 1980. Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat. *J. Cell. Biol.*, 85: 18-32. DOI: 10.1083/jcb.85.1.18
- Simister, N.E., C.M. Story, H.L. Chen and J.S. Hunt, 1996. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur. J. Immunol.*, 26: 1527-1531. DOI: 10.1002/eji.1830260718
- Unger, R.E., V. Krump-Konvalinkova, K. Peters and C.J. Kirkpatrick, 2002. *In vitro* expression of the endothelial phenotype: Comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc. Res.*, 64: 384-397. DOI: 10.1006/mvre.2002.2434
- Ward, E.S., S.C. Devanaboyina and R.J. Ober, 2015. Targeting FcRn for the modulation of antibody dynamics. *Mol. Immunol.*, 67: 131-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.02.007
- Ward, E.S. and R.J. Ober, 2009. Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Adv. Immunol.*, 103: 77-115. DOI: 10.1016/S0065-2776(09)03004-1
- Ward, E.S., J. Zhou, V. Ghetie and R.J. Ober, 2003. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int. Immunol.*, 15: 187-195. DOI: 10.1093/intimm/dxg018

- Xu, Y., R.A. Swerlick, N. Sepp, D. Bosse and E.W. Ades *et al.*, 1994. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cell line (HMEC-1). *J. Invest. Dermatol.*, 102: 833-837. PMID: 7516395
- Zhao, Y., Y. Liu, Z. Chen, C. Korteweg and J. Gu, 2011. Immunoglobulin G (IgG) expression in human umbilical cord endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 59: 474-488.
DOI: 10.1369/0022155411400871

Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains

Irma Cañedo-Solares · Montserrat Calzada-Ruiz ·
Luz Belinda Ortiz-Alegría · Alda Rocío Ortiz-Muñiz ·
Dolores Correa

Received: 18 February 2013 / Accepted: 21 May 2013 / Published online: 10 June 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract *Toxoplasma gondii* disseminates and causes congenital infection by invasion of the endothelial cells. The aim of this study was to analyze the ability of two strains to invade two endothelial cell types. Tachyzoites of the RH and ME49 strains were expanded in Balb/c and C57BL6-RAG2^{-/-} mice, respectively. Tachyzoites were harvested from 72 h Vero cell cultures and incubated for 30 min to 4 h at 10:1 parasite/cell ratio in 24-well plates, containing monolayers of either HMEC-1 line or human umbilical cells (HUVECs). The number of infected cells and parasitic vacuoles per infected cell were counted in Wright stained slides. A slow increase in the proportion of infected cells occurred but varied according to cell type–parasite strain combination: ME49 tachyzoites invaded up to 63 % HMEC-1 cells, while RH parasites infected up to 19 % HUVECs. ME49 and RH tachyzoites invaded 49 and 46 % HUVECs and HMEC-1 cells, respectively. Reinvasion and formation of new parasitophorous vacuoles of infected cells was more frequent than invasion of noninfected cells. The results support that the factors influencing invasion, and thus dissemination and vertical transmission, are parasite type, host cell type/subtype, and activation state.

Interestingly, *T. gondii* virulence does not seem to relay on its invasion efficiency, but probably on replication speed.

Introduction

Toxoplasma gondii is a protozoan of the phylum Apicomplexa, together with numerous pathogens of significant medical and veterinary importance (Dubey 2010). The tachyzoites replicate inside nucleated cells making invasion an essential step of the life cycle, which it is a complex multistage process involving initial attachment to the host cell, followed by sequential discharge of specialized secretory organelles, and active formation of the parasitophorous vacuole (Carruthers and Boothroyd 2007). Replication and egression are other two processes that may determine parasite virulence and dissemination (Kafsack et al. 2009).

Transplacental passage of the protozoan may occur, causing congenital toxoplasmosis (Elsheikha 2008). It is known that strain virulence may influence generation of clinical problems, migration across epithelial/endothelial barriers, and vertical transmission efficiency (Ortiz-Alegría et al. 2010; Saeij et al. 2005). Paradoxically, less virulent strains seem to be more frequent among humans and domestic animals, with either acquired or congenital infection, at least in some parts of the world (reviewed in Ortiz-Alegría et al. 2010). Infection of endothelial cells lining the placental blood vessels is thought to be among the major transmission routes to the fetus; therefore, the study of their invasion is of great interest (Dimier and Bout 1993).

Actually, it is known that *T. gondii* tachyzoites invade, replicate, and traverse endothelial cells (Benedetto et al. 1997; Cortez et al. 2005; Dimier and Bout 1993, 1996; Smith et al. 2004; Zamora et al. 2008). Available data suggest that infection and proliferation depends on the endothelial cell tissue origin (Smith et al. 2004) and the parasite strain/virulence, but these

I. Cañedo-Solares · M. Calzada-Ruiz · L. B. Ortiz-Alegría · D. Correa
Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de
Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría Secretaría
de Salud, Mexico, Distrito Federal, Mexico

I. Cañedo-Solares
Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad
Autónoma Metropolitana, Mexico, Distrito Federal, Mexico

A. R. Ortiz-Muñiz
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, Mexico, Distrito Federal, Mexico

D. Correa (✉)
Av. Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco,
04530, Mexico, Distrito Federal, Mexico
e-mail: mariadol@yahoo.com

aspects have been scarcely studied and only at one time during invasion of this cell type, i.e., before replication starts (Lachenmaier et al. 2011). The kinetics of invasion has not been analyzed comparing two endothelial cell types and two *T. gondii* strains of different virulence.

Materials and methods

Ethics and bioethics The results of the present work originated from project 037/2007, approved by the research and animal care revision boards of the Instituto Nacional de Pediatría, SSA, Mexico, which lie in national as well as international regulations for research with humans and animals.

Endothelial cells isolation and culture HUVECs were obtained by the procedure reported before by Paez et al. (2005). Briefly, term cords were treated with 0.2 % type II collagenase (Roche, Hertfordshire, UK) and cultured until confluence at 37 °C in a 7 % CO₂ atmosphere, using M199 medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin sulfate, and 0.25 µg/mL amphotericin B (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA); 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Hyclone Logan, Utah, USA); 40 µg/mL bovine endothelial cell growth factor (bECGF; Roche, IN, USA); 5 IU/mL porcine heparin, 10 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). The HUVECs used in all experiments were of the third pass being >95 % cells positive for CD105, endothelial specific marker (BD PharMingen San Diego, CA USA; not shown).

The HMEC-1 (CDC/EU HMEC-1) is a semi-immortalized and stable cell line obtained from human microvasculature (Bonney et al. 2001; Xu et al. 1994). These cells were cultured according to Ades et al. (1992) and Unger et al. (2002) at 37 °C, with 7 % CO₂ in MCDB131 medium, supplemented with 1.0 µg/mL hydrocortisone, penicillin G (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL), and amphotericin B (0.025 µg/mL) (Gibco, Invitrogen, Grand Island, USA); 10 % FCS (Hyclone, Utah, USA), 10 mM L-glutamine, and 20 µg/mL endothelial cell growth factor bovine (bECGF; Roche, IN, USA).

Both cell types present many of the activities of endothelial cells (Pauly et al. 1992; Bouïs et al. 2001).

Parasites and invasion experiments Tachyzoites from the virulent RH and nonvirulent ME49 strains of *T. gondii* were maintained by intraperitoneal passage in Balb/c and C57BL6/RAG2^{-/-} knockout mice, respectively. The parasites were collected in RPMI-1640 medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) from the peritoneal cavity 96 h after infection, counted, inoculated on confluent Vero cell cultures, and left for 72 h in DMEM medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10 % FCS and L-glutamine. The tachyzoites were harvested from the supernatant by low speed centrifugation, counted, and used to infect endothelial cells. Parasites were utilized only if their viability was superior to 95 %, as assessed by Trypan blue exclusion.

For invasion experiments, cells were cultured on round plastic coverslips located inside 24-well plates (Nunc, Inc., Naperville, FL), at a density of 100,000 per well in their respective complete culture media and left 72 h to allow monolayer formation. Afterwards, tachyzoites of either RH or ME49 strain were added at a dose of infection (doi) of 10:1 parasite/cell for 0.5, 1, 2, 3, or 4 h in the respective media added with 10 % FCS. This doi was chosen from preliminary experiments, in which 1:1, 2:1, 4:1, and 10:1 parasite/cell ratios were tested (not shown). We chose incubations of up to 4 h, since it has been reported that the intracellular duplication time of RH strain in human fibroblasts is around 4 h (Radke et al. 1998, 2001). After washing off the free parasites, the slides were fixed with absolute methanol and stained with Wright dye. Examples of cells infected with different numbers of vacuoles are shown in Fig. 1. Percent infected cells and number of vacuoles/infected cell were determined using an optical microscope (Carl Zeiss, Munich, Germany) at ×100 magnification, completing at least 100 cells per slide and 4 fields. Three experiments, each in triplicate, were performed.

Statistical analysis Differences along time and among groups were evaluated by Kruskal–Wallis ANOVA, followed, when appropriate, by Mann–Whitney *U* test, using the SPSS V18.0 software.

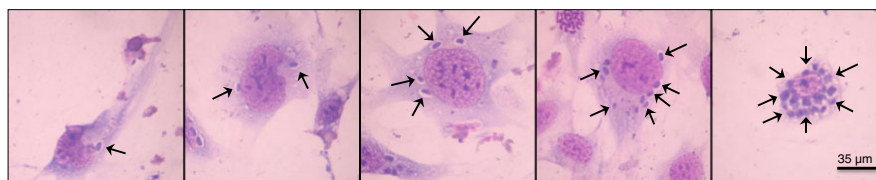


Fig. 1 Examples of cell invasion by *T. gondii*. In the slides are HMEC-1 cells infected with ME49 strain at different times: 30 min, 1, 2, 3, and 4 h. Arrows indicate tachyzoites in their parasitophorous vacuoles

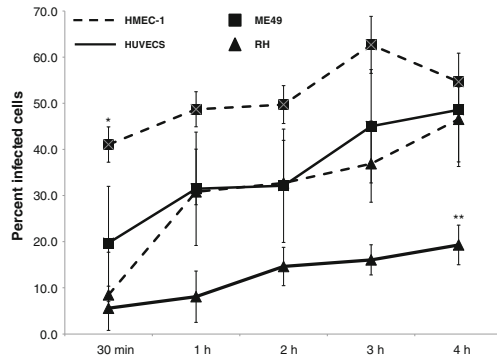


Fig. 2 *Toxoplasma gondii* RH and ME49 invasion kinetics in two cell types, HMEC-1 and HUVECs. Parasite/cell ratio used was 10:1. Values are mean±SD of three experiments in triplicate. (Asterisk) significantly different to the other three combinations at 30 min only (Mann–Whitney *U* test, $P<0.05$). (Double asterisk) significantly different from the other three groups along time (Kruskal–Wallis, $P<0.01$), except for HMEC-1 infected by RH strain at 30 min

Results

HMEC-1 cells were rapidly invaded by ME49 tachyzoites, i.e., more than 40 % of cells were already infected 30 min after exposure (Fig. 2). In contrast, less than 10 % HUVECs had been invaded by RH parasites at this time. In spite of this infection degree difference, the kinetics was similar, with no significant increase up to 4 h (Fig. 2). Except for HUVECs infected with RH strain, the number of vacuoles per cell significantly increased along the time, with more than 30 vacuoles per cell in some cases (Fig. 3).

Invasion of HMEC-1 cells by RH parasites and HUVECs by ME49 tachyzoites was of intermediate degree, i.e., around 30 % of cells were infected after 1 h of incubation. Nevertheless, the increase slope was not different among all groups, except for that of HMEC-1 cells infected with the RH strain, mainly because of a stepped increase from 30 to 60 min. A nonsignificantly different proportion of around 40 % was reached at the end of the incubation time, except in the case of HUVEC cells infected with RH strain, which remained very low (below 20 %) (Fig. 2).

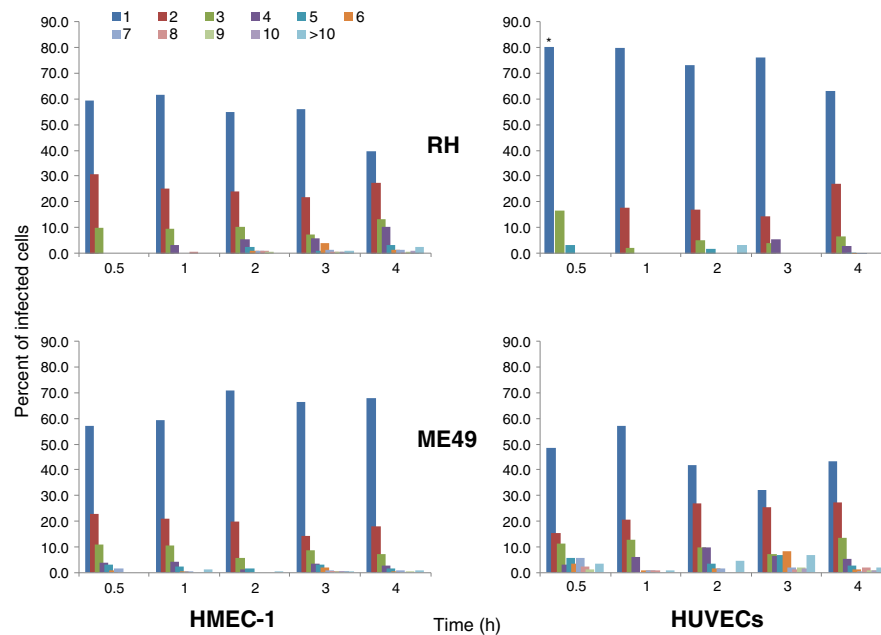


Fig. 3 Number of parasitophorous vacuoles per infected cell at different times of HMEC-1 and HUVECs exposition to RH and ME49 strains. The kinetics of infection was similar in HMEC-1 cells infected with the RH strain and HUVECs exposed to ME49 parasites; they

statistically differed from the other two groups along the experiment (Kruskal–Wallis, $P<0.05$). (Asterisk) significantly different from the other three groups at 30 min of exposure only (Mann–Whitney *U* test, $P<0.05$)

Discussion

Migration through epithelial and endothelial barriers is a major event during *T. gondii* migration and dissemination within the host body (Barragán et al. 2005; Saeij et al. 2005). Also, infection of the endothelial cells of the placental blood vessels of the decidua and within the chorionic villi is probably the main transmission route to the fetus. Thus, it is of relevance to study endothelial cell invasion. Published studies about this subject have mainly focused on the analysis of subcellular events that lead to vacuole formation or on the effect of various hormonal or immunological stimuli on tachyzoite replication (Benedetto et al. 1997; Cortez et al. 2005; Dimier and Bout 1993; 1996). Thus, there is little evidence on invasion susceptibility. For this reason, we compared the invasion kinetics of two *T. gondii* strains, RH (virulent) and ME49 (nonvirulent) in two endothelial cell types, HMEC-1 (skin microvasculature), and HUVECs (cord vasculature). Quite unexpected, the less virulent strain invaded a greater proportion of cells than the more aggressive RH strain. Lachenmaier et al. (2011) reported similar results, i.e., that RH tachyzoites invade a lower proportion of rat brain microvasculature endothelial cells in vitro than those of the ME49 strain. Even though, they only analyzed invasion at one time (2 h) and with low parasite dose (doi=1.0), which resulted in very low proportion of infected cells (<10 %). We decided to test different doses and times, and found that comparisons could not adequately be made at low doi and short times because results were largely variable among experiments. At 30 min to 4 h exposure and with a doi=10, clear differences could be seen, both in the proportion of infected cells and the number of parasitophorous vacuoles per cell. Lachenmaier et al. (2011) results were confirmed and extended regarding strain virulence influence on invasion and sustain the apparently paradoxical higher frequency of low virulence strains among subclinical acquired and congenital human cases of toxoplasmosis in some parts of the world (reviewed in Ortiz-Alegria et al. 2010).

As mentioned, the proportion of infected cells was unique for each cell type/parasite combination at 30/60 min exposure, with a slow and almost steady increase thereafter, partially due to further invasion of infected cells (the number of vacuoles per cell increased significantly along time). These data suggest that there are limiting amounts of superficial parasite or host cell mutual “receptors”, which may vary within species (polymorphisms) among cell types/subtypes within an individual and among activation states of a given cell subtype. The influence of host cell type/subtype on *T. gondii* susceptibility has been documented: It is known for example that neurons, microglia, and astrocytes are differently invaded; also, human retinal endothelial cells seem more permissive to RH tachyzoites than those obtained from the aorta, the dermis, or the umbilical vein, although it is unclear if this is due to invasion or replication related phenomena (Conteras-

Ochoa et al. 2012, 2013; Smith et al. 2004; Zamora et al. 2008). On the parasite side, *T. gondii* microneme protein 2 (MIC2) binds to the host adhesion ICAM-1, expressed by endothelial cells and the syncytiotrophoblast of the placenta (Abou-Bacar et al. 2004; Barragán et al. 2005). Variations among parasite strains in MIC2 expression could induce different invasiveness of adult or fetal endothelia. On the other hand, different levels of ICAM-1 expression might have an important impact on body dissemination and congenital toxoplasmosis occurrence.

The higher susceptibility of HMEC-1 cells to *T. gondii* invasion in comparison to HUVECs might also be related to the host cell cycle: it has been reported that RH and especially the ME49 tachyzoites preferentially invade fibroblasts, trophoblasts, or HELA cells during S phase, and that the parasite may induce the invaded cell as well as the neighboring ones to enter S phase (Angeloni et al. 2009; Lavine and Arrizabalaga 2009; Youn et al. 1991). Thus, since HMEC-1 cells are more constantly replicating, the probability that the parasite finds them in this phase is higher than in the case of HUVECs. In this regard, it has been reported that glioblastoma cell lines seem to be more susceptible to infection by RH strain than primary cultured astrocytes (Brenier-Pinchart et al. 2004).

The results of the present work support the notion that not all endothelial cells are susceptible to invasion at a given moment of exposure, and their proportion will determine the extent of the parasite dissemination or the risk for vertical transmission. Factors influencing invasion are parasite type, as well as host cell type/subtype, and activation state. Interestingly, *T. gondii* virulence relies more on its replication speed than on its invasion efficiency.

Acknowledgments The authors are in debt to Dr. Felipe A. Massó and Dr. Araceli Páez for their invaluable advice and support in the collection of cords and the in vitro culture of HUVECs, to Dr. Guadalupe Santiago-Ramos for cord collection and donation, and to Héctor Luna-Pastén and Rafael López-Reboseño for technical assistance in tachyzoite reproduction in mice. This work was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT, grant number 139721).

References

- Abou-Bacar A, Pfaff AW, Letscher-Bru V, Filisetti D, Rajapakse R, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E (2004) Role of gamma interferon and T cells in congenital Toxoplasma transmission. *Parasite Immunol* 26:315–318
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99:683–690
- Angeloni MB, Silva NM, Castro AS, Gomes AO, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA (2009) Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo

- trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. *Placenta* 30:785–791
- Barragán A, Brossier F, Sibley LD (2005) Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol* 7:561–568
- Benedetto N, Folgore A, Ferrara C, Moliterno M, Galdiero F (1997) Effects of alpha-adrenergic agonists on *Toxoplasma gondii* replication in human umbilical vein endothelial cells. *Pathol Biol* 45:9–18
- Bonnefoy A, Harsfalvi J, Pfliegler G, Fauvel-Lafève F, Legrand C (2001) The sub endothelium of the HMEC-1 cell line supports thrombus formation in the absence of von Willebrand factor and collagen types I, III, and VI. *Thromb Haemost* 85:552–559
- Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH (2001) Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4:91–102
- Brenier-Pinchart MP, Blanc-Gonnet E, Marche PN, Berger F, Durand F, Ambroise-Thomas P, Pelloux H (2004) Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression in vitro. *Acta Neuropathol* 107:245–249
- Carruthers V, Boothroyd JC (2007) Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol* 10:83–89
- Contreras-Ochoa CO, Laguna-Martínez A, Belkind-Gerson J, Correa D (2012) *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol Res* 110:2089–2094
- Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, Díaz-Chávez J, Correa D (2013) *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp Parasitol* 134:256–265
- Cortez E, Stumbo AC, de Carvalho TM, Barbosa HS, Carvalho L (2005) NAD(P)H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. *J Parasitol* 91:1052–1057
- Dimer IH, Bout DT (1996) Inhibitory effect of interferon gamma-activated ovine umbilical vein endothelial cells on the intracellular replication of *Toxoplasma gondii*. *Vet Res* 27:527–534
- Dimier IH, Bout DT (1993) Cooperation of interleukin-1b and tumor necrosis factor- α in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *Immunology* 79:336–338
- Dubey JP (2010) *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, Florida
- Elsheikha HM (2008) Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. *Public Health* 22:335–353
- Kafsack BFC, Pena JDO, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB (2009) Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from hist cells. *Science* 323:530–533
- Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O (2011) Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 232:119–130
- Lavine MD, Arrizabalaga G (2009) Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. *Mol. Biochem Parasitol* 64:95–99
- Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, Correa D (2010) Congenital toxoplasmosis: the role of host and parasite genetics on transmission and pathogenesis. *Genes Immun* 11:363–373
- Paez A, Mendez-Cruz AR, Varela E, Rodríguez E, Guevara J, Flores-Romo L, Montaña LF, Massó FA (2005) HUVECs from newborns with a strong family history of myocardial infarction overexpress adhesion molecules and react abnormally to stimulating agents. *Clin Exp Immunol* 141:449–458
- Pauly RR, Passaniti A, Crow M, Kinsella JL, Papadopoulos N, Monticone R, Lakatta EG, Martin GR (1992) Experimental models that mimic the differentiation and dedifferentiation of vascular cells. *Circulation* 86:68–73
- Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, White MW (2001) Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 115:165–175
- Radke JR, White MW (1998) A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Biochem Parasitol* 94:237–247
- Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC (2005) Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect Immun* 73:695–702
- Smith JR, Franc DT, Carter NS, Zamora D, Planck SR, Rosenbaum JT (2004) Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1157–1161
- Unger RE, Konvalinkova VK, Peters K, Kirkpatrick CJ (2002) In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc Res* 64:384–397
- Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, Bosse D, Ades EW, Lawley TJ (1994) Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol* 102:833–837
- Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS, Choi WY (1991) Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Korean. J Parasitol* 29:121–128
- Zamora DO, Rosenbaum JT, Smith JR (2008) Invasion of human retinal vascular endothelial cells by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Br J Ophthalmol* 92:852–855