



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Destino intracelular de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en células endoteliales y efecto de la sensibilización con anticuerpos específicos”

TESIS

Que para optar por el grado de:

Maestra en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Presenta:

Ana Laura Castañeda Huitrón

TUTORA PRINCIPAL:

**María Dolores Correa Beltrán
Instituto Nacional de Pediatría**

COMITÉ TUTORAL:

**Sara Frías Vázquez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM/Instituto Nacional de Pediatría**

**María de Lourdes Juárez Mosqueda
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM**

Ciudad Universitaria, CD. MX.

Marzo 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología Experimental, de la Subdirección de Medicina Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud; bajo la dirección de la Dra. María Dolores Correa Beltrán

El trabajo de investigación fue financiado por el 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”, registro CONACYT 139721, registro INP 060/2010.

La alumna fue becaria del CONACYT de agosto de 2013 a julio de 2015, con número de registro 562778.

Dedicatoria

A Chelita y Jorge, por ser siempre los que me guían, dan aliento y me apoyan en todos los proyectos y loqueras que emprendo, gracias papás.

A Edgar, la persona con más onda que conozco, eres increíble y te admiro mucho, tu ejemplo de vida y apoyo es importantísimo, gracias por todo hermano.

A Miguel Alonso, gracias por estar siempre conmigo, por seguir mis pasos latosos, “y en la calle codo a codo, somos mucho más que dos”.

A mi familia por ser ese muégano dulce y pegajoso, que siempre avanza en conjunto, que no se separa, que nos apoyamos, gracias por compartir la vida.

A Shamita, por todo el amor incondicional, por las miradas, los paseos, gracias lobatona.

A Bety, gracias por seguir en este camino conmigo, somos harto tercas pero aquí estamos.

A los que no menciono, pero siempre están en mi mente, gracias.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Instituto Nacional de Pediatría, que con su ideología, recursos e infraestructura se ha llegado a conseguir este objetivo.

A mi tutora, la Dra. María Dolores Correa Beltrán, por darme la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Inmunología Experimental, donde me ayudó, enseñó, guio, me brindó apoyo, paciencia y confianza a lo largo de este trayecto.

A mi comité tutorial, integrado por la Dra. Sara Frías Vázquez y la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, por el tiempo y atenciones dedicados al desarrollo de este trabajo.

A los integrantes de mi jurado de examen: el Dr. Juan Pablo Martínez Labat, el Dr. Carlos Cedillo Peláez, la Dra. Sara Frías Vázquez y la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, por la dedicación y comentarios que enriquecieron esta investigación.

Al Laboratorio de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, donde se realizó el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica, bajo la tutoría de la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda.

Al Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Pediatría, por la infraestructura, el apoyo, aprendizaje y colaboración del Tec. Eduardo Farfán Morales, para el procesamiento de todas las muestras para microscopía electrónica; Lalo, tu apoyo fue esencial para este estudio, gracias.

Al Dr. Carlos Cedillo Peláez, por las interminables pláticas y asesorías, por la confianza, apoyo y amistad incondicional.

Al M. En C. Luis Fernando Valenzuela Moreno, por tu amistad, los consejos, por apoyarme incondicionalmente.

A las M. En C. Luz Belinda Ortiz Alegría e Irma Cañedo Solares, por su asesoramiento y ayuda en el cultivo celular, experimentos, gracias por las buenas prácticas que tuvimos.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría; gracias por su apoyo, ayuda, consejo, buenos momentos e interminables carcajadas.

Índice

1. RESUMEN	X
2. ABSTRACT	XI
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1. GENERALIDADES.....	1
3.2. BIOLOGÍA DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	3
3.2.1. <i>Taxonomía</i>	3
3.2.2. <i>Ciclo de vida</i>	4
3.2.3. <i>Invasión celular por Toxoplasma gondii</i>	8
3.2.4. <i>Respuesta ante una infección por Toxoplasma gondii</i>	11
3.2.5. <i>Papel de los receptores para Fc de IgG en la infección por Toxoplasma gondii</i>	15
3.3. RESPUESTA INMUNE EN LA GESTACIÓN	18
3.4. LÍNEA CELULAR SEMI-INMORTAL DE MICROVASCULATURA HUMANA HMEC-1	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO	22
7. METODOLOGÍA	23
7.1. TIPO DE ESTUDIO	23
7.2. ESTRATEGIA GENERAL	23
7.3. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE LA LÍNEA CELULAR SEMI-INMORTAL DE MICROVASCULATURA HUMANA HMEC-1.....	23
7.4. TAQUIZOITOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	24
7.5. DISEÑO Y CONDICIONES DEL EXPERIMENTO	26
7.5.1 <i>Grupos experimentales</i>	26
7.6. INTERNALIZACIÓN DE TAQUIZOITOS.....	26
7.7. MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL	27
7.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	27
8. RESULTADOS	32
8.1. INTERNALIZACIÓN DE TAQUIZOITOS EN CÉLULAS HMEC-1	32
8.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	34
9. DISCUSIÓN	48

10. CONCLUSIONES	52
11. PERSPECTIVAS	52
12. REFERENCIAS	53
13. ANEXOS	60
13.1. ANEXO 1: CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE LA LÍNEA CELULAR SEMI-INMORTAL DE MICROVASCULATURA HUMANA HMEC-1	60
13.2. ANEXO 2: TAQUIZOITOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> CEPA RH	61
13.3. ANEXO 3: ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE TAQUIZOITOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EN CÉLULAS HMEC-1	63
13.4. ANEXO 4: TINCIÓN WRIGHT	64
13.5. ANEXO 5: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	65
13.6. ANEXO 6: SOLUCIONES	67

Lista de cuadros

	Página
Cuadro 1. Criterios para la identificación ultraestructural de vacuolas con taquizoitos intracelulares de <i>Toxoplasma gondii</i> en células HMEC-1	30
Cuadro 2. Criterios para la identificación ultraestructural de taquizoitos intracelulares de <i>Toxoplasma gondii</i> en células HMEC-1	30
Cuadro 3. Análisis estadístico entre tipo de localización, tipo de vacuola y estado de viabilidad	46
Cuadro 4. Parásitos intracelulares en: dos tipos de localizaciones, dos tipos de vacuolas y dos estados de viabilidad	47

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Reproducción sexual de <i>Toxoplasma gondii</i> .	6
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .	7
Figura 3. Proceso de invasión por <i>Toxoplasma gondii</i> .	10
Figura 4. Organelos y tráfico intracelular.	13
Figura 5. Representación de los fenómenos inmunológicos durante la toxoplasmosis adquirida.	14
Figura 6. Respuesta mediada por receptores ante un patógeno.	15
Figura 7. Transporte perinatal de IgG mediada por el FcRn.	17
Figura 8. Representación de la transmisión vertical de <i>T. gondii</i> en una madre gestante y el daño fetal en los diferentes trimestres de la gestación.	19
Figura 9. Flujograma de estrategia general.	25
Figura 10. Ultraestructura de un taquizoito de <i>Toxoplasma gondii</i> .	31
Figura 11. Células HMEC infectadas con los tres grupos de taquizoitos de la cepa RH	32
Figura 12. Células HMEC-1 infectadas con los tres grupos de taquizoitos de la cepa RH	33
Figura 13. Imágenes ultraestructurales de células HMEC-1 control (no infectadas).	36

Figura 14. Imágenes ultraestructurales de células HMEC-1 infectadas con parásitos de los tres grupos experimentales.	37
Figura 15. Imagen ultraestructural de una célula HMEC-1 con dos taquizoitos intracelulares de RH pre incubados con PBS.	38
Figura 16. Imágenes ultraestructurales de una célula HMEC-1 con un taquizoito de RH pre incubado con PBS.	39
Figura 17. Detalle de una imagen ultraestructural de célula HMEC-1 con un taquizoito RH pre-incubado con PBS.	40
Figura 18. Imagen ultraestructural de una célula HMEC-1 con taquizoitos de RH sensibilizados.	41
Figura 19. Imágenes ultraestructurales de célula HMEC-1 con un taquizoito intracelular de RH sensibilizado.	42
Figura 20. Imágenes ultraestructurales de células HMEC-1 con taquizoitos de RH sensibilizados.	43
Figura 21. Imágenes ultraestructurales de una célula HMEC-1 con taquizoitos de la cepa RH preincubados con suero negativo.	44
Figura 22. Imágenes ultraestructurales de una célula HMEC-1 con taquizoitos de RH preincubados con suero negativo.	45

1. Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado capaz de invadir cualquier célula nucleada de diferentes hospedadores homeotermos. La mayoría de las infecciones son asintomáticas, siendo controladas por la respuesta inmune, tanto por la innata como por la adquirida. Existen diferentes mecanismos para la eliminación del parásito, como la opsonización por anticuerpos, ya que al estar cubiertos de IgG1 se facilita su reconocimiento y posterior degradación por fagocitos y otras células efectoras. Por otro lado, la IgG1 es la inmunoglobulina que más se transporta de la madre al hijo durante la gestación, a través del FcRn. Por lo anterior, se esperaría que estos anticuerpos estuvieran relacionados con protección del bebé, pero lo que hemos observado en nuestro grupo de trabajo es lo contrario: los anticuerpos IgG1 maternos están relacionados a la transmisión vertical y al daño en los neonatos infectados; también se ha documentado que en cultivos celulares de células endoteliales, el recubrimiento de los parásitos con la IgG1 genera un mayor porcentaje de células invadidas, lo que nos sugiere que posiblemente los anticuerpos estén generando un efecto concentrador de los parásitos; sin embargo, surge la pregunta: ¿los parásitos cubiertos con anticuerpos entran a la célula y son llevados a compartimentos endosómicos que le permitan sobrevivir? El objetivo de este estudio fue comparar el destino intracelular de los taquizoítos de *T. gondii* cubiertos con IgG1 en células endoteliales *in vitro*. Se usaron células endoteliales de microvasculatura HMEC-1, que fueron expuestas a taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH, previamente incubados con a) PBS, b) anticuerpos específicos de clase IgG1 y c) suero humano negativo. Posteriormente se observaron por microscopía electrónica de transmisión para definir el tipo de vacuola en el que estaban (parasitófora o endocítica), la localización dentro de la célula (cerca del núcleo o en la periferia) y su estado aparente de viabilidad. Se encontró un porcentaje mayor de parásitos localizados cerca del núcleo en vacuolas parasitóforas en el grupo incubado con IgG1, en comparación a aquellos tratados con suero negativo y, especialmente a los incubados con PBS. Además, esta localización se asoció a mejor preservación de los taquizoítos. Las conclusiones son que a) el recubrimiento de taquizoítos de *T. gondii* con anticuerpos de clase IgG1 favorece su entrada a células endoteliales HMEC-1; b) la incubación de los taquizoítos con suero negativo y, especialmente, positivo para anticuerpos anti-parásito, los protege de la degradación por la célula; y c) el tratamiento con suero negativo y, mayormente con el positivo, favoreció la localización de los protozoarios dentro de vacuolas parasitóforas.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, opsonización, IgG1, ultraestructura

2. Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite able to invade any nucleated cell of different homeotherm hosts. Most infections are asymptomatic, being controlled by both the innate and the acquired immune responses. There are different mechanisms for the elimination of the parasite, such as opsonization by IgG1 antibodies, which facilitates recognition and subsequent degradation by phagocytes and other effector cells. On the other hand, IgG1 is the main immunoglobulin transported from mother to the fetus during pregnancy, through the FcRn. Therefore, it would be expected that these antibodies were associated with protection of the baby, but what we have seen in our group is the opposite: maternal IgG1 antibodies are related to vertical transmission and damage in infected infants. We have also documented that in FcRn positive endothelial cell cultures, the coating of parasites with the IgG1 generates a higher percentage of invaded cells, which suggests that antibodies are possibly generating a concentrator effect of the protozoa. However, the question is if IgG1 covered tachyzoites enter the cell and are brought to endosomic compartments enabling them to survive? The objective of this study was to compare the intracellular fate of the tachyzoites of *T. gondii* covered with IgG1 in endothelial cells *in vitro*. WE employed microvasculature HMEC-1 endothelial cells, which were exposed to RH strain tachyzoites of *T. gondii* previously incubated with a) PBS, b) IgG1 specific antibodies, and c) negative human serum; they were analyzed by transmission electron microscopy to define the type of vacuole in which they entered (parasitophorous or endocytic), the location within the cell (close to the nucleus or to the periphery) and their apparent viability. We found higher percentage of parasites located near the nucleus in parasitophorous vacuoles in the group incubated with IgG1 antibodies, compared to those treated with negative serum, and especially with those incubated with PBS. In addition, this location is associated with better preservation of the tachyzoites. The conclusions are that: a) the coating of *T. gondii* tachyzoites with IgG1 antibodies favors their entry into HMEC-1 endothelial cells; b) incubation of the tachyzoites with negative serum and, especially, with the positive serum, protects them from degradation by the cell; and c) treatment with negative serum, and mostly positive, favored the protozoans to enter parasitophorous vacuoles.

Key words: *Toxoplasma gondii*, opsonization, IgG1, ultrastructure

3. Introducción

3.1. Generalidades

Toxoplasma gondii es un protozooario intracelular obligado con la capacidad de infectar cualquier célula nucleada de una gran variedad de vertebrados homeotermos terrestres, aéreos y acuáticos, incluyendo el ser humano (Montoya y Liesenfeld, 2004). Se estima que una de cada tres personas alrededor del mundo está infectada con este protozooario, teniendo una prevalencia variable que va del 1% hasta el 100% (Caballero-Ortega *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2007; Tenter *et al.*, 2000); lo anterior depende de diversos factores, como las condiciones socio-demográficas y económicas, así como los hábitos alimentarios, la convivencia con gatos y la susceptibilidad del hospedador (Hill, *et al.*, 2007; Tenter, 2009). La infección por *T. gondii* es de relevancia médica y veterinaria por los diversos cuadros clínicos que puede inducir en individuos infectados de manera horizontal (infección “adquirida”) o vertical (infección congénita”), como linfadenopatía, neumonía, encefalitis, retinocoroiditis, y diversos cuadros neurológicos (como psicosis, bipolaridad, esquizofrenia o epilepsia), o bien reabsorciones/abortos, muerte fetal o neonatal, malformaciones o secuelas en la forma congénita (Flegr *et al.*, 2014; Montoya y Liesenfeld, 2004).

La gravedad del cuadro clínico depende en parte de la entrada del taquizoito (forma de la fase aguda) a la célula hospedera y su replicación, con la destrucción de ésta y de los tejidos circundantes a su egreso (Carruthers, 2002). Por ende, la entrada del parásito a la célula es un paso fundamental en la evolución de la infección; en el caso de la infección congénita, además, determina la transmisión de la madre al hijo. El destino del taquizoito dependerá de la forma de entrada, esto es, si es por invasión o por endocitosis. Entre los factores determinantes de la vía se encuentran algunas moléculas de la respuesta inmune, particularmente los anticuerpos de clase IgG1 en humanos (IgG2a en ratones) generalmente son opsonizantes, es decir facilitan la fagocitosis, a través de receptores de la fracción

Fc de la IgG, o FcγRs; además transfieren protección de la madre al hijo durante y después del embarazo, pues pasan la barrera placentaria, por transporte activo mediado por el receptor neonatal de Fc, o FcRn (Ishikawa *et al.*, 2015; Radulescu, *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos resultados de la línea de investigación en la que se inserta este trabajo han mostrado un papel paradójico de estos anticuerpos en la transmisión vertical y el daño fetal/neonatal en la toxoplasmosis congénita humana, pues lejos de ser protectores, se asocian con daño (Cañedo-Solares *et al.*, 2008). Por lo que uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo es analizar la posibilidad de que los anticuerpos aumenten la transmisión de *T. gondii* como un fenómeno de "Caballo de Troya". Debido a lo anterior, en esta tesis se estudió el destino de los taquizoitos de *T. gondii* sensibilizados con anticuerpos específicos de la subclase IgG1, usando células endoteliales que expresan el FcRn, como modelo del sincitiotrofoblasto o los endotelios fetales de las vellosidades coriónicas en la placenta.

3.2. Biología de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado, de distribución mundial, con un ciclo de vida indirecto, en el cual los felinos silvestres y domésticos juegan el papel de hospedadores definitivos, y los demás animales homeotermos como los intermediarios.

3.2.1. Taxonomía

Su clasificación taxonómica está descrita para una especie del género (Dubey, 2010; Weiss y Kim, 2014):

Phylum: Apicomplexa; Levine, 1879

Clase: Sporozoa; Leukart, 1879

Subclase: Coccidiasina; Leukart, 1879

Orden: Eimeriorina; Leger, 1911

Familia: Toxoplasmatidae; Biocca, 1956

Genero: *Toxoplasma*; Nicolle y Manceaux, 1909

Especie: *Toxoplasma gondii*; Nicolle y Manceaux, 1909.

El Phylum tiene más de 5000 especies de parásitos intracelulares (de animales, plantas y más organismos), incluye especies de importancia médica humana y veterinaria como *Eimeria*, *Neospora*, *Plasmodium* y *Babesia* (Dubey, 2010; Montoya & Liesenfeld, 2004; Sibley, 2003), que presentan una estructura característica: el complejo apical, el cual es un conjunto de organelos especializados en la invasión celular. También presenta organelos secretorios con gran capacidad de almacenamiento de proteínas necesarias para los procesos de invasión, penetración, formación de vacuola parasitófora (VP) y replicación.

3.2.2. Ciclo de vida

Tiene un ciclo de vida indirecto, lo que significa que necesita de dos hospederos para completar su desarrollo. El ciclo consta de dos fases: 1) sexual: se lleva a cabo en organismos de la familia Felidae (felinos domésticos y silvestres) y 2) asexual: ocurre en todos los organismos homeotermos, los cuales fungen como hospederos intermediarios (incluyendo los propios felinos) (Dubey, 2010; Sibley, 2011; Weiss y Kim, 2014).

La fase sexual inicia cuando los felinos ingieren carne con quistes tisulares, que contienen bradizoitos (1.5 X 7.0 μm); cuando el quiste llega al intestino delgado, las enzimas digestivas lo rompen, liberándose los bradizoitos, que invaden a los enterocitos, donde ocurre la reproducción sexual; ahí se forman los gametos masculinos y femeninos, que al fusionarse forman una estructura llamada ooblasto, el cual da origen al ooquiste no esporulado (estadio no infectante, mide 11-13 μm); éste es liberado al ambiente con las heces, y bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas esporula volviéndose infectivo en 24 a 48 horas (Smith, *et al.*, 2002). Los ooquistes pueden permanecer viables hasta 18 meses en tierra húmeda, arena u otro sustrato, y son resistentes a temperaturas bajas y a periodos cortos de deshidratación (Figura 1). Un felino puede eliminar millones de ooquistes durante 3 a 18 días post-infección (Tenter, 2009).

La fase asexual se lleva a cabo en los hospederos intermediarios o definitivos, dentro de los cuales se liberan los esporozoitos de los ooquistes o los bradizoitos de los quistes, quienes atraviesan la pared intestinal y se diferencian a taquizoitos, los cuales se replican de manera rápida dentro de una vacuola (denominada "parasitófora") dentro de cualquier célula nucleada. Los taquizoitos son las fases de reproducción rápida y miden 2.0 X 6.0 μm se replican asexualmente por *endodiogenia*, proceso mediante el cual a partir de un parásito se producen dos individuos genéticamente iguales dentro de la célula original, o *madre*; así los taquizoitos se replican dentro de la célula hospedera hasta lizarla y son liberados

para invadir a otras. El taquizoito puede cambiar al estadio de bradizoito (forma de reproducción lenta, mide 1.5 X 7.0 μm), el cual puede formar quistes en diferentes tejidos u órganos (músculo estriado esquelético, cardíaco, cerebro, bazo, hígado, ojos, entre otros); estas formas pueden permanecer en ellos por tiempo indefinido (Figura 2).

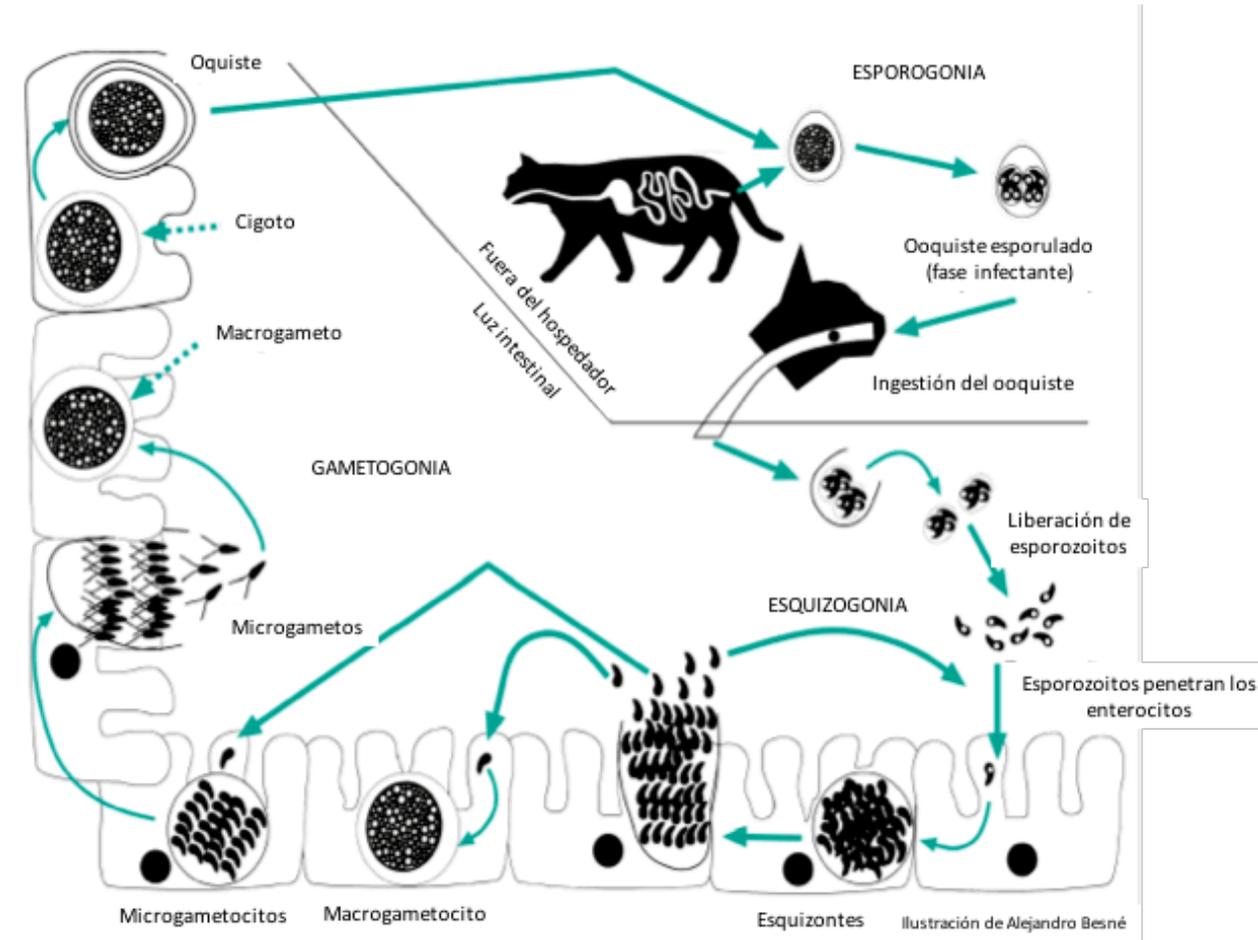


Figura 1. Reproducción sexual de *Toxoplasma gondii*. La esquizogonia se repite hasta 5 veces, antes de que los esquizontes se vuelvan microgametos (masculinos) o macrogametos (femeninos). La esporogonia se realiza en 24 a 48 horas dependiendo de la temperatura y la humedad ambiental. Ilustración original de Alejandro Besné Mérida, 2004.

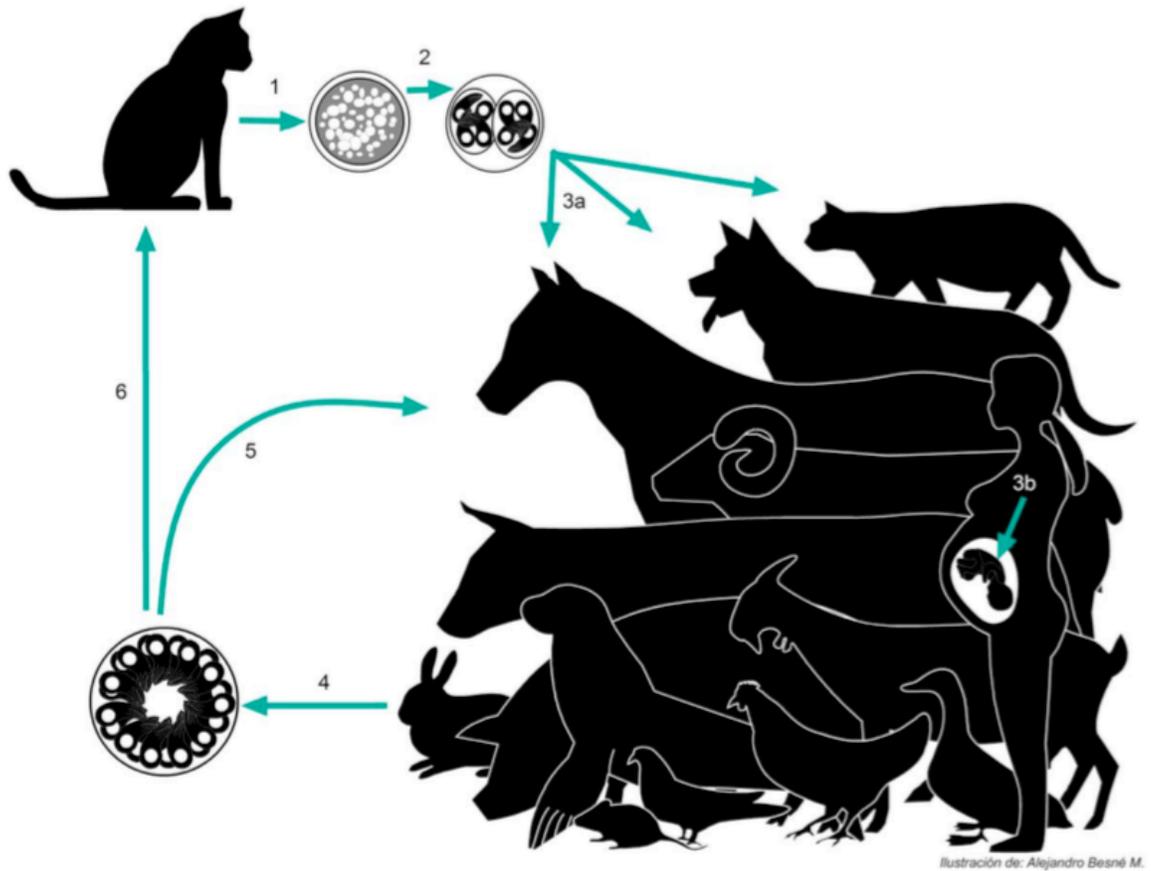


Ilustración de: Alejandro Besné M.

Figura 2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*; (1) Eliminación del ooquiste no esporulado, (2) Esporulación del ooquiste en el ambiente, (3a) Ingestión del ooquiste esporulado y comienzo de la reproducción sexual y asexual, (3b) transmisión placentaria o congénita, (4) Formación de los quistes tisulares, (5 y 6) Ingestión del quiste tisular. Ilustración original de Alejandro Besné Mérida, 2004.

3.2.3. Invasión celular por *Toxoplasma gondii*

La invasión celular es decisiva para la supervivencia y el éxito biológico de *T. gondii*, ya que, al replicarse, lisa a la célula y liberar nuevas clonas, permite al parásito diseminarse ampliamente en el hospedador afectado.

Es un evento dinámico, gracias a plasticidad de su citoesqueleto y a su constante movimiento (sistema de flexión y rotación llamado “gliding”), el parásito adapta una forma ondulada, se desplaza para hacer contacto con la superficie de la célula hospedera. El complejo apical (sistema motor de actina-miosina), que dirige al mecanismo de locomoción del parásito, está íntimamente relacionado con el complejo membranoso interno y las proteínas de adhesión transmembranales secretadas por los micronemas (MICs) (Cesbron-Delauw, *et al.*, 2008), las cuales, secretan su contenido por la fusión de la porción final del extremo apical con la membrana plasmática de la célula del hospedador. La secreción de proteínas ocurre continuamente conforme el parásito se desliza sobre la superficie, cubriendo la membrana celular del hospedador y el plasmalema parasitario, inmediatamente después, el contenido del cuello de las roptrias (proteínas RON) es excretado a través del conducto apical, que se asocian con la proteína AMA1 de los micronemas a nivel del punto de unión, posicionando estrechamente las membranas plasmáticas de la célula del hospedador y del parásito (Blader *et al.*, 2015; Boothroyd y Dubremetz, 2008; Carey *et al.*, 2004; Carruthers, 2002; Carruthers y Boothroyd, 2007; Del Carmen *et al.*, 2009; Laliberté y Carruthers, 2008; Mondragon y Frixione, 1996; Sibley, 2003). Posteriormente, el sistema contráctil de actina-miosina, dependiente de calcio, se encarga de la penetración del parásito a la célula mediante el conoide y el complejo apical (unión móvil o MJ). El movimiento rotatorio constante, así como la secreción de proteínas, hacen que el parásito presione la membrana plasmática de la célula hasta lograr penetrarla y formar la vacuola parasitófora (VP), la cual es de tipo no fusogénica. Las proteínas y lípidos del bulbo de las roptrias (ROP) son inyectadas al interior de

la célula del hospedador, y una vez dentro, se reconfiguran formando pequeñas vesículas que se fusionan con la VP, favoreciendo la entrada del parásito a la célula del hospedador (Figura 3). El movimiento rotatorio excluye la mayoría de los componentes de la superficie, siendo pieza clave de la sobrevivencia al evitar la acidificación y fusión con los sistemas endocíticos y lisosomales. Minutos después de la penetración del parásito, los gránulos densos (GRA's), vierten su contenido al interior, modificando las condiciones de la VP, reclutando mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso de la célula hospedadora, favoreciendo la adquisición de nutrientes y regulando el tráfico de proteínas (Carruthers *et al.*, 2002; 2007; Del Carmen *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2002; Rome *et al.*, 2008).

Dentro de la célula, el taquizoíto mantiene su forma, delimitado por la VP, la que cual tiene un sistema membranoso túbulo-vesicular interno, que le confiere estabilidad y protección contra los mecanismos de defensa del hospedero. El taquizoito intracelular se multiplica asexualmente por endodiogenia, dónde a partir del primer parásito (célula progenitora) y se forman dos parásitos y quedan adheridos al cuerpo residual del primer parásito; esta replicación se repite hasta que cada VP tiene de 16 a 32 parásitos, esta acción puede ser o no sincronizada, por lo que su disposición en la VP puede ser aleatoria. Una vez que están completamente formados con todos sus organelos, lisan a la célula y pueden invadir nuevas células circundantes. La replicación o clonación de un nuevo zoito culmina en aproximadamente 4 a 8 horas, post-infección celular (Contreras-Ochoa, *et al.*, 2013; Dubey, 2009; Hill *et al.*, 2007).

A la par de coordinar la invasión celular, mantener la VP y replicarse, el parásito tiene la capacidad de evitar la activación de vías celulares de autodestrucción como la apoptosis (Laliberté y Carruthers, 2008; Kim, 2013), lo que permite sobrevivir sin ser eliminado por la célula.

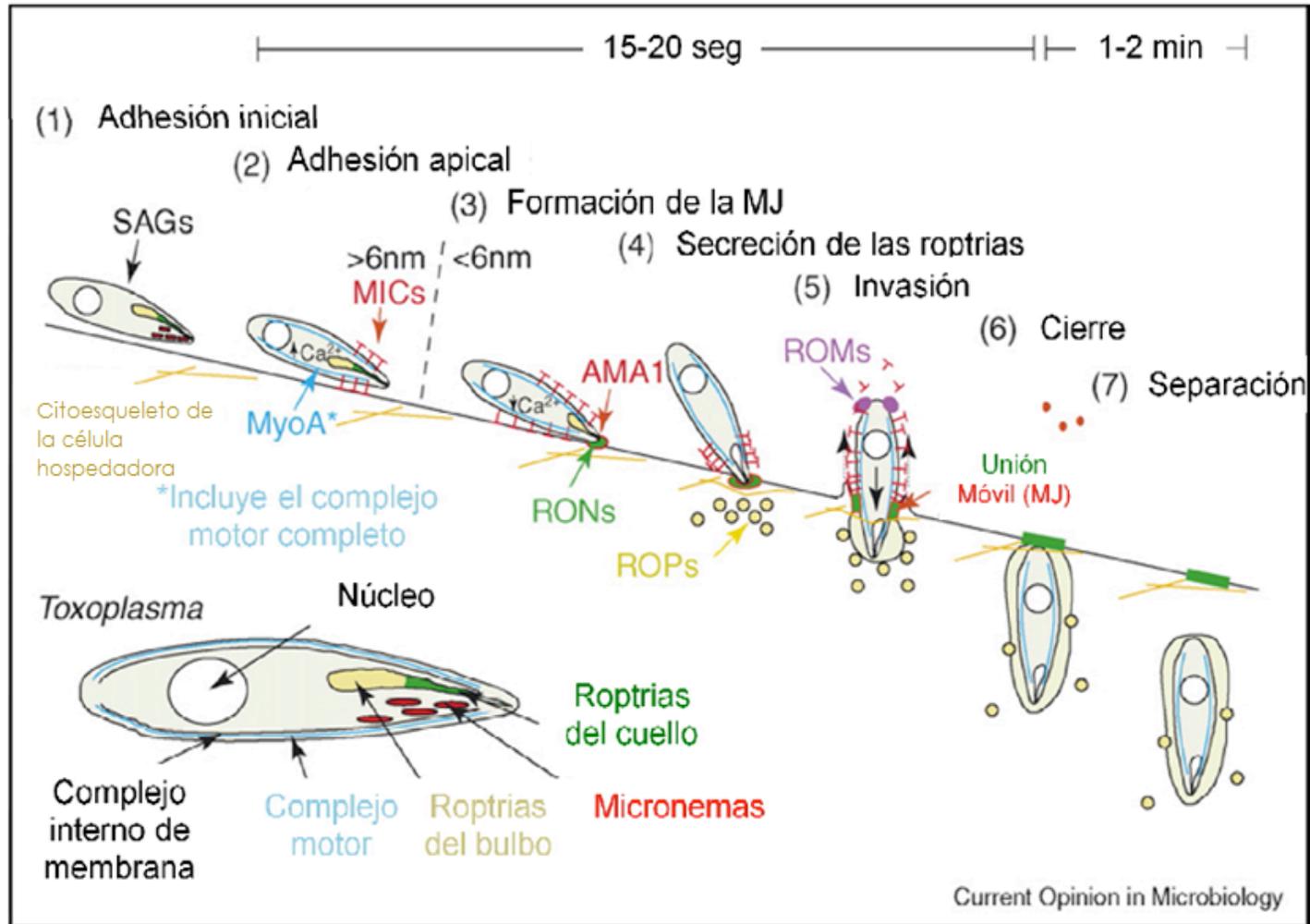


Figura 3. Proceso de invasión por *Toxoplasma gondii* (Tomado y modificado de Carruthers & Boothroyd, 2007).

3.2.4. Respuesta ante una infección por *Toxoplasma gondii*

El alcance que tendrá la infección por *T. gondii* depende en parte de la capacidad del hospedador de controlar la infección activando diversos mecanismos de respuesta, y en otra parte de la capacidad del parásito de evadirlos y asegurar su supervivencia.

Una célula tiene diferentes mecanismos (tráfico intracelular) para introducir, transitar, exocitar y eliminar (por ejemplo fagocitar) moléculas, partículas u otros organismos que lleguen a estar en contacto con ella (Cheville, 2009a); por ejemplo en una infección aguda por *Toxoplasma gondii*, el organismo que ha sido infectado va a reaccionar con una respuesta, la innata, que es mediada por neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NKs), a través de fagocitosis (Figura 4) o citotoxicidad celular; estos mecanismos de respuesta son muy eficientes y evitan que el patógeno que está ocasionando la infección proliferare. Además de esta respuesta hay reconocimiento de patrones moleculares del parásito a través de los receptores tipo Toll (TLRs), principalmente los tipo 2 y 4 (TLR2 y TLR4), así como detección por las células dendríticas (CDs) que interactúan con receptores tipo Toll 11 (TLR11).

Los macrófagos y las células dendríticas activadas presentan antígenos y producen citocinas como la IL-12, induciendo una respuesta mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+, desencadenando una respuesta inmune TH1, que estimula a células asesinas (NKs) e incrementa la producción de interferón gama (INF- γ), el cual es muy importante, ya que activa a otros tipos celulares y su señalización activa algunas vías (por ejemplo STAT9), las cuales limitan la replicación del parásito mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), regulando la producción de óxido nítrico (NO-), y alterando el metabolismo celular; el INF- γ también activa la fagocitosis, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, siglas en inglés) y la apoptosis de células infectadas (Correa *et al.*, 2007; Hunter y Sibley, 2012). Esta es una respuesta tipo TH1, que induce inflamación, la cual es necesaria para el control de la diseminación del parásito;

sin embargo, si no es regulada, puede ser agresiva, llegando al extremo de matar al hospedador; la regulación es efectuada por citocinas T reguladoras como la IL-10 y el TGF- β o directamente por células reguladoras (como las CD4+ Foxp3+) (Olguín et al., 2015). Por otro lado, si se genera un ambiente TH2 en la etapa temprana de la infección, con las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, la primera disminuye la producción del INF- γ , por lo que el parásito puede proliferar sin ser controlado (Correa *et al.*, 2007).

Otra vía de control de la proliferación del parásito es mediante los anticuerpos; a partir del tercer día aparecen los anticuerpos clase IgM a nivel sistémico, a nivel de mucosas se presenta la IgA, y a partir del día 10, las cuatro clases de IgG, la IgG1 y la IgG3 actúan como opsoninas, fijan complemento y son mediadoras de ADCC, por lo que su presencia favorece la destrucción del parásito; las subclases IgG2 e IgG4 actúan como neutralizantes protegiendo a las células; la IgE es pobremente producida pero se ha llegado a asociar con mal pronóstico en la toxoplasmosis adquirida y congénita (Correa *et al.*, 2007) (Figura 5).

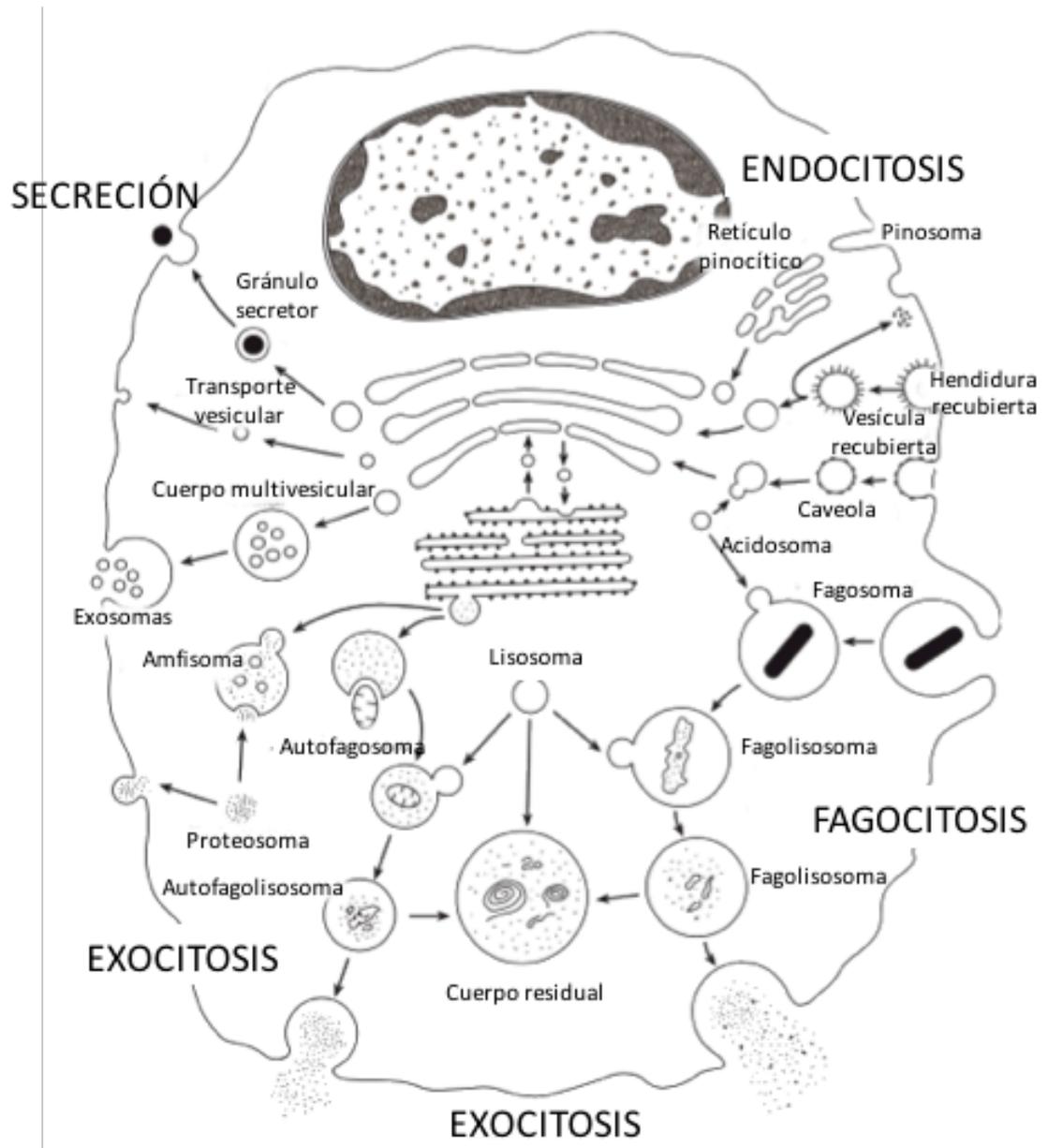


Figura 4. Organelos y tráfico intracelular. Endocitosis: proceso de internalización celular de partículas, fluidos y macromoléculas, a través de la formación de vesículas por invaginación de la membrana de la célula; el contenido de esta vesícula endocítica puede ser transitado por la célula y ser secretado/exocitado posteriormente sin tener cambio alguno. Fagocitosis: proceso de internalización de la partícula, macromolécula o patógeno mediante la modificación de la membrana celular e invaginándola a través de pseudópodos a un fagosoma (vesícula); el fagosoma se fusiona con otras vesículas y organelos para ser degradada a través de diferentes enzimas y posteriormente exocitar su contenido. Tomado y modificado de Cheville, 2009.

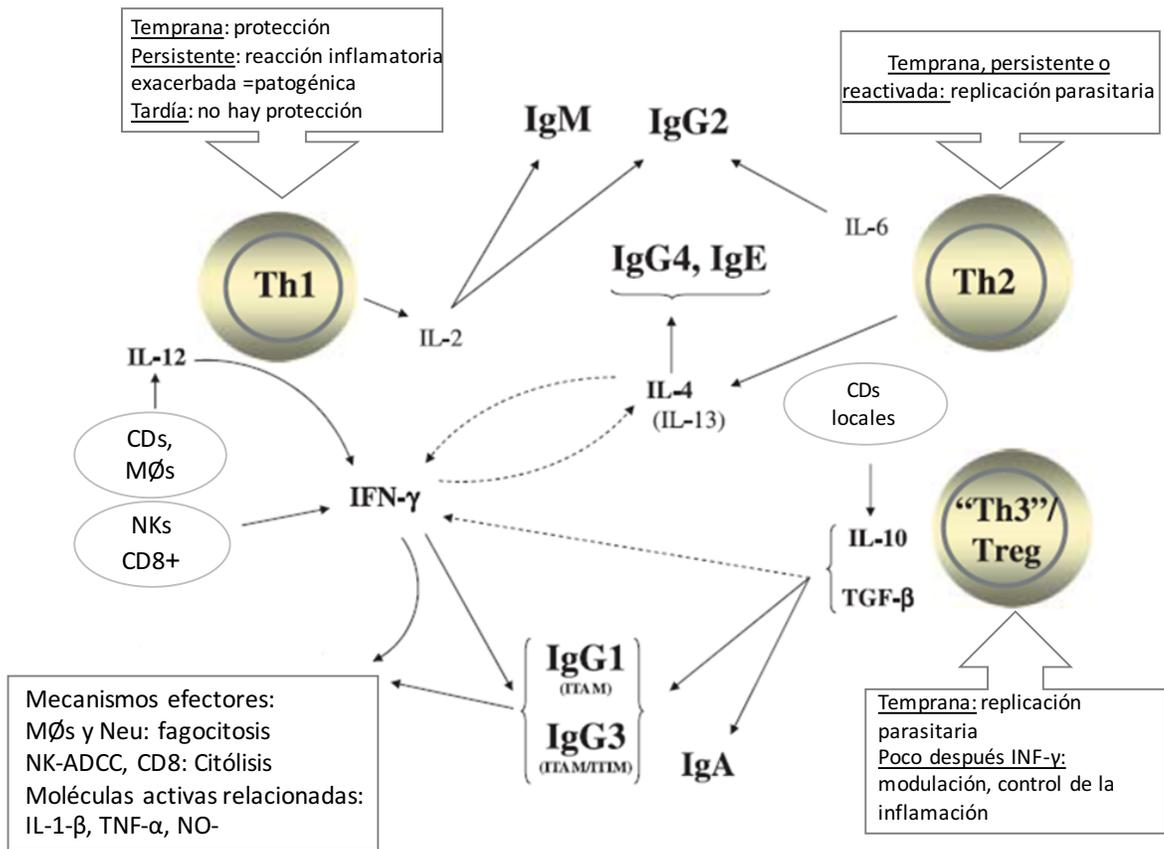


Figura 5. Representación de los fenómenos inmunológicos durante la toxoplasmosis adquirida. ADCC: Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos; CDs: células dendríticas, ITAM: señal intracelular de activación de macrófagos y células asesinas naturales (NK); ITIM: señal intracelular de regulación en células B; MØs: macrófagos; Neu: neutrófilos; las líneas continuas es regulación positiva, las líneas punteadas es regulación negativa. Tomado y modificado de Correa *et al.*, 2007.

3.2.5. Papel de los receptores para Fc de IgG en la infección por *Toxoplasma gondii*

Existen parásitos intracelulares que se ayudan de diversos mecanismos para internalizarse a una célula, uno de estos mecanismos es por el reconocimiento específico de receptores y anticuerpos, que facilitan su adhesión y posterior entrada a la célula (Joller *et al.*, 2011) (Figura 6); este tipo de interacción permite que el organismo que está siendo reconocido se internalice y pueda seguir con su ciclo de vida, sin embargo la célula también puede identificarlos y eliminarlos utilizando este mecanismo de reconocimiento. En el caso de *Toxoplasma gondii*, no se ha documentado formalmente que utilice la estrategia antes mencionada (reconocimiento por receptores y anticuerpos específicos) con el fin de adherirse a la superficie de la célula hospedera y posteriormente internalizarse.

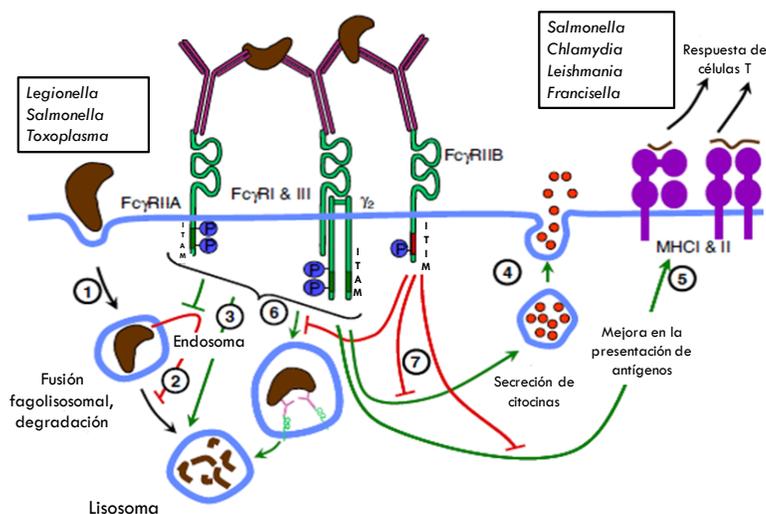


Figura 6. Respuesta mediada por receptores ante un patógeno. Al entrar un patógeno a una célula se desencadenan diversos mecanismos de respuesta dependiendo de la unión que haga con el receptor: 1) dentro de un fagosoma hay fusión con los lisosomas; 2) puede evitar maduración del fagolisoma o la fusión de un endosoma con los lisosomas; 3) la activación de los FcRs y la maduración de los fagolisomas finaliza con la degradación del patógeno; 4) se induce la secreción de citocinas y 5) presentación de anticuerpos para inducir una respuesta mediada por linfocitos T; también la activación de los FcRs promueve una endocitosis del parásito; 6) cuando hay efectos inhibitorios no se lleva a cabo la activación en los FcRs, por lo tanto no hay secreción de citocinas, presentación de antígenos y degradación del patógeno. Los receptores transmiten señales mediadas por fosforilación de tirosinas (ITAM) o inhibitorias (ITIM). Tomado y modificado de Joller *et al.*, 2011.

En el caso de la transmisión congénita, existe el cuestionamiento de si estos mecanismos de reconocimiento a través de receptores podrían ser la respuesta a este tipo de transmisión, por ejemplo: algunos autores han propuesto este mecanismo para otros organismos como Citomegalovirus (CVM) (Maidji *et al.*, 2006), donde se propone, que el virus recubierto por anticuerpos IgG podría ser reconocido por el receptor neonatal para Fc (FcRn; “n” de neonatal, originalmente descubierto en el intestino de neonatos) del sincitiotrofoblasto así ser endocitado, transitado y exocitado, facilitándose así su paso y por ende la infección de madre a hijo durante el embarazo (Roopenian y Akilesh, 2007).

La participación de este receptor se propuso debido a que una de sus funciones es mediar la transcitosis de las cuatro subclases de la IgG materna hacia la circulación fetal, tanto a través del sincitiotrofoblasto, como de las células endoteliales de los vasos fetales (FECs), además de que estas IgGs pueden acarrear antígenos que circulan en forma de complejos inmunes (Moncada *et al.*, 2006a; Radulescu *et al.*, 2004; Roopenian y Akilesh, 2007) y transitarlos de la madre al hijo (Figura 7). Las cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) se unen al FcRn y son endocitadas mediante esta unión, posteriormente son transportadas al otro lado de la célula y son exocitadas, por lo que literalmente las transitan de la sangre materna hacia la fetal. Existen diferencias de afinidad y por tanto de transporte entre las 4 subclases de IgG, la más abundante y con mayor afinidad por el FcRn es la IgG1, seguida de la IgG4, la IgG3 y finalmente la IgG2 (Radulescu *et al.*, 2004), razón por la cual este tipo de inmunoglobulinas se han utilizado en modelos *in vitro*, por ejemplo, con células endoteliales de líneas semi inmortales (HMEC-1: células endoteliales de microvasculatura) y de cultivos primarios (HUVEC: células endoteliales de macrovasculatura de cordón umbilical) los cuales han sido empleados como modelos de mecanismos de transcitosis celular a través de receptores (Ortiz-alegría *et al.*, 2016).

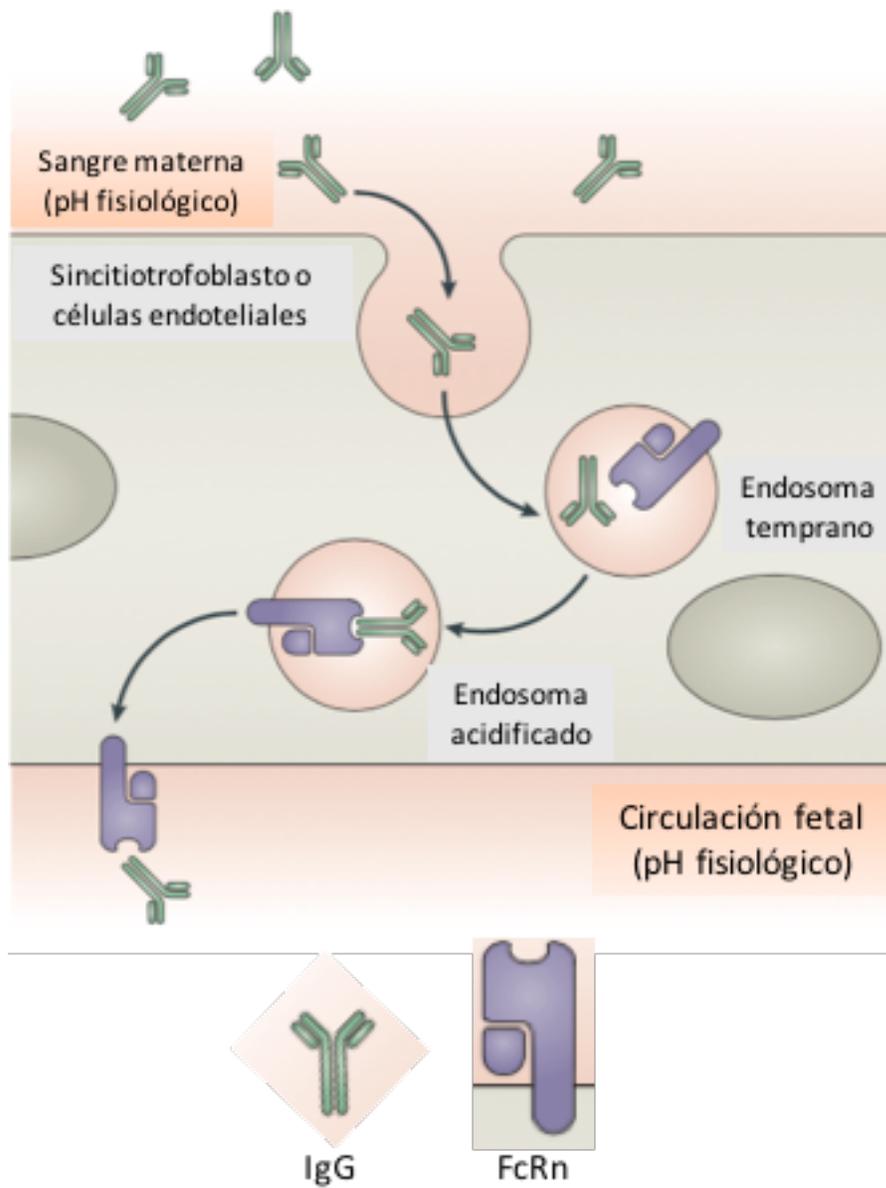


Figura 7. Transporte perinatal de IgG mediada por el FcRn. En humanos la IgG materna se encuentra en la sangre, ésta se une al receptor neonatal para Fc del sincitiotrofoblasto o células endoteliales de la placenta, son endocitadas en endosomas tempranos y al acidificarse el endosoma es transitada hacia la circulación fetal, dónde es liberada a pH fisiológico. Tomado y modificado de Roopenian y Akilesh, 2007.

3.3. Respuesta inmune en la gestación

En un organismo gestante, la respuesta inmune puede variar, pues está regulado por el sistema inmune intimamente ligado con el sistema endócrino, ya que se considera que está ocurriendo un fenómeno inflamatorio, en donde se encuentran en abundancia células especializadas como las uNKs (células asesinas naturales uterinas), macrófagos, citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-15, IL-18) y quimiocinas, que mantienen el útero sin agentes infecciosos que pudieran dañar la implantación, crecimiento del embrión para que al término de la gestación exista un nuevo evento de inflamación (parto) y se libere el producto con éxito (Correa *et al.*, 2007).

Cuando existe una infección por *T. gondii* durante la gestación, la respuesta inmune es variable de acuerdo a la etapa de la gestación en la que ésta se presente. Durante el primer trimestre, la respuesta inmune del embrión se considera inmadura, a excepción de algunos componentes de la respuesta innata; por lo tanto, la invasión por *T. gondii* (frecuencia del 2 al 14% de los casos) tendría efectos negativos con consecuencias graves, como abortos. Se ha especulado que una causa indirecta de aborto podría ser la liberación de varias citocinas por uNKs (células asesinas naturales uterinas) y otras células que inducen a moléculas como el INF γ , TNF α , IL-12, IL-5 e IL-8; causando una reacción inflamatoria descontrolada, y de esta forma se podría inducir aborto sin invasión en el embrión o reabsorciones embrionarias. En el segundo trimestre, esta tasa de transmisión aumenta y el daño en los fetos es resultado de la presencia del parásito, de la producción de citocinas, factores de regulación de inflamación, linfocitos T y B y hay mayor paso de inmunoglobulinas IgGs de la madre al hijo, teniendo como consecuencias: el nacimiento prematuro, cuadros neurológicos severos, afectaciones visuales y auditivas. En el tercer trimestre la transmisión madre-hijo aumenta sustancialmente (50-80%), sin embargo la mayoría de los bebés que tienen la infección nacen asintomáticos, con la posibilidad de que desarrollen secuelas posteriormente (meses o años), las cuales pueden ser

oftalmológicas, auditivas o neurológicas (Cañedo-Solares, *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2007b; Dunn *et al.*, 1999) (Figura 8).

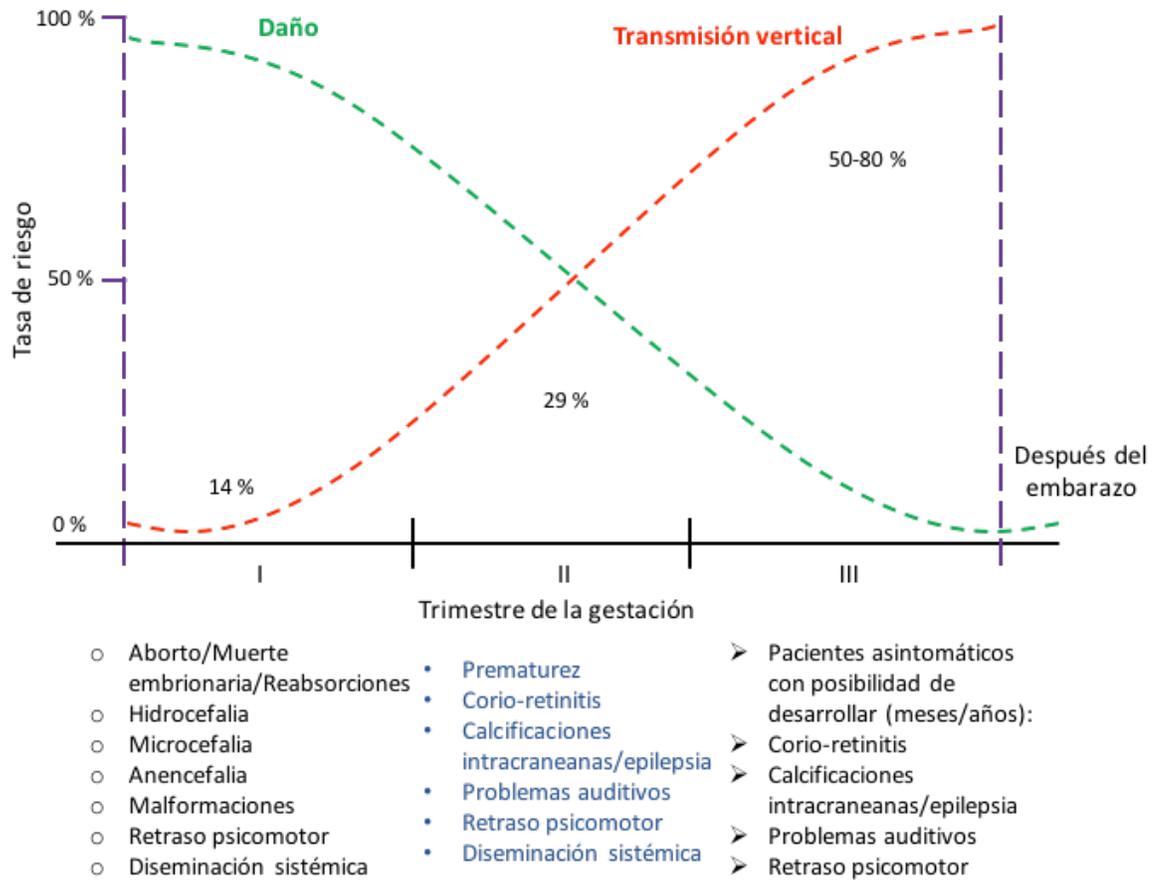


Figura 8. Representación de la transmisión vertical de *T. gondii* en una madre gestante y el daño fetal en los diferentes trimestres de la gestación. El daño causado por el parásito es inverso a la frecuencia de la transmisión vertical, es más frecuente en el primer trimestre de la gestación y las afectaciones son muy graves; esto disminuye hacia el segundo y tercer trimestres. Tomado y adaptado de Dunn *et al.*, 1999 y Correa *et al.*, 2014, Infecciones congénitas y perinatales; una visión integral.

3.4. Línea celular semi-inmortal de microvasculatura humana HMEC-1

Toxoplasma gondii tiene una gran capacidad de adaptación a invadir a cualquier célula, por lo que los estudios *in vitro* enfocados a la invasión han sido variados y se han utilizado diversos tipos celulares para experimentación, un ejemplo son las células endoteliales de microvasculatura. Algunas de las funciones de estas células son: fungir como barrera semipermeable, regulación de intercambio de solutos, transcitosis de proteínas, y participación en reacciones inmunológicas e inflamatorias (Botero-Kleiven *et al.*, 2001; Predescu *et al.*, 2007). Las células HMEC-1 (comerciales), son una línea de células endoteliales semi-inmortal, utilizadas en diversos estudios *in vitro*; éstas células fueron caracterizadas por Ades y colaboradores (1992), las cuales fueron transfectadas por el antígeno T de virus 40 de simio, confirmándose que mantienen características de células endoteliales, siendo su crecimiento y características celulares similares a las HUVECs (Células endoteliales de cordón umbilical), ya que tienen expresión del factor Von Willebrand y epítomos de superficie como CD31 (molécula involucrada en la angiogénesis) la unión a lectinas, la incorporación de lipoproteínas acetiladas de baja densidad, y patrones de expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E-Selectina, además de diversas citocinas.

Debido a estas características celulares se considera que la línea celular HMEC-1 es un buen modelo para estudiar la invasión celular por diversos parásitos y virus, así como la proliferación de éstos; también permiten mantener el cultivo celular bajo condiciones experimentales por el tiempo que sea requerido para su posterior análisis (Cañedo-Solares *et al.*, 2013; Ortiz-Alegría *et al.*, 2016).

4. Planteamiento del problema

Se sabe que uno de los mecanismos principales de control de la replicación del taquizoito es la fagocitosis y destrucción en fagolisosomas maduros, y que este mecanismo es exacerbado por anticuerpos, principalmente de tipo IgG1, a través de FcRs presentes en los fagocitos profesionales activados por IFN γ . Sin embargo, se ha descrito que los parásitos pueden escapar a la degradación fagocítica, inhibiendo la fusión fago-lisosomal.

Por otro lado, en el sincitiotrofoblasto y el endotelio vascular fetal en las vellosidades coriónicas, el FcRn transporta IgG de las cuatro subclases hacia la circulación fetal; esto lo hace mediante formación de endosomas que pueden contener la inmunoglobulina libre o en forma de complejos inmunes.

En un estudio de corte clínico-básico, se encontró que los anticuerpos maternos de la subclase IgG1 se asocian a problemas clínicos en los recién nacidos infectados por *T. gondii* (Cañedo-Solares, *et al.*, 2008). Esto fue contrario a lo que se esperaba, pues esta subclase de IgG es la principal opsonina y fijadora de complemento, y por ende se asocia con buen pronóstico clínico en adultos. Por lo anterior, y debido a la función del FcRn en la placenta, no es claro si los taquizoitos sensibilizados por anticuerpos son fagocitados por el sincitiotrofoblasto y las células endoteliales fetales y destruidos por fagocitosis, o llevados a compartimentos endosómicos no fagocíticos que permitan al parásito sobrevivir en lugar de destruirlo, e incluso que lo transporten hacia la sangre fetal, teniendo un efecto de “Caballo de Troya”.

5. Hipótesis

In vitro la sensibilización de los taquizoitos de *T. gondii* con anticuerpos IgG1 favorecerá su endocitosis hacia compartimentos no fagocíticos en células endoteliales, permitiendo la sobrevivencia de los parásitos.

6. Objetivo

Comparar el destino intracelular de los taquizoitos de *T. gondii* libres y sensibilizados con anticuerpos de clase IgG1 en células endoteliales *in vitro*.

7. Metodología

7.1. Tipo de estudio

El trabajo de investigación desarrollado fue experimental, transversal, comparativo y analítico.

7.2. Estrategia general

La estrategia general del presente trabajo se representa en la figura 9. Se cultivaron las células HMEC-1 y de manera independiente se obtuvieron taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. Los parásitos fueron incubados en PBS (no tratados), con antisuero anti- *T. gondii* (sensibilizados) y con suero negativo. Posteriormente, se incubaron con las células endoteliales en medio de cultivo durante 2h a 37°C. Se determinó el número de vacuolas parasitóforas por célula y la proporción de células infectadas por microscopía óptica convencional; se determinó el tipo de vacuola que contenía al parásito intracelular, las estructuras asociadas a estas vacuolas y el estado de los parásitos por microscopía electrónica de transmisión.

7.3. Cultivo *in vitro* de la línea celular semi-inmortal de microvasculatura humana HMEC-1

Las células HMEC-1 (CDC/EU HMEC-1), son de una línea celular estable semi-inmortal, proveniente de microvasculatura humana (donación de la Dra. Araceli Paéz, Instituto Nacional de Cardiología). Se cultivaron con base en lo descrito por Ades *et al* (1992), Unger *et al* (2002) y Cañedo-Solares *et al.* (2013), esto es, a 37 °C, con 7% de CO₂, en medio MCDB131 complementado con 1.0 µg/mL de Hidrocortisona, Penicilina G (100 IU/mL), Estreptomina (100 µg/mL) (Gibco, Invitrogen, Grand Island, USA), Anfotericina B (0.025 µg/mL) (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA); 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Hyclone, Utah, USA), 10 mM L-Glutamina y 20 µg/mL de Factor de Crecimiento Endotelial Bovino

(bECGF; Roche, IN, USA); se crecieron en tres resiembras consecutivas en botellas de cultivo de 75 cm² (Cellstar 658170, Greiner Bio-one, Germany), con 8 mL de medio MCDB-131 completo hasta tener más del 90% de confluencia.

Para los experimentos de internalización se cultivaron las células en placas de cultivo de 24 pozos (Corning Costar 3524, USA), con una densidad de 100,000 células por pozo durante 72 h, permitiendo así la formación de una monocapa celular; para aquellos pozos que serían analizados por microscopía óptica, se colocaron cubreobjetos de plástico redondos electro-cargados para cultivo celular de 15mm (Nunc 174969, USA), sobre los cuales se cultivó el mismo número de células.

7.4. Taquizoitos de *Toxoplasma gondii*

Se emplearon taquizoitos de la cepa RH, los cuales fueron mantenidos mediante pases consecutivos en peritoneo de ratón Balb/c; posteriormente fueron colectados, se contaron e inocularon en cultivos confluentes de células Vero crecidos en medio RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, Grand Island, USA) suplementado con Penicilina G (100 IU/mL), Estreptomina (100 µg/mL), Anfotericina B (0.025 µg/mL) (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) y 10% Suero Fetal Bovino (Hyclone, Utah, USA), durante 72 h.

Los parásitos se colectaron del sobrenadante por centrifugación, se contaron y se determinó su viabilidad por exclusión de azul Tripano (dilución 1:10); se emplearon en los experimentos de internalización sólo aquellos en los que su viabilidad fuera mayor al 95%.

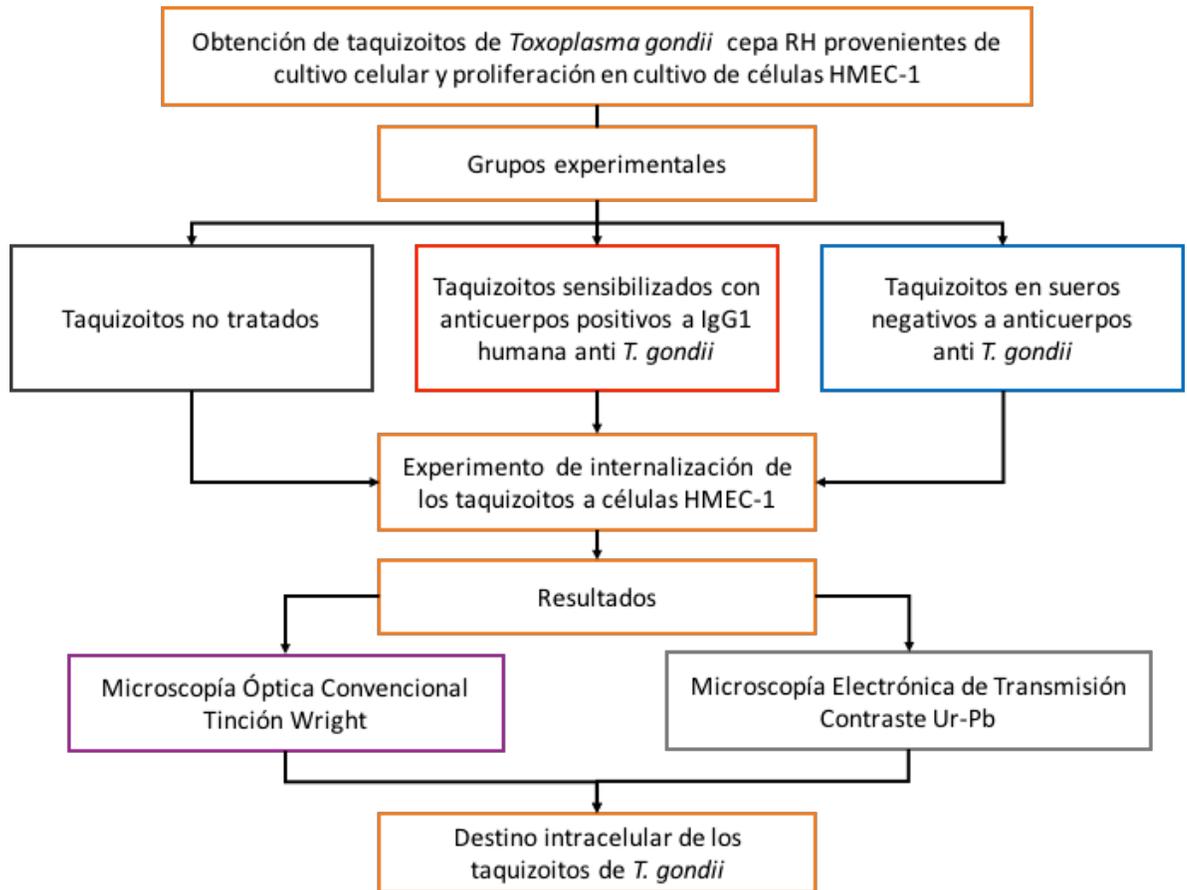


Figura 9. Flujograma de estrategia general

7.5. Diseño y condiciones del experimento

7.5.1 Grupos experimentales

Con el fin de determinar si el recubrimiento de los taquizoitos con anticuerpos influye en su entrada a las células se definieron tres grupos; en el primero se utilizaron taquizoitos no tratados (suspendidos en PBS) o control de invasión; en el segundo grupo, los taquizoitos se suspendieron en una mezcla de anticuerpos positivos a IgG1 humana anti *T. gondii* a una dilución 1:1600 (de acuerdo a lo estandarizado previamente en el laboratorio) y se incubaron a 4°C en agitación suave durante 30 minutos (sensibilizados); el tercer grupo fue de taquizoitos suspendidos en una mezcla de sueros negativos a la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, a una dilución 1:1600 (de acuerdo a lo estandarizado previamente en el laboratorio) a 4°C en agitación suave durante 30 minutos (controles negativos).

7.6. Internalización de taquizoitos

Para evaluar la interacción de los taquizoitos de *T. gondii* con las células HMEC-1, se retiró el medio de cultivo metabolizado por las células y se agregaron 400 µL de medio de invasión con los taquizoitos suspendidos en la cantidad correspondiente a una relación 10:1 parásitos:célula (Cañedo-Solares *et al.*, 2013; Contreras-Ochoa *et al.*, 2013; Saadatnia *et al.*, 2010); se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron 2 h a 37°C con 7% de CO₂, después de lo cual se retiró el sobrenadante con los parásitos libres en el medio, los cultivos se fijaron a 4°C con paraformaldehído al 0.5% para microscopía óptica; para la microscopía electrónica de transmisión, los cultivos se despegaron con Tripsina al 0.25% y se fijaron con solución de Karnovsky (Electron Microscopy Sciences, EMS 15720).

7.7. Microscopía óptica convencional

La microscopía óptica se utilizó para la identificación de parásitos intracelulares en el cultivo celular; los portaobjetos se tiñeron con 300 μL de colorante Wright (Merck cat. 101383) durante 5 minutos, se agregaron 300 μL de agua destilada durante 5 minutos y se lavaron con abundante agua destilada, se secaron al aire y se colocaron cubreobjetos para su evaluación posterior (Cañedo-Solares *et al.*, 2013); las laminillas se revisaron mediante un microscopio Zeiss, modelo Axiovert 200, en inmersión.

En la evaluación de las laminillas, se consideró a una célula infectada a aquella que tuviera al menos un parásito intracelular dentro de una vacuola (halo), por lo que se tomaron fotografías hasta tener 100 células totales (infectadas y no infectadas); a partir de las imágenes digitales se contaron las células que estaban infectadas y se expresó como porcentaje (número de células infectadas por cada 100), también se cuantificó el número de vacuolas en cada célula, tomando como 100% solo a aquellas células que estaban infectadas (Calzada-Ruiz, 2012).

7.8. Microscopía electrónica de transmisión

Para la identificación ultraestructural de los taquizoitos intracelulares se procesaron los cultivos para microscopía electrónica de transmisión, con base en la metodología descrita Cedillo-Peláez (2009), las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 μL y se fijaron con solución de Karnovsky (Paraformaldehído 2%, Glutaraldehído 2.5.%, PBS 0.1M) (Electron Microscopy Sciences, EMS 15720) 72 h a 4°C, lavando entre todos los pasos mediante centrifugación a 4000 rpm. Una vez fijadas las muestras se lavaron con PBS para eliminar los residuos del fijador; se post-fijaron con 1.0 mL de OsO_4 al 1% durante 1:30 h a temperatura ambiente; se deshidrataron con etanol en serie ascendente (30, 50, 70, 90, 100, 100, y 100%), se colocaron en una solución intermedia (óxido de propileno), se pre-incluyeron en una mezcla de óxido-resina epóxica (Embed 812, Electron Microscopy Sciences, EMS 14120) (relación 3:1 2 hrs, 2:1 24 hrs y 1:1 2 hrs), resina pura dos cambios 2 hrs, y se incluyeron en resina pura a polimerizar a 60°C

de 24 a 36 hrs. Se efectuaron cortes semi-finos de 95–100 nm de grosor, en ultramicrotomo Reichert Ultracut, colocándose en portaobjetos convencionales y tiñéndose con azul de Toluidina por 1 o 2 minutos en calor, posteriormente se lavó con abundante agua destilada, se dejó secar al aire y se cubrieron con cubreobjetos, se revisaron en un microscopio óptico Zeiss, modelo Axiostar plus a 40x; una vez revisados los cortes semi-finos se seleccionó el área de estudio para realizar los cortes finos.

Los cortes finos se realizaron con un grosor de 65-80 nm, colocándose en rejillas de cobre de 200 Mesh, las cuales se contrastaron en oscuridad con acetato de uranilo (0.12M), por 15 minutos) y con solución Reynolds (Nitrato de Plomo 0.08M, Citrato de Sodio 0.12M e Hidróxido de Sodio 1N), por 10 minutos. La revisión de los cortes finos se hizo en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss, modelo EM900 (50Kv), tomando imágenes en negativos fotográficos marca Kodak 4489. Los negativos se revelaron en revelador Kodak Dektol (Cat. 5160270) de 15 a 35 segundos, se lavaron con abundante agua y se fijaron con Rapid Fixer Kodak (Cat. 5160353) de 3 a 5 minutos, seguidos de un lavado con abundante agua y se dejaron secar al aire.

La generación de imágenes en positivo fue realizada digitalmente mediante una cámara digital de 12 mega pixeles (Apple Iphone 6S); las imágenes se editaron con el programa GIMP versión 2.8.14.

Se consideraron células infectadas aquellas que tuvieran estructuras parasitarias, con diferente grado de viabilidad (cuadro 1, figura 10) dentro de una vacuola parasitófora, definida de acuerdo a los criterios del cuadro 2.

Para la revisión panorámica de las células invadidas, se revisaron en 3000, 4400 y 7000x; el detalle de los parásitos intracelulares se observaron a 12000x.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante las pruebas de U de Mann-Whitney y Rho de Spearman, para el número de células y la localización de las vacuolas, tipo de vacuolas y viabilidad de los parásitos.

Cuadro 1. Criterios para la identificación ultraestructural de vacuolas con taquizoitos intracelulares de *Toxoplasma gondii* en células HMEC-1

Criterio	Características
Vacuola parasitófora	<p>Membrana trilaminar, definida, continua</p> <p>Presencia de la red túbulo-vesicular en el espacio intravacuolar</p> <p>Organelos de la célula invadida cercanos a la vacuola: núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico o aparato de Golgi, en diferente cantidad</p>
Vacuola endocítica	<p>Definida, continua</p> <p>Espacio intravacuolar discreto, sin presencia de la red túbulo-vesicular</p> <p>Sin presencia de organelos celulares cercanos</p>

Tomado con modificaciones de Cheville, 2009; Dubey *et al.*, 1998; Moncada y Higgs, 2006.

Cuadro 2. Criterios para la identificación ultraestructural de taquizoitos intracelulares de *Toxoplasma gondii* en células HMEC-1

Criterio	Características
Parásitos viables	<p>Forma del parásito arqueada, alargada o corta, oval o piriforme</p> <p>Presencia de organelos definidos: conoide, apicoplasto, roptrias, micronemas, gránulos densos, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias, microporos, apicoplasto y núcleo</p>
Parásitos en degeneración	<p>Modificación en la morfología de los gránulos densos: contracción del material interno electrodensito, dejando un halo o espacio electrolúcido en su interior</p> <p>Aumento de la cantidad de vacuolas electrolúcidas en el citoplasma del parásito</p>

Tomado con modificaciones de Cheville, 2009; Dubey *et al.*, 1998.

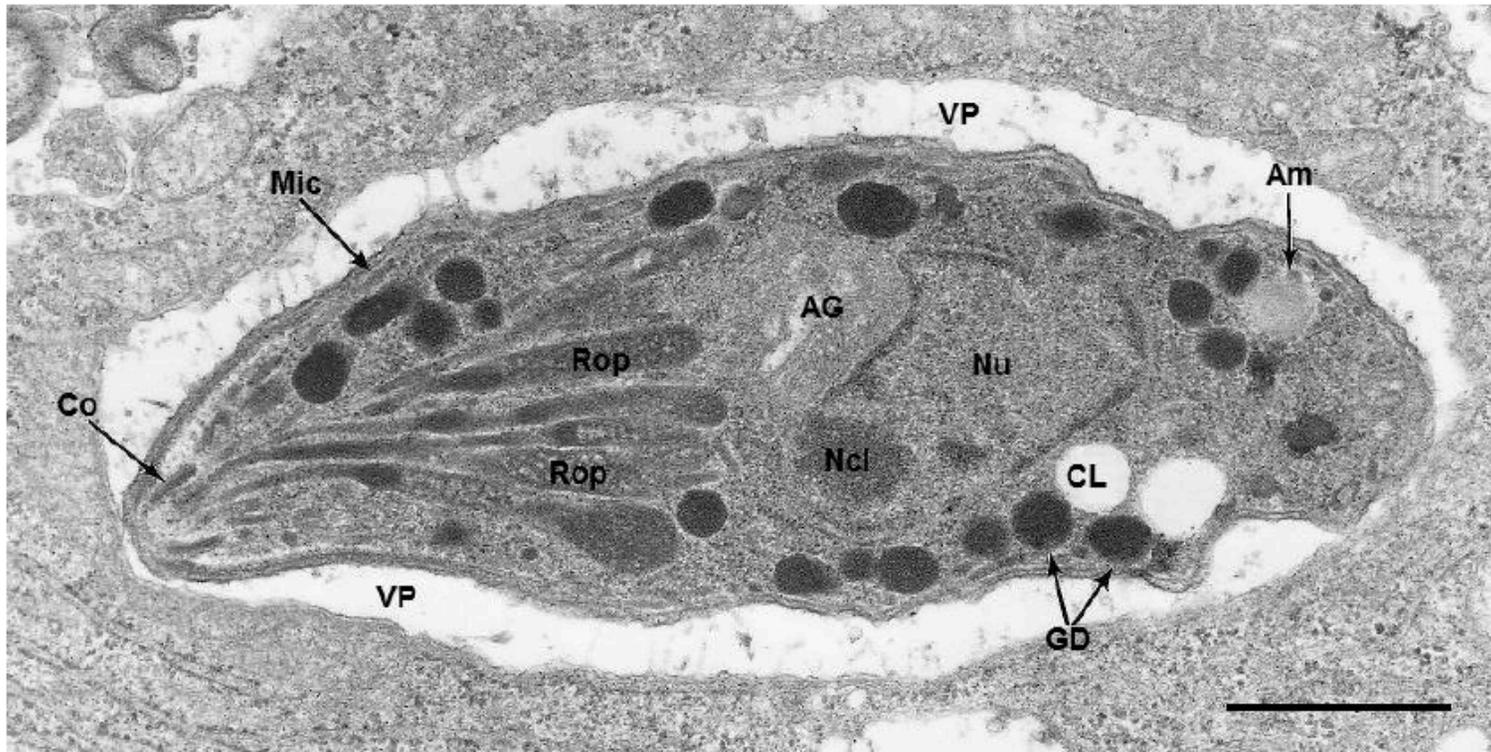


Figura 10. Ultraestructura de un taquizoito de *Toxoplasma gondii*. El taquizoito se encuentra intracelularmente dentro de una vacuola parasitófora (VP); se pueden observar diferentes organelos como: Conoide (Co), Micronemas (Mic), Roptrias (Rop), Aparato de Golgi (AG), Núcleo (Nu), Nucléolo (Ncl), Gránulos densos (GD), Cuerpos Lipídicos (CL) y Gránulos de Amilopectina (Am). Microscopía electrónica de transmisión, Ur-Pb, barra: 1 μ m. Tomado y modificado de: Dubey *et al.*, 1998.

8. Resultados

8.1. Internalización de taquizoitos en células HMEC-1

Por medio de microscopía óptica convencional de laminillas teñidas con Wright se cuantificó el porcentaje de células con parásitos intracelulares en cada grupo (Figura 11), así como el número de vacuolas parasitóforas por célula (Figura 12). En todas las condiciones la mayoría de las células infectadas tenían una vacuola (un parásito) por célula. Los grupos que presentaron mayor número de parásitos por célula fueron aquellos del control de invasión (sólo suspendidos en PBS) y los sensibilizados con anticuerpos de clase IgG1 (Figura 12).

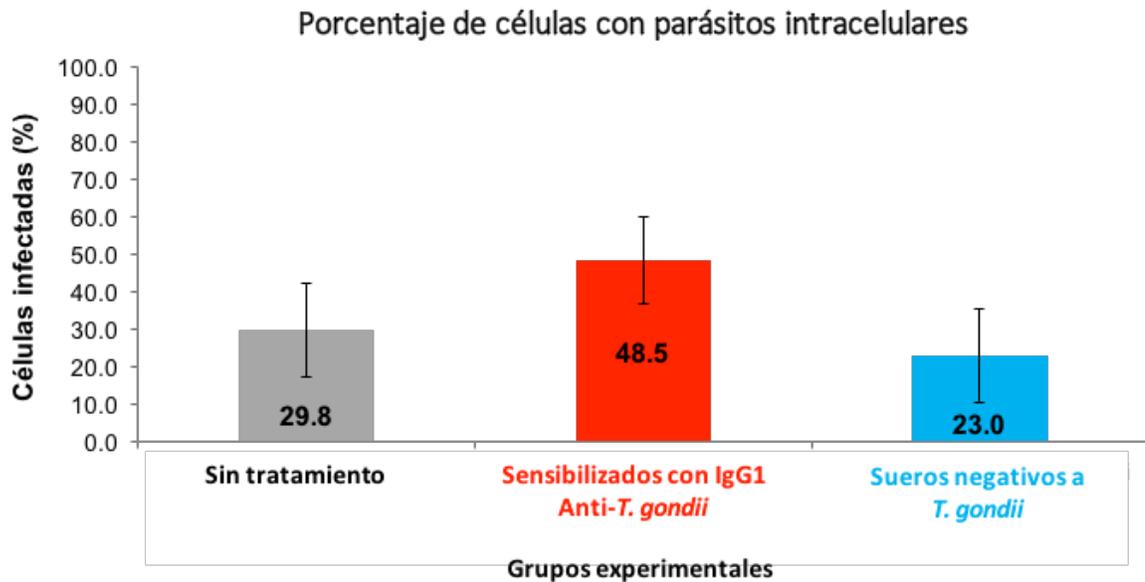


Figura 11. Células HMEC infectadas con los tres grupos de taquizoitos de la cepa RH: 1) taquizoitos sin tratamiento, 2) sensibilizados con anticuerpos IgG1 y 3) con una mezcla de sueros negativos.

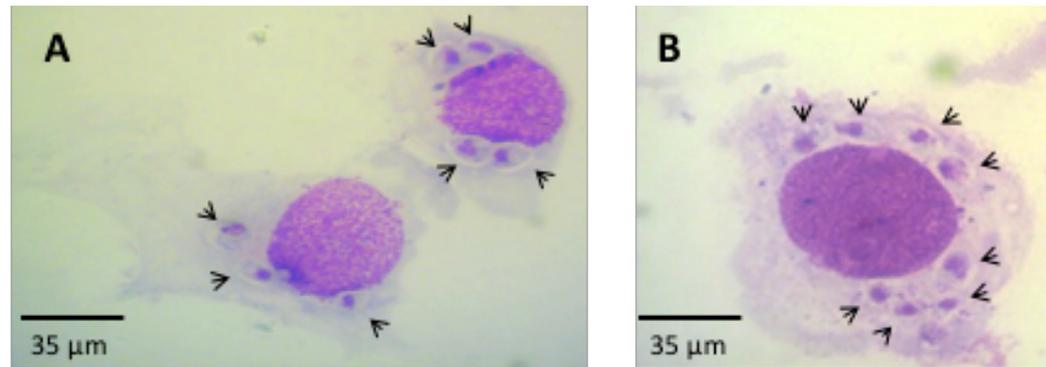
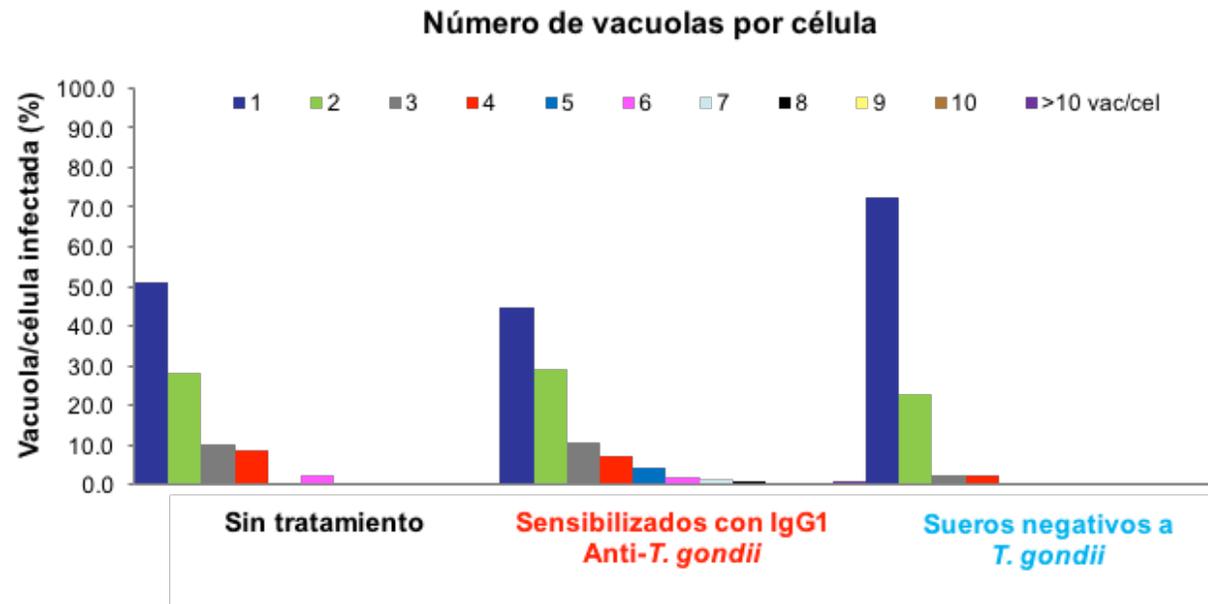


Figura 12. Células HMEC-1 infectadas con los tres grupos de taquizoitos de la cepa RH: 1) taquizoitos sin tratamiento, como controles de invasión; 2) sensibilizados con anticuerpos IgG1 y 3) con una mezcla de sueros negativos. En el panel de abajo: A y B; se muestran dos fotografías representativas de células poco infectadas y multi-infectadas (las flechas señalan los taquizoitos intracelulares).

8.2. Microscopía electrónica de transmisión

Por medio cortes semi-finos se encontraron células de forma redondeada, con discretas proyecciones en sus bordes, bien definidos; las células presentaban moderada cantidad de citoplasma con vacuolas de diferentes tamaños. Los núcleos fueron de tamaño, forma y aspecto variables, desde una forma arriñonada con indentaciones a pleomórficos, solamente algunas de las células presentaban nucléolo. Además de las células descritas, se observaron otras de aspecto pálido, de borde y núcleo indefinidos. En las células parasitadas se distinguió al menos un parásito intracelular en el citoplasma; en ocasiones se pudo distinguir un halo que lo rodeaba (Figura 12-B).

En los cortes finos se observaron células con morfología diversa, desde semi-redondeada a pleomórfica, con discretas o abundantes proyecciones en sus bordes, bien definidas e irregulares. Presentaron moderada cantidad de citoplasma con escasos organelos, principalmente mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso; también se observaron vacuolas electrolúcidas de diferentes tamaños y formas (oval a poliédrica), las cuales ocupaban 30-40% del citoplasma (Figura 13). Los núcleos tenían forma y aspecto diversos, desde arriñonados, segmentados, hasta pleomórficos, con indentaciones, hendiduras o invaginaciones, con variaciones discretas en su tamaño, presentando el arreglo de la cromatina desde fina granular, hasta gruesa y plegada a la periferia; en algunas de las células se observó el nucleolo.

En las células que estuvieron en contacto con los taquizoitos de los tres grupos, se observaron parásitos en vacuolas citoplasmáticas, ya sea cercanas a la membrana celular (periferia) o al núcleo (nuclear). Las primeras correspondieron a vacuolas endocíticas, de acuerdo a los criterios descritos previamente: estructuras de forma redondeada con poco espacio entre el parásito y la membrana de la vacuola; las segundas correspondieron a vacuolas parasitóforas: estructuras de forma variable (redondeada, oval o piriforme) y que contenían una red túbulo-vesicular en el espacio intravacuolar, con evidencia de organelos celulares

(mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso) cercanos a la vacuola, sugerentes de invasión activa (Cuadro 3).

Con respecto a la morfología de los parásitos intracelulares, se encontraron principalmente dos tipos: viables, con organelos visibles y definidos, y en degeneración, con cambios en la morfología y electrodensidad de sus organelos, principalmente los gránulos densos (Cuadro 2); además, presentaron vacuolas electrolúcidas en su citoplasma en cantidad moderada-abundante (Figuras 14-31).

Por otra parte, el tratamiento de los taquizoitos con suero positivo y negativo aumentó el porcentaje de parásitos contenidos en las vacuolas parasitóforas en comparación con el grupo sin tratamiento (PBS), aunque, aparentemente disminuyó su viabilidad; esto fue especialmente notorio para el grupo tratado con suero negativo (Cuadro 3 y 4). En relación a las vacuolas endocíticas, el grupo tratado con PBS tuvo mayor proporción de parásitos en comparación con los otros dos grupos; en este caso también el suero negativo indujo la mayor proporción de parásitos aparentemente dañados que el que contenía anticuerpos de clase IgG1.

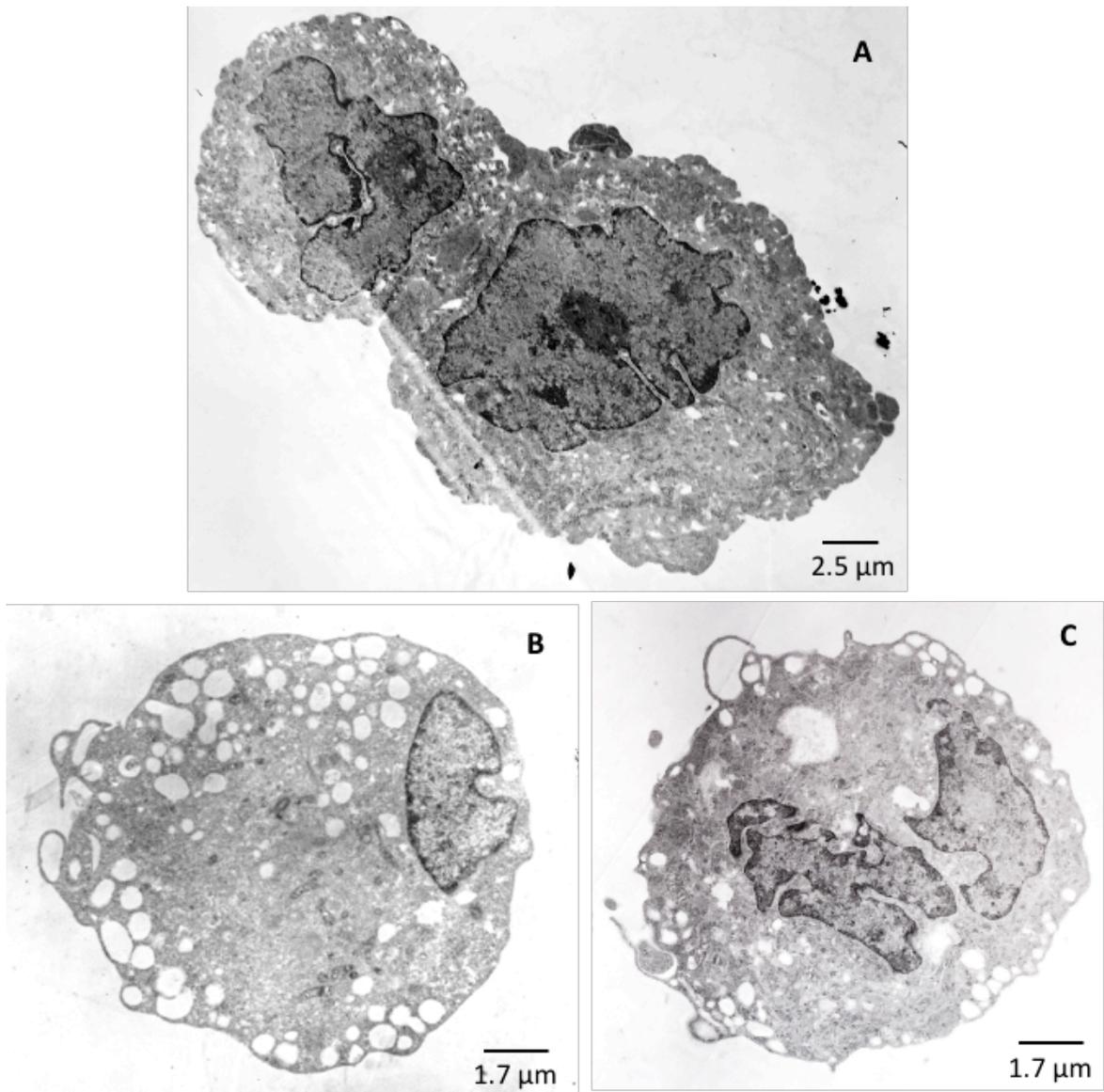


Figura 13. Imágenes ultraestructurales de células HMEC-1 control (no infectadas). Células de forma redondeada (B y C) a pleomórfica (A), con escasas proyecciones del citoplasma; en su interior presentan vacuolas electrolúcidas de tamaños similares en poca o abundante cantidad, así mismo en el citoplasma se observan escasos organelos como mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso; presentan núcleos pleomórficos, centrales o desplazados a la periferia, de bordes irregulares con invaginaciones, y cromatina discreta cantidad. Ur-Pb.

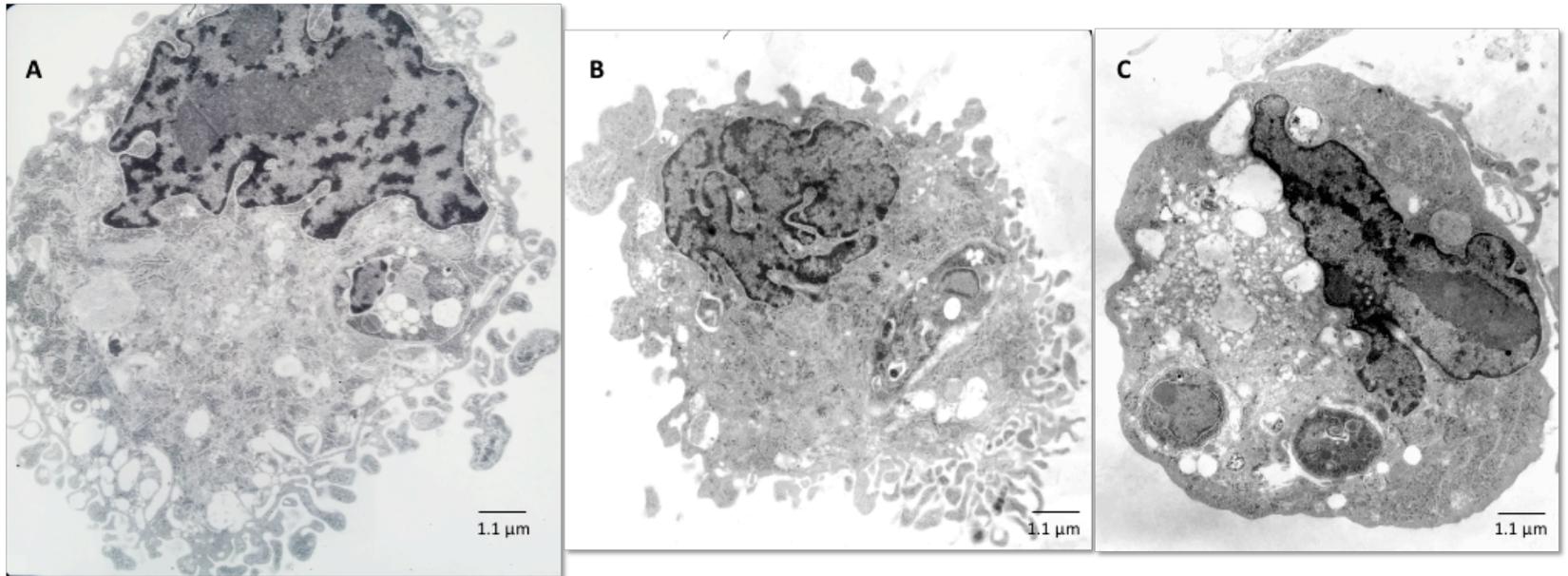


Figura 14. Imágenes ultraestructurales de células HMEC-1 infectadas con parásitos de los tres grupos experimentales. A) Célula con un taquizoito de RH pre incubado con PBS, B) célula con un taquizoito de RH sensibilizados y C) célula con dos taquizoitos de la cepa RH preincubados con suero negativo. Los parásitos se encuentran contenidos en vacuolas parasitóforas o endocíticas, en su interior se observan organelos definidos u opacos.

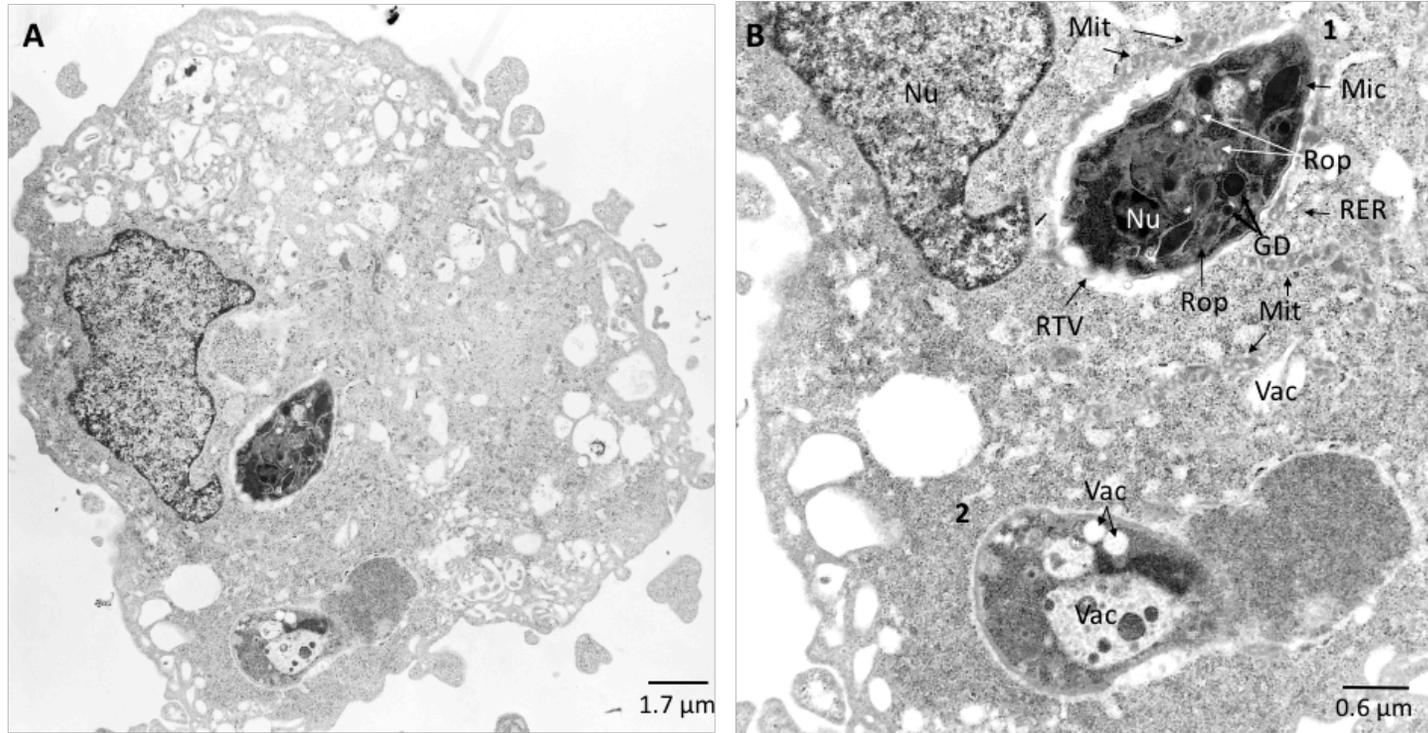


Figura 15. Imagen ultraestructural de una célula HMEC-1 con dos taquizoitos intracelulares de RH pre incubados con PBS:

A) Se aprecia una célula pleomórfica con abundante citoplasma y escasos organelos visibles: mitocondrias (Mit) y retículo endoplásmico rugoso (RER), con numerosas vacuolas en su periferia y núcleo pleomórfico, con cromatina en discreta cantidad, plegada a la periferia;

B) En el interior del citoplasma se observan dos estructuras parasitarias contenidas en vacuolas independientes:

1. Estructura contenida en una vacuola cercana al núcleo de la célula, en cuyo espacio intravacuolar se aprecia una red túbulo-vesicular (RTV), así como organelos celulares cercanos (Mit, RER), sugerente de vacuola parasitófora; presenta forma piriforme, en su interior se aprecian diferentes organelos: micronemas (Mic), gránulos densos (GD), roptrias (Rop), núcleo (Nu) y vacuolas (Vac) electrolúcidas en discreta cantidad; dichos organelos se encuentran distribuidos en todo el cuerpo del parásito.
2. Estructura parasitaria contenida en una vacuola en la periferia de la célula, sugerente de endocítica, el espacio intravacuolar es angosto en la parte posterior y en la parte anterior se observa un mayor espacio, no se observan organelos celulares cercanos; el parásito presenta una forma piriforme, en su interior se observan organelos opacos y poco definidos, así como vacuolas electrolúcidas de diferente tamaño y en abundante cantidad, sugerente de degeneración; en la parte anterior de esta estructura se encuentra asociada una vacuola con material de moderada electrodensidad no identificado. Ur-Pb.

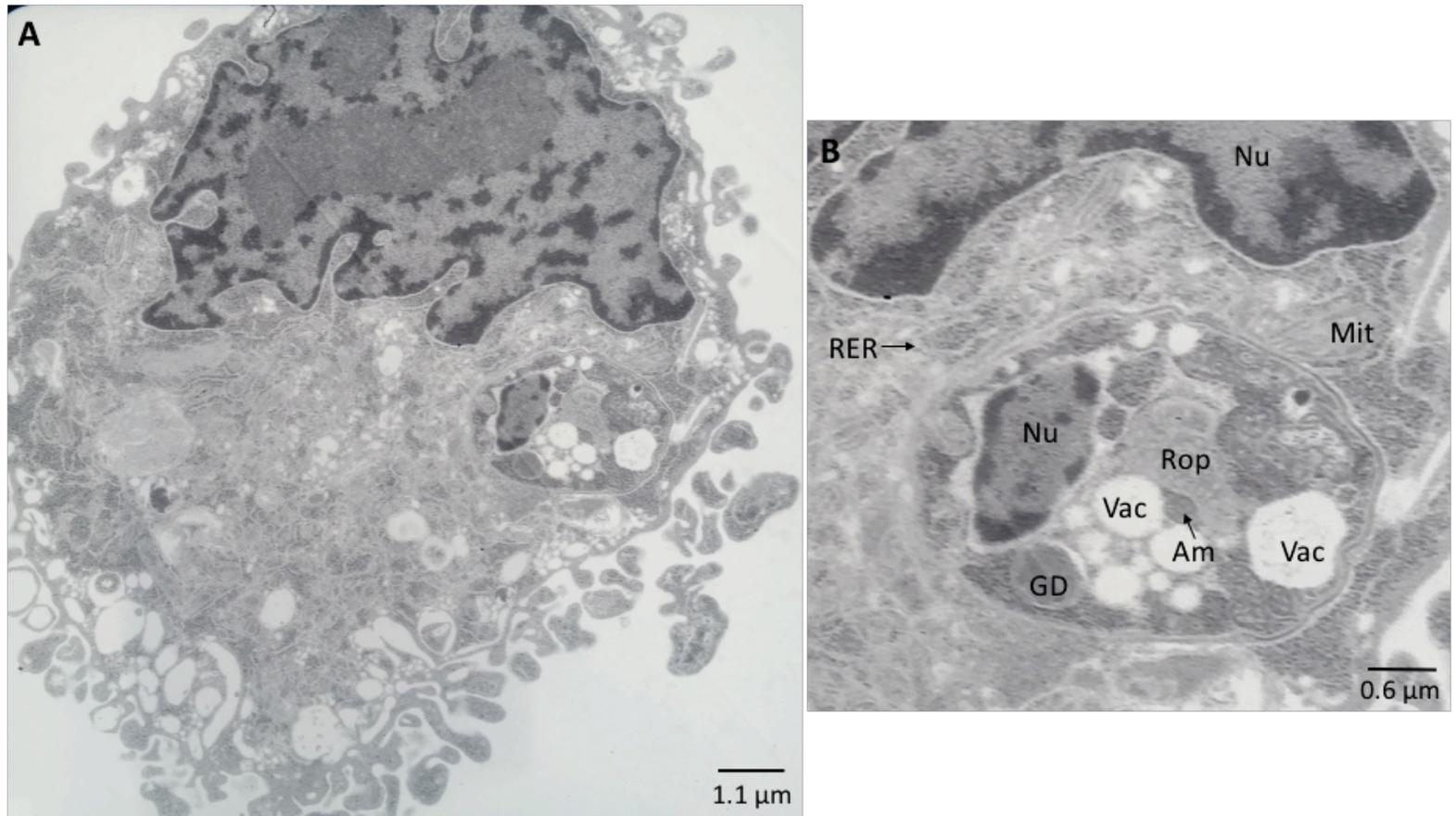


Figura 16. Imágenes ultraestructurales de una célula HMEC-1 con un taquizoito de RH pre incubado con PBS.

A) Se aprecia una célula semi-redonda con abundante citoplasma, con numerosas vacuolas en su periferia, núcleo pleomórfico con invaginaciones marcadas, la cromatina se encuentra en discreta cantidad plegada a la periferia. B) Cercana al núcleo de la célula se observa una estructura parasitaria contenida en una vacuola, el espacio intravacuolar es estrecho y se observan mitocondrias (Mit) y retículo endoplásmico (RER) cercanas a esta estructura, sugerente de vacuola parasitófora. Esta estructura parasitaria presenta forma semi-redonda, en su interior se aprecian diferentes organelos: gránulos densos (GD), gránulos de amilopectina (Am), roptrias (Rop), núcleo (Nu), así como vacuolas electrolúcidas en abundante cantidad. Ur-Pb.

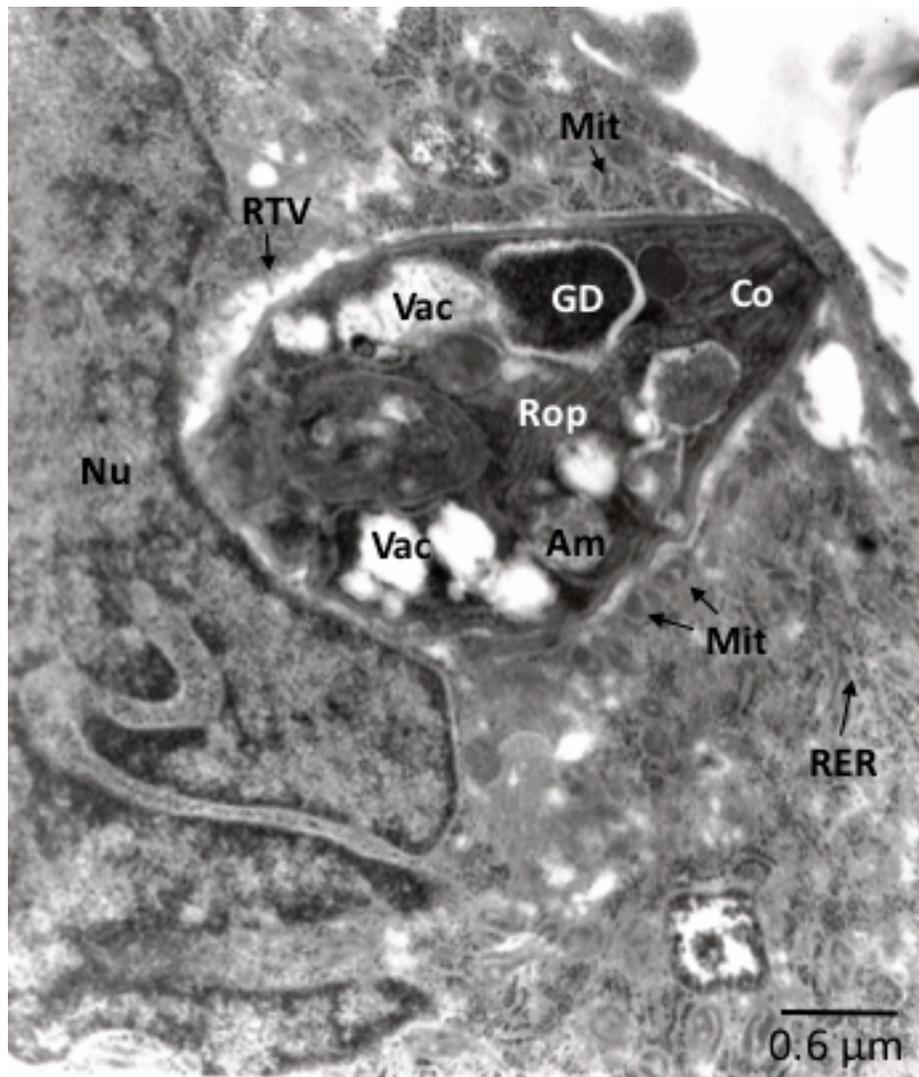


Figura 17. Detalle de una imagen ultraestructural de célula HMEC-1 con un taquizoito RH preincubado con PBS. Se observa una estructura parasitaria contenida en una vacuola, en el espacio intravacuolar se aprecia una red túbulo-vesicular (RTV), así como organelos celulares cercanos (mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso), sugeriendo de vacuola parasitófora; dicha estructura parasitaria presenta aspecto piriforme, en su interior se aprecian diferentes organelos: conoide (Co), gránulos densos (GD), gránulos de amilopectina (Am), roptrias (Rop), así como vacuolas electrolúcidas en abundante cantidad. El núcleo (Nu) de la célula infectada es pleomórfico, con invaginaciones marcadas, la cromatina se encuentra en discreta cantidad plegada a la periferia. Ur-Pb.

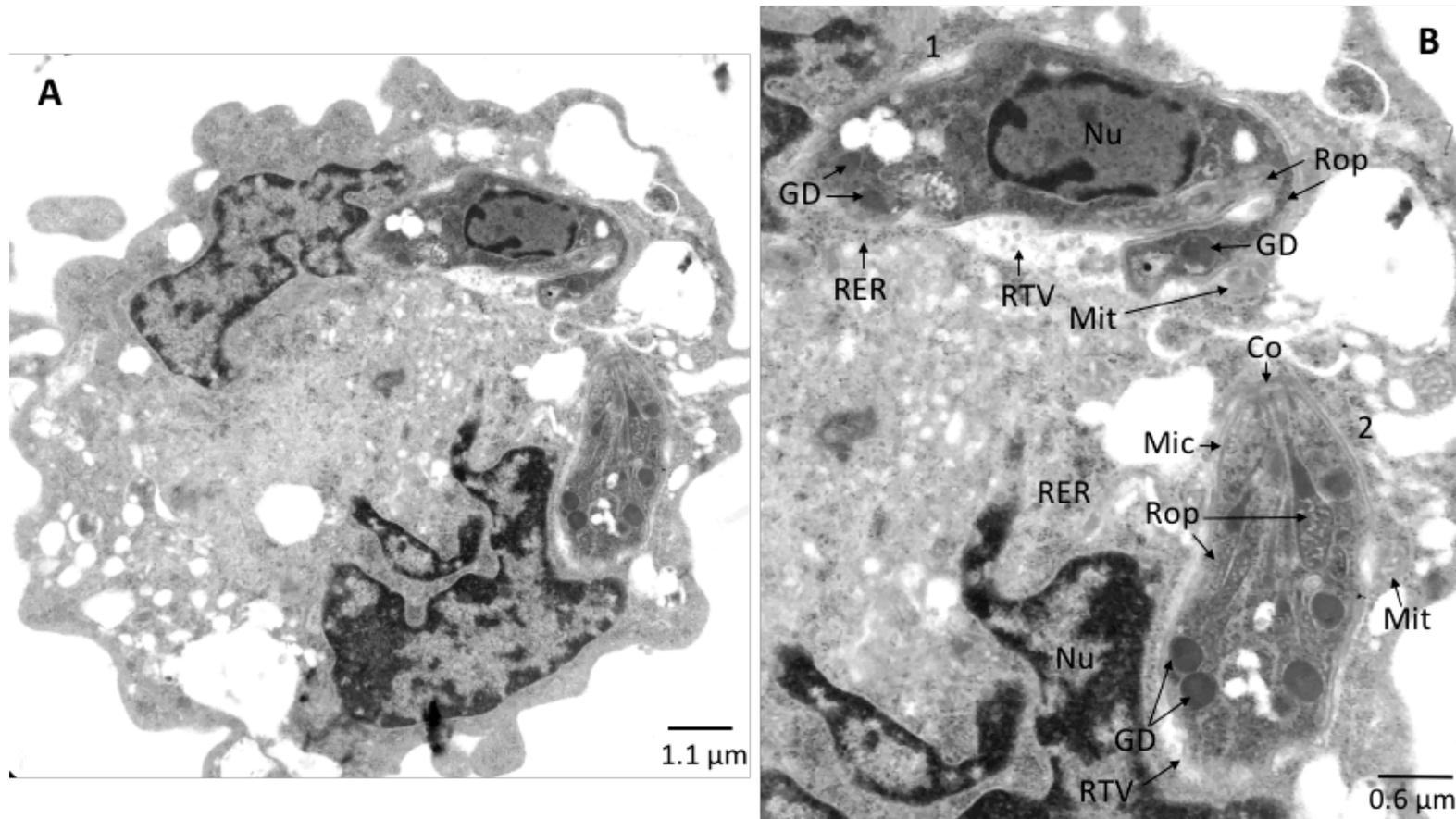


Figura 18. Imagen ultraestructural de una célula HMEC-1 con taquizoitos de RH sensibilizados. A) Célula redondeada con múltiples proyecciones de su membrana, con abundante citoplasma y escasos organelos: retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias (MIT), presenta un núcleo pleomórfico, segmentado en dos, con la cromatina condensada a la periferia, en el citoplasma se encuentra abundante cantidad de vacuolas electrolúcidas de diversos tamaños y formas. B) Se observan dos estructuras parasitarias cercanas al núcleo, contenidas en vacuolas parasitóforas, en cuyo espacio intravacuolar contiene una red túbulo-vesicular (RTV) y cercana a ellas se observan mitocondrias y retículo endoplásmico; la estructura 1 presenta una forma arqueada, en la zona anterior se observa una protuberancia alargada y doblada hacia si misma, la estructura 2, presenta forma arqueada; en ambas estructuras se observan organelos: conoide (Co), micronemas (Mic), roptrias (Rop), gránulos densos (GD) y núcleo (Nu), así como vacuolas electrolúcidas en discreta cantidad. Ur-Pb.

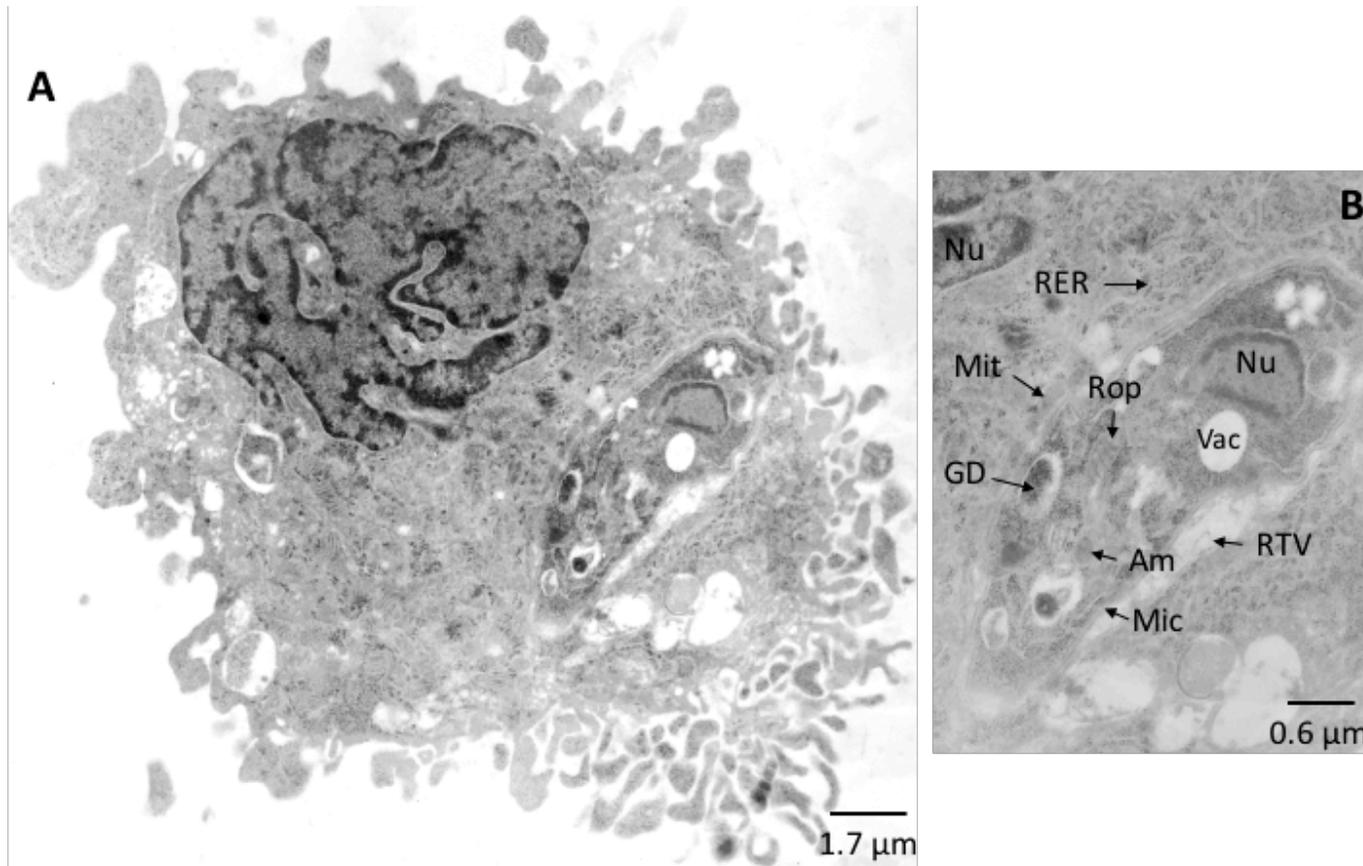


Figura 19. Imágenes ultraestructurales de célula HMEC-1 con un taquizoito intracelular de RH sensibilizado. A) Célula de forma semi-redonda, con múltiples proyecciones de su membrana, con abundante citoplasma, apreciándose en su interior leve cantidad de vacuolas electrolúcidas de diferentes tamaños y escasos organelos: retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias (Mit), principalmente, el núcleo es pleomórfico, segmentado y con invaginaciones marcadas, la cromatina se encuentra en discreta cantidad. Así mismo, en un extremo del citoplasma se observa una estructura parasitaria (B) contenida en una vacuola con red túbulo-vesicular (RTV), presenta un extremo arqueado y el otro semi-recto, redondeado y el otro en punta; en su interior se aprecian diferentes organelos, incluyendo roptrias (Rop), gránulos densos (GD), micronemas (Mic) y el núcleo (Nuc), así como vacuolas electrolúcidas (Vac) y otras vacuolas con material electrodensito no identificado. Ur-Pb.

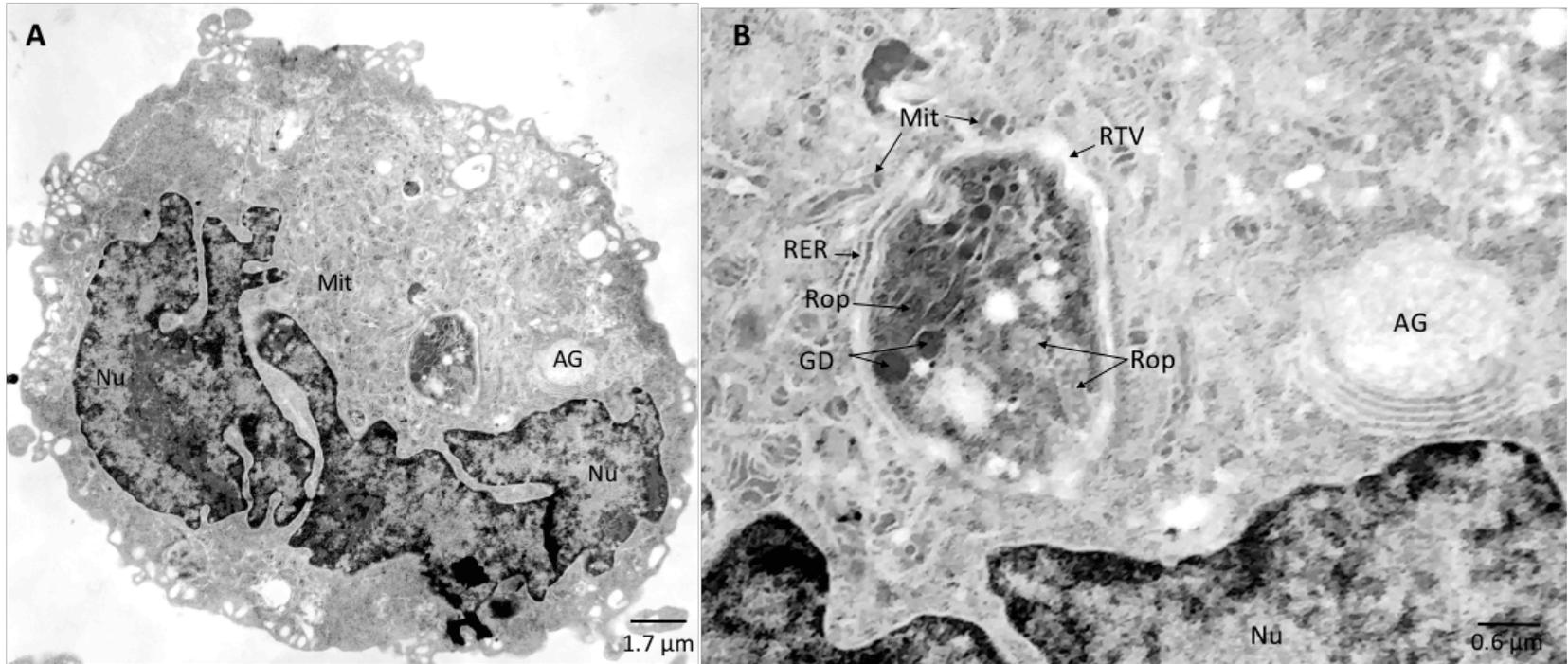


Figura 20. Imágenes ultraestructurales de una célula HMEC-1 con un taquizoito de RH sensibilizado. A) Se observa una célula semi-redonda, con proyecciones de su membrana y abundante citoplasma, apreciándose en su interior moderada cantidad de vacuolas electrolúcidas de diferentes tamaños y formas, principalmente en la periferia, así como escasos organelos: retículo endoplásmico rugoso (RER), mitocondrias (MIT), aparato de Golgi (AG) y núcleo (Nu) pleomórfico segmentado en dos, con cromatina en discreta cantidad y nucléolo visible; (B) en el citoplasma se observa una estructura parasitaria contenida en una vacuolas cercana al núcleo, en cuyo espacio intravacuolar contiene una red túbulo-vesicular (RTV), con mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi cercano, presenta forma piriforme. En su interior se aprecian diferentes organelos, incluyendo roptrias (Rop) y gránulos densos (GD), además de vacuolas electrolúcidas en discreta cantidad. Ur-Pb.

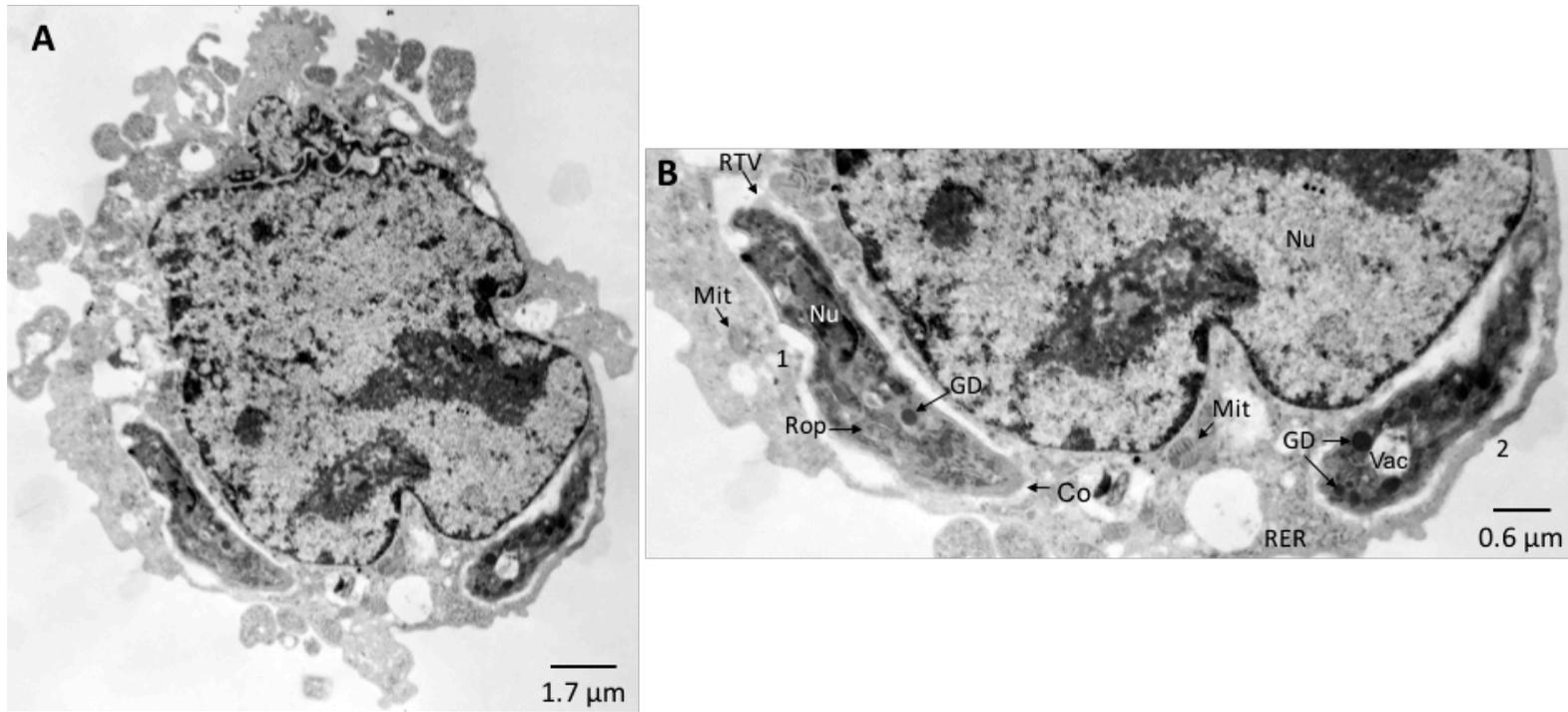


Figura 21. Imágenes ultraestructurales de una célula HMEC-1 con taquizoitos de la cepa RH preincubados con suero negativo. A) Célula de forma semi-redonda, con múltiples proyecciones de su membrana, citoplasma moderado, apreciándose en su interior vacuolas electrolúcidas de diferentes tamaños de moderada a abundante cantidad, así como escasos organelos: retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias (Mit); el núcleo es pleomórfico, segmentado y con invaginaciones marcadas, la cromatina se encuentra en discreta cantidad. B) En un extremo del citoplasma se observan dos estructuras parasitarias contenidas en vacuolas independientes:

1. Estructura en una vacuola cercana al núcleo de la célula, con presencia de una red túbulo-vesicular (RTV), sugerente de vacuola parasitófora; el parásito presenta forma arqueada en un extremo, el otro semi-recto, además uno de los extremos es redondeado y el otro en punta; en su interior se observan diferentes organelos, incluyendo el conoide (Co), roptrias (Rop), gránulos densos (GD) y el núcleo (Nu).
2. Estructura de forma arqueada, contenida en una vacuola endocítica, los gránulos densos mantienen su electrodensidad, sin embargo los demás organelos se observan opacos se observa y en el centro del taquizoito hay una vacuola electrolúcida con material de moderada electrodensidad no identificado, sugerente de degeneración. Ur-Pb.

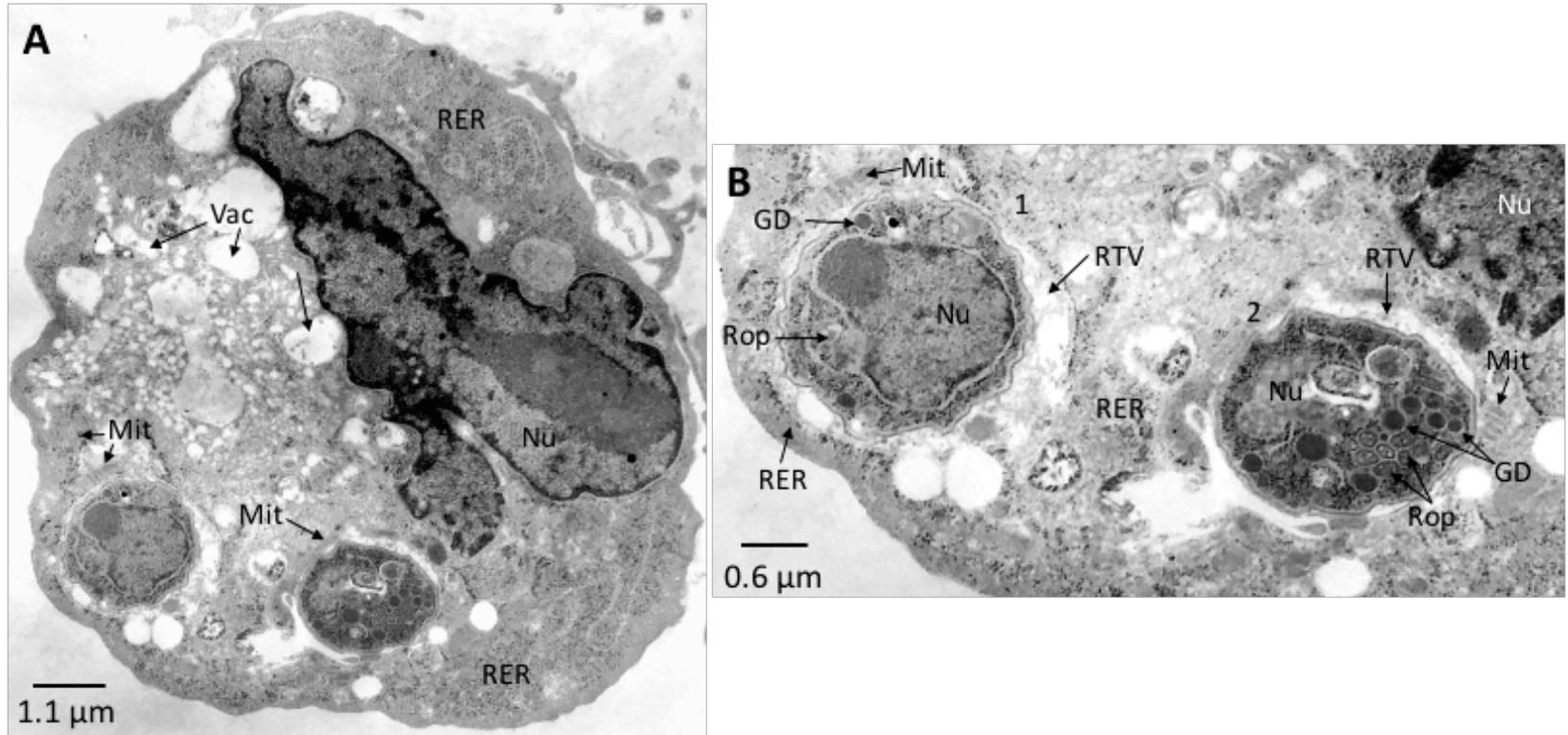


Figura 22. Imágenes ultraestructurales de una célula HMEC-1 con tachizoitos de RH preincubados con suero negativo. A) Se observa una célula de forma redondeada, con abundante citoplasma, apreciándose en su interior múltiples vacuolas electrolúcidas que son de discreto tamaño hasta algunas de mayor diámetro, con escasos organelos (retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias (Mit), principalmente), núcleo pleomórfico, con invaginaciones marcadas, la cromatina se encuentra en discreta cantidad. B) En un extremo del citoplasma se observan dos estructuras parasitarias contenidas en vacuolas parasitóforas independientes, en el espacio intravacuolar hay presencia de una red túbulo-vesicular (RTV), presentan forma redondeada, en su interior se aprecian diferentes organelos: gránulos densos (GD), roptrias reticuladas (Rop) y núcleo (Nu)1, la primera estructura (1) se localiza cercana a la periferia de la célula y se observa con cambios en la morfología del núcleo, sugerentes de degeneración y la segunda estructura (2) se encuentra cercana al núcleo, con organelos bien definidos. Ur-Pb.

Cuadro 3: Análisis estadístico entre tipo de localización, tipo de vacuola y estado de viabilidad

Variable 1	Variable 2	Rho de Spearman	P
Localización Nuclear	Estado viable	0.772	<0.0001
	Vacuola Parasitófora	0.799	
	Vacuola Endocítica	-0.349	
Localización Periférica	Estado no viable	0.645	<0.0001
	Vacuola Parasitófora	0.669	
	Vacuola Endocítica	-0.200	
Estado viable	Vacuola Parasitófora	0.815	<0.0001
	Vacuola Endocítica	-0.357	0.002

Diferencias estadísticas por la prueba de U de Mann-Whitney, entre los grupos sin tratamiento (PBS) y sensibilizados: localización de la vacuola P = 0.025, tipo de vacuola P = 0.026; entre los grupos sensibilizados y suero negativo: localización de la vacuola P = 0.063; entre los grupos sin tratamiento (PBS) y suero negativo: tipo de vacuola P = 0.065.

Cuadro 4. Parásitos intracelulares en: dos tipos de localizaciones, dos tipos de vacuolas y dos estados de viabilidad

Grupo	N	Localización		Vacuolas parasitóforas			Vacuola endocítica		
		Nuclear	Periférica	n (%)	Parásitos viables	Parásitos degenerados	n (%)	Parásitos viables	Parásitos degenerados
Sin tratamiento	27	16 (59)	11 (41)	17 (63.0)	16 (94.1)	1 (5.9)	10 (37.0)	0 (0.0)	10 (100.0)
Sensibilizado	38	32 (84.2)	6 (15.8)	33 (86.8)	28 (84.8)	5 (15.2)	5 (13.2)	1 (20.0)	4 (80.0)
Suero negativo	40	27 (67.5)	13 (32.5)	33 (82.5)	25 (75.8)	8 (24.2)	7 (17.5)	1 (14.3)	6 (85.7)

9. Discusión

Existe una aparente paradoja en el papel que desempeña la respuesta inmune en la toxoplasmosis congénita, tanto en seres humanos como en modelos murinos: ya que si bien aquella que protege a la madre durante la gestación de problemas clínicos (por ejemplo el IFN- γ y los anticuerpos de clase IgG1), también favorece la transmisión vertical y el daño en el hijo (Cañedo-Solares *et al.*, 2008; Pfaff *et al.*, 2005). Tanto el mecanismo celular como el humoral, pueden explicarse por un aumento de la interacción entre el parásito y la superficie del feto que encara a las células o la sangre materna, pero los anticuerpos podrían además servir de “caballos de Troya” acarreado al parásito hacia el interior de las células, tanto del sincitiotrofoblasto como del endotelio vascular fetal. Con el fin de examinar esto, se decidió estudiar si los anticuerpos IgG1 humanos pueden favorecer la entrada de *T. gondii* a las células, utilizando para ello como modelo una línea de células endoteliales que expresa el FcRn, describiendo además el destino y estado aparente de los parásitos “opsonizados” dentro de las células.

En concordancia con la hipótesis, la sensibilización de los taquizoitos con anticuerpos IgG1 anti *T. gondii* produjo un mayor porcentaje de células infectadas y con mayor número de vacuolas por célula, en comparación con el grupo de parásitos incubados en PBS, el cual dio resultados similares a los reportados por Cañedo-Solares *et al.* (2013) quienes emplearon la misma cepa de *T. gondii* y la misma línea celular. En la literatura hay controversia sobre el efecto de antisueros o anticuerpos sobre la entrada de los taquizoitos a diversos tipos celulares; por ejemplo, estudios dirigidos contra la proteína de superficie SAG1 y empleando macrófagos de ratón o células MDCK, los resultados encontrados fueron heterogéneos pues hubo desde: a) inhibición de la entrada del parásito cubierto de anticuerpos a la célula, cuya explicación mencionan los autores podría ser posiblemente a que el anticuerpo está obstruyendo la secreción de proteínas necesarias para realizar la invasión celular; b) entrada y replicación del parásito

independientes de la opsonización, incluso dentro macrófagos; c) entrada por fagocitosis, donde el parásito podría estar activando vías de señalización que inhiban la fusión fago-lisosomal y por lo tanto evita ser degradado; y finalmente mencionan d) que el parásito puede salir del fagosoma en donde se encuentra y formar una vacuola parasitófora tomando elementos de la membrana del fagosoma (Fadul *et al.*, 1995; Morisaki *et al.*, 1995; Nam *et al.*, 1993; Vercammen *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2014). Este último tipo de invasión lo han propuesto como un mecanismo alternativo en macrófagos (PTVI: mecanismo de invasión vacuolar del fagosoma) tipo “Caballo de Troya”, el cual se asocia con un incremento en la diseminación sistémica en una infección aguda y el establecimiento del parásito en los tejidos. Cabe mencionar que muchos de estos modelos utilizan células que expresan varios receptores para Fc de la IgG especializados en fagocitosis, como los FcRI, IIa y IIb presentes en macrófagos y neutrófilos (Pleass y Woof, 2001).

En este trabajo se utilizaron células endoteliales, ellas ostentan características distintas a las empleadas en los ensayos mencionados anteriormente: no son fagocitos profesionales, aunque pueden fusionar lisosomas a las vacuolas endocíticas, absorber y secretar nutrientes a tejidos adyacentes, así como mantener la homeostasis de la IgG y la albúmina en la sangre, en lo cual el FcRn tiene un papel preponderante. El receptor, al unirse a estas moléculas de IgG, las protege de degradación cuando baja el pH en la vacuola que las contiene, posteriormente son transitadas con ayuda de vesículas acarreadoras, hacia la cara apical o la basal de la célula, después son exocitadas, regresando al receptor a la membrana plasmática; sin embargo, aquella IgG (o albúmina) que no se ha unido al receptor es degradada por lisosomas, manteniendo así un equilibrio en la concentración de esta inmunoglobulina. Este receptor también media el transporte de la IgG en la gestación a través de la placenta (Cheville, 2009a, 2009b; Moncada *et al.*, 2006; Ortiz-Alegría *et al.*, 2016). En este caso entonces, la entrada del parásito mediada por el receptor de IgG podría explicar la transmisión

de la madre al feto durante la gestación, ya que los taquizoitos serían endocitados y transitados de un lado al otro lado de la célula sin ser eliminados.

La mayor internalización de los parásitos sensibilizados con anticuerpos positivos a IgG1 humana anti *T. gondii* puede deberse a una posible interacción con el FcRn, expresado por las HMEC-1 (Ortiz-Alegría *et al.*, 2016), con lo que se puede hipotetizar que el receptor reconoce al anticuerpo IgG1 e internaliza al parásito, mecanismo similar a lo descrito para otros patógenos como *Leishmania* o Citomegalovirus, en macrófagos o sincitiotrofoblasto (Maidji *et al.*, 2006; Joller *et al.*, 2011).

Por otra parte, los resultados mostraron que ambos sueros protegieron a los parásitos de daño pues, por un lado, la gran mayoría de ellos estaban en vacuolas parasitóforas (cercasas al núcleo de la célula, que coincide con lo descrito en la literatura por Dubey *et al.*, 1998; Weiss, *et al.*, 2013), con morfología definida y organelos nítidos y por el otro, no todos aquellos que estaban en vacuolas endocíticas estaban dañados, en contraste con aquellos incubados en PBS, todos los cuales tuvieron pérdida de la morfología y electrodensidad de organelos, además de presentar un espacio angosto entre el parásito y la membrana de la vacuola que los contenía. Por lo que sugerimos que en este último grupo, la ausencia de suero permitió a las células endoteliales llevar a cabo la degeneración del parásito por la acidificación de la vacuola, evitando que éste realizara el mecanismo reportado por Morisaki (1995) y Zhao (2014) en macrófagos. En cambio, los que fueron incubados con cualquiera de los sueros se protegieron de daño, aunque fuera parcialmente, lo cual podría deberse a los componentes que tiene el suero: albúmina y anticuerpos, principalmente, que permitirían al parásito estar menos expuesto a los cambios de las vacuolas endocíticas; el FcRn también tendría un papel preponderante en este fenómeno dada su función en este tipo de células.

Una de las observaciones que es importante mencionar, es la posible viabilidad de los parásitos que se encontraban en vacuolas parasitóforas, ya que aquellos que presentaban un cambio en morfología, electrodensidad o presencia de vacuolas tenían cierto grado de degeneración, estos cambios podrían no ser determinantes absolutos de su viabilidad; ya que Luna-Nophal (2016), Muñiz-Hernández *et al.* (2011) y Rivera Fernández *et al.* (2016) documentaron cambios ultraestructurales en la morfología del parásito, principalmente en los gránulos densos, cuando es tratado con algún fármaco -un derivado de una quinoxalina, la VAM2-, afectando la replicación, se pierde la sincronía de la endodiogenia y hay menor producción de parásitos, pero ésta no se inhibe completamente.

Los resultados en este estudio sugieren que la presencia de anticuerpos favorecen la entrada de los taquizoitos de *T. gondii* a las células endoteliales que expresan el FcRn, y que éste además los protege de ser eliminados una vez dentro de las mismas. Estos fenómenos pueden explicar la relación entre los anticuerpos de clase IgG1 y la transmisión vertical o el daño fetal en la toxoplasmosis congénita humana, al favorecer la concentración de parásitos y su posible paso hacia el feto (Cañedo-Solares *et al.*, 2008).

10. Conclusiones

- El recubrimiento de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH con anticuerpos de clase IgG1 favorece su entrada a células endoteliales HMEC-1.
- La incubación de los taquizoitos de *T. gondii* con suero negativo y especialmente positivo para anticuerpos anti-parásito, los protege de la degradación por la célula.
- Tanto el suero negativo como el positivo, promovieron la localización en vacuolas parasitóforas.

11. Perspectivas

- Determinar si el efecto observado con la cepa RH es similar usando una cepa tipo II, como la ME49 y en otros tipos de células endoteliales, especialmente de cultivos primarios.
- Demostrar que el efecto de los anticuerpos IgG1 es mediado por el FcRn, mediante experimentos de inhibición con anticuerpos o silenciamiento del mRNA de la cadena alfa.
- Verificar la naturaleza de las vacuolas endocíticas, mediante marcaje de hidrolasa ácida y otros marcadores específicos.
- Determinar si los parásitos que entran son capaces de replicarse y de transitar al otro lado de las células.
- Verificar los resultados *in vitro* en un modelo *in vivo* en ratones.

12. Referencias

- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C.-T., & Gubbels, M.-J. (2015). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annual Review of Microbiology*, 69, pp. 463–485.
- Boothroyd, J. C., & Dubremetz, J.-F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), pp. 79–88.
- Botero-Kleiven, S., Fernández, V., Lindh, J., Richter-Dahlfors, a, von Euler, a, & Wahlgren, M. (2001). Receptor-mediated endocytosis in an apicomplexan parasite (*Toxoplasma gondii*). *Experimental parasitology*, 98(3), pp. 134–44.
- Caballero-Ortega, H., Uribe-Salas, F. J., Conde-Glez, C. J., Cedillo-Pelaez, C., Vargas-Villavicencio, J. A., Luna-Pastén, H., et al. (2012). Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(11), pp. 653–9.
- Calzada-Ruiz, M. (2012). Cinética de invasión de las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii* en células endoteliales humanas. (Tesis de Licenciatura). México D. F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cañedo-Solares, Irma. Galván-Ramírez, María de la Luz. Rodríguez-Pérez, Laura Rocio. Rico-Torres, Claudia Patricia. Vela-Amieva, Marcela. Pérez-Andrade, Martha. Figueroa-Damián, Ricardo. Correa, D. (2008). Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *The Pediatric infectious disease journal*, 27(5), pp. 469–474.
- Cañedo-Solares, I., Calzada-Ruiz, M., Ortiz-Alegría, L. B., Ortiz-Muñiz, A. R., & Correa, D. (2013). Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains. *Parasitology research*, 112(8), pp. 3029–33.
- Carey, K. L., Westwood, N. J., Mitchison, T. J., & Ward, G. E. (2004). A small-molecule approach to studying invasive mechanisms of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 101(19), pp. 7433–8.
- Del Carmen, M. G., Mondragón, M., González, S., & Mondragón, R. (2009). Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology*, 11(6), pp. 967–82.
- Carruthers, V. B. (1999). Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology international*, 48(1), pp. 1–10.
- Carruthers, V. B. (2002). Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta tropica*, 81(2), pp. 111–22.
- Carruthers, V., & Boothroyd, J. C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current opinion in microbiology*, 10(1), pp. 83–9.
- Cedillo-Peláez, C. (2009). Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México. (Tesis de Maestría). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cesbron-Delauw, M.-F., Gendrin, C., Travier, L., Ruffiot, P., & Mercier, C. (2008). Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(5), pp. 657–64.
- Cheville, N. F. (2009a). Intracellular Trafficking, in: *Ultrastructural Pathology The Comparative Cellular Basis of Disease*, pp. 108–123. Wiley-Blackwell.
- Cheville, N. F. (2009b). Endothelium, in: *Ultrastructural Pathology The Comparative Cellular Basis of Disease*, pp. 199–228. Wiley-Blackwell.
- Contreras-Ochoa, C. O., 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. *Experimental Parasitology*, 134(2), pp. 256–265.
- Correa, D., Caballero-Ortega, H., Rico-Torres, C. P., Cañedo-solares, I., Ortiz-Alegría, L. B., Becerra-Torres, E., et al. (2007). Immunobiology of congenital toxoplasmosis. *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*, 661(2), pp. 199–224.
- Correa, D., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L. B., Caballero-Ortega, H., & Rico-

- Torres, C. P. (2007). Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite immunology*, 29(12), pp. 651–60.
- Drewry, L. L., & Sibley, L. D. (2015). Toxoplasma Actin Is Required for Efficient Host Cell Invasion. *mBio*, 6(3), pp. 1–9.
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. CRC Press.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. a. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), pp. 267–99.
- 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(9167), pp. 1829–33.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Seminars in Immunopathology*, 34(6), pp. 793–813.
- Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Cohen, R., Dumètre, A., Yera, H., et al. (2009). Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *The Journal of infectious diseases*, 199(2), pp. 280–285.
- Fadul, C. E., Channon, J. Y., & Kasper, L. H. (1995). Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. *Infection and immunity*, 63(11), pp. 4290–4294.
- Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., & Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE*, 9(3).
- Hill, D. E., Chirukandoth, S., & Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, 6(1), pp. 41–61.
- Hunter, C. a., & Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), pp. 766–778.

- Ishikawa, T., Takizawa, T., Iwaki, J., Mishima, T., Ui-Tei, K., Takeshita, T., et al. (2015). Fc gamma receptor IIb participates in maternal IgG trafficking of human placental endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(5), pp. 1273–1289.
- Joller, N., Weber, S. S., & Oxenius, A. (2011). Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens. *European journal of immunology*, 41(4), pp. 889–97.
- Laliberté, J., & Carruthers, V. B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(12), pp. 1900–1915.
- Luna-Nophal, A. (2016). Efecto in vitro de la dehidroepianosdrosterona (DHEA) sobre el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*. (Tesis de Maestría). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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. *The American journal of pathology*, 168(4), pp. 1210–26.
- Mercier, C., Dubremetz, J.-F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Molecular biology of the cell*, 13, pp. 2397–2409.
- Moncada, Salvador; Higgs, A. (2006a). *The Vascular Endothelium II* (A. Moncada, Salvador; Higgs, Ed.). Springer.
- Moncada, Salvador; Higgs, A. (2006b). *The Vascular Endothelium I* (A. Moncada, Salvador; Higgs, Ed.). Springer.
- Mondragon, R., & Frixione, E. (1996). Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 43(2), pp. 120–127.
- Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363(9425), pp. 1965–76.

- Morisaki, J. H., Heuser, J. E., & Sibley, L. D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of cell science*, 108 (Pt 6, pp. 2457–64.
- Muñiz-Hernández, S., Carmen, M. G. Del, Mondragón, M., Mercier, C., Cesbron, M. F., Mondragón-González, S. L., et al. (2011). Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p. 473983.
- Nam, Ho-Woo; Kim, Dong-Jin; Park, S.-K. C. W.-Y. (1993). Inhibition of entry of *Toxoplasma gondii* into MDCK cell by fetal bovine serum. , pp. 379–382.
- Olguín, J. E., Fernández, J., Salinas, N., Juárez, I., Rodríguez-Sosa, M., Campuzano, J., et al. (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 and Infection*, 17(8), pp. 586–595.
- Ortiz-Alegría, L. B., Cañedo-Solares, I., Vadillo-Ortega, F., Castillo-Castrejón, M., & Correa, D. (2016). Potential of HMEC-1 Line and HUVEC Primary Culture Cells to Study the Neonatal IgG Fc Receptor *in vitro*. *American Journal of Immunology*, 12(1), pp. 1–9.
- Pfaff, A. W., Georges, S., Abou-Bacar, A., Letscher-Bru, V., Klein, J. P., Mousli, M., et al. (2005). *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. *Immunology and Cell Biology*, 83(5), pp. 483–489.
- Pleass, R. J., & Woof, J. M. (2001). Fc receptors and immunity to parasites. *Trends in Parasitology*, 17(11), pp. 545–551.
- Predescu, S. A., Predescu, D. N., & Malik, A. B. (2007). Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 293(4), pp. L823–L842.
- Radulescu, L., Antohe, F., Jinga, V., Ghetie, V., & Simionescu, M. (2004). Neonatal Fc receptors discriminates and monitors the pathway of native and modified

- immunoglobulin G in placental endothelial cells. *Human immunology*, 65(6), pp. 578–85.
- Rivera Fernández, N., Mondragón Castelán, M., González Pozos, S., Ramírez Flores, C. J., Mondragón González, R., Gómez de León, C. T., et al. (2016). A new type of quinoxalinone derivatives affects viability, invasion, and intracellular growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. *Parasitology Research*, pp. 2081–2096.
- Rome, M. E., Beck, J. R., Turetzky, J. M., Webster, P., & Bradley, P. J. (2008). Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, 76(11), pp. 4865–75.
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature reviews. Immunology*, 7(9), pp. 715–25.
- Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B. Y., Maimunah, a, & Rahmah, N. (2010). Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Tropical biomedicine*, 27(1), pp. 125–30.
- Sibley, L. D. (2003). *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(9), pp. 581–6.
- Sibley, L. D. (2011). Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunological reviews*, 240(1), pp. 72–91.
- Smith, T. G., Walliker, D., & Ranford-Cartwright, L. C. (2002). Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa. *Trends in parasitology*, 18(7), pp. 315–23.
- Tenter, A. M. (2009). *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), pp. 364–9.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*, 30(12–13), pp. 1217–58.
- Vercammen, M., Scorza, T., El Bouhdidi, A., Van Beeck, K., Carlier, Y., Dubremetz, J. F., et al. (1999). Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by

macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. *Parasite Immunology*, 21(11), pp. 555–563.

Weiss, L. M., Kim, K. (2014). *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods* (L. M. Weiss & K. Kim, Eds.). Elsevier.

Zhao, Y., Marple, A. H., Ferguson, D. J. P., Bzik, D. J., & Yap, G. S. (2014). Avirulent strains of *Toxoplasma gondii* infect macrophages by active invasion from the phagosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), pp. 6437–42.

13. Anexos

13.1. Anexo 1: Cultivo *in vitro* de la línea celular semi-inmortal de microvasculatura humana HMEC-1

1. Sembrar las células HMEC-1 en botellas de cultivo de 75 cm² (Cellstar 658170, Greiner Bio-one, Germany), con 8 mL de medio MCDB-131 completo
2. Mantener en incubación a 37°C con 7% de CO₂, hasta obtener una confluencia mayor al 95%
3. Retirar el medio de cultivo metabolizado y lavar con 5 mL de HEPES 1x
4. Despegar las células de la caja con 5 mL de Tripsina al 0.25% a 37°C por 1 o 2 minutos
5. Observar que la mayoría de las células se encuentren flotando
6. Detener la reacción con 5 mL de solución de Transporte/Paro
7. Colectar la suspensión celular y centrifugar a 1200 rpm por 7 minutos
8. Resuspender el botón celular en medio MCDB-131 completo y dividirlo en botellas de cultivo de 75 cm² con 8 mL de medio MCDB-131 completo (1^a resiembra)
9. Repetir los pasos 1 al 8 hasta obtener un número mayor de células (2^a resiembra)
10. Repetir los pasos 3 al 7 y resembrar (3^a resiembra) en cajas de cultivo de 24 pozos (Corning Costar 3524, USA); para microscopía óptica convencional se colocan cubreobjetos redondos de 15mm para cultivo celular (Nunc 174969, USA) en los pozos correspondientes
11. Colocar 100,000 células por pozo, contadas por cámara Neubauer y azul Tripano para conocer su viabilidad
12. Mantener por 72 horas a 37°C en una incubadora con 7% de CO₂, obteniendo una confluencia mayor al 90%

13.2. Anexo 2: Taquizoitos de *Toxoplasma gondii* cepa RH

1. Taquizoitos de la cepa RH se infectan vía intraperitoneal en ratones BALB/c con una dosis de 3×10^6 taquizoitos suspendidos en 500 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
2. 96 hrs post-infección, se realiza un lavado peritoneal de cada ratón infectado con 3 mL de PBS
3. Estimar la cantidad de parásitos por mililitro por cámara Neubauer y azul Tripano, colectando 250×10^6 de taquizoitos aproximadamente
4. Depositar aproximadamente 20×10^6 taquizoitos en cultivos de células Vero (95% confluencia) contenidas en botellas 25 cm² con medio RPMI-1640 suplementado con Penicilina G (100 IU/mL), Estreptomina (100 μ g/mL), Anfotericina B (0.025 μ g/mL) (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) y 10% Suero Fetal Bovino (Hyclone, Utah, USA), durante 72 h; cuyo fin es purificarlos y propagarlos
5. Incubar a 37°C con 7% de CO₂ por 72 horas
6. Despegar las células mecánicamente
7. Colectar la suspensión celular y pasarla por una aguja estéril de acero desechable de calibre 27G y longitud de 13mm (insulina), para disgregar aglomeraciones de parásitos
8. Determinar la viabilidad por exclusión con azul Tripano (1:10), colectando 100×10^6 de taquizoitos aproximadamente con una viabilidad mayor al 95%
9. Dividir en tres grupos la suspensión de taquizoitos para cada técnica de análisis:
 - I. Suspendidos en PBS estéril
 - II. Sensibilizados
 - III. Sueros negativos
10. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
11. Resuspender en 250 μ L de la solución correspondiente para cada grupo:

- I. PBS estéril
 - II. Anticuerpos IgG1 anti *T. gondii* dilución 1:1600
 - III. Mezcla de sueros negativos dilución 1:1600
12. Mantener en agitación suave durante 30 minutos a 4°C
 13. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
 14. Resuspender cada grupo de taquizoitos en una cantidad necesaria de medio M199 de invasión para cada pozo

Nota: la dilución de los anticuerpos (1:1600) se utilizó de acuerdo a lo estandarizado previamente en el laboratorio.

13.3. Anexo 3: Ensayo de internalización de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en células HMEC-1

1. Retirar el medio de cultivo metabolizado por las células
2. Agregar a cada pozo 400 μ L de medio de invasión M199 con la cantidad de taquizoitos correspondiente a una relación 10:1 (parásitos-célula), para cada grupo de parásitos
3. Homogenizar el cultivo celular con parásitos
4. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la interacción de los parásitos con la monocapa celular
5. Incubar 2 hrs a 37°C con 7% de CO₂
6. Detener la invasión con 300 μ L de solución HEPES 1x
7. Colectar el sobrenadante celular con los parásitos libres
8. Para los grupos de la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET):
 - i. Despegar las células de la caja con 5 mL de Tripsina al 0.25% a 37°C por 1 o 2 minutos
 - ii. Detener la reacción con 5 mL de solución de Transporte/Paro
 - iii. Colectar la suspensión celular
 - iv. Centrifugar a 1200 rpm por 7 minutos
 - v. Decantar y fijar
9. Fijar los cultivos a 4°C de la siguiente forma:
 - a. Paraformaldehído al 0.5%: tinción Wright (Merck cat. 101383)
 - b. Solución Karnovsky (EMS 15720): microscopía electrónica de transmisión (MET)

13.4. Anexo 4: Tinción Wright

1. Retirar de las placas los cubreobjetos con las células invadidas de los tres grupos de parásitos y las células sin parásitos (control)
2. Colocar una gota de medio de montaje en un portaobjetos limpio y colocar el cubreobjetos con cultivo celular
3. Dejar secar al aire libre
4. Colocar 300 μ L de colorante Wright por 5 minutos
5. Agregar 300 μ L de agua destilada por 5 minutos para lograr un contraste de la tinción
6. Lavar 3 veces con abundante agua destilada
7. Secar al aire libre
8. Colocar cubreobjetos para su evaluación posterior

13.5. Anexo 5: Microscopía Electrónica de Transmisión

1. Fijar por 72 hrs a 4°C las células con los tres grupos de células de taquizoitos en solución Karnovsky (EMS 15720) en tubos Eppendorf de 1.5µL:
 - I. Suspendidos en PBS estéril
 - II. Sensibilizados
 - III. Sueros negativos
2. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos
3. Realizar 3 lavados con 100µL PBS por 5 min para eliminar los residuos del fijador.
4. Centrifugar a 4000 rpm por 3 min entre cada lavado
5. Posfijar con 1 ml de OsO₄ al 1% 1:30 hrs a temperatura ambiente
6. Realizar 3 lavados con 100µL PBS por 5 min para eliminar los residuos del pos-fijador
7. Centrifugar a 4000 rpm por 3 min entre cada lavado
8. Deshidratar a temperatura ambiente con etanol en serie ascendente: 30, 50, 70, 90, 100 100, y 100%. Entre cada concentración de etanol:
 - I. Centrifugar a 4000 rpm por 3 min
9. Colocar en 1 ml de solución intermedia (óxido de Propileno) durante 15 minutos, repetir una vez más este paso
10. Preincluir en una mezcla de óxido-resina epóxica en una relación 3:1 por 2 hrs, 2:1 por 24 hrs y 1:1 por 2 hrs
11. Incluir en resina pura epóxica (Embed 812, Electron Microscopy Sciences, EMS 14120), con dos cambios de 2 hrs cada uno
12. Incluir las muestras en resina pura y centrifugar a 900 rpm por 15 seg
13. Colocar identificación en el molde de cada muestra
14. Mantener 2 hrs a temperatura ambiente para que bajen las muestras a la punta del molde

15. Polimerizar a 60°C por 24-36 hrs
16. Retirar de moldes
17. Realizar cortes semifinos de 95-100 nm de grosor en un ultramicrotomo
18. Colocar los cortes semifinos en portaobjetos convencionales y dejar secar
19. Teñir con azul de Toluidina por uno o dos minutos y lavar con abundante agua destilada, dejar secar
20. Revisar por microscopía convencional
21. Realizar cortes finos de 65-80 nm de grosor en un ultramicrotomo
22. Colocar los cortes en rejillas de cobre de 200 Mesh, previamente lavadas con alcohol y acetona
23. Dejar secar
24. Contrastar acetato de uranilo (0.12M) por 15 minutos en oscuridad, posteriormente lavar con agua destilada
25. Contrastar con solución Reynolds (Nitrato de Plomo 0.08M, Citrato de Sodio 0.12M e Hidróxido de Sodio 1N), en oscuridad, por 10 minutos, posteriormente lavar con agua destilada
26. Dejar secar y guardar para su posterior revisión
27. Revisar en un microscopio electrónico de transmisión y tomar imágenes representativas

13.6. Anexo 6: Soluciones

1. Medio de cultivo M199, incompleto:

- Pesar 1.98 gr de medio M199, 0.44g de NaHCO₃, 0.0724g de L-glutamina, 0.594 g de HEPES
- Disolver en agua inyectable
- Adicionar 100 µL de heparina
- Ajustar a pH= 7.2
- Llevar a 200 mL con agua inyectable
- Filtrar con filtro de perinola de 0.20 µm
- Guardar a 4 °C

2. Factor de Crecimiento Endotelial (FCE):

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

3. HEPES 20x:

- Pesar 88 gr de NaCl
- Pesar 3.3 gr de KCl
- Pesar 26.18 gr de HEPES
- Pesar 22 gr de glucosa
- Disolver en agua inyectable.
- Ajustar a pH=7.4
- Aforar a 500 mL y esterilizar en autoclave
- Almacenar a temperatura ambiente

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

4. HEPES1x:

- Tomar 2.6 mL de HEPES 20x
- Llevar a 50 mL con agua inyectable
- Almacenar a temperatura ambiente

5. Medio de invasión:

- Agregar 1 mL de Suero Fetal de Bovino (SFB)
- Llevar a 20 mL con medio M199 incompleto

6. Medio de cultivo MCDB 131

- Pesar 0.0731 gr de L-glutamina
- Disolver en 10 mL de medio MCDB 131
- Filtrar con filtro de pirinola de 0.20 μm
- Agregar 5 mL de SFB
- Añadir 500 μL de la mezcla comercial de antibióticos/antimicótico: Penicilina G (100 IU/mL), Estreptomina (100 $\mu\text{g/mL}$), Anfotericina B (0.025 $\mu\text{g/mL}$)
- Adicionar 100 μL de Factor de Crecimiento Endotelial (FCE)
- Llevar a 50 mL con medio MCDB 131
- Agregar 1 μL (1 $\mu\text{g/mL}$) de Hidrocortisona