



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**Análisis de la expresión del FcRn en placentas del
tercer tercio de gestación en un modelo murino
de toxoplasmosis congénita**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

**PRESENTA:
Ana Lizbeth Fuerte Cruz**

Asesor de tesis
Dr. Fernando Gómez Chávez

Co-asesora
Dra. María Eugenia Aranda Barrada

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

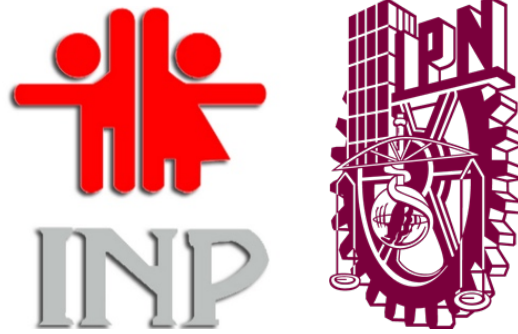


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Esta tesis fue realizada y financiada por el Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación, derivada del proyecto Receptores de la respuesta inmune en la toxoplasmosis congénita, ¿Protectores o promovedores de la transmisión vertical? Con registro 040/2018; y en parte por el Instituto Politécnico Nacional derivado de los proyectos: SIP20190206, SIP20200200 y SIP20210419.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud infinita al Laboratorio de inmunología experimental de la Torre de investigación del Instituto Nacional de Pediatría por permitirme participar en el proyecto Receptores de la respuesta inmune en la toxoplasmosis congénita, ¿Protectores o promovedores de la transmisión vertical? De la cual se deriva mi trabajo; bajo la tutela del Dr. Fernando Gómez Chávez que con paciencia, amabilidad, confianza y empatía supo guiarme para la culminación de este.

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la educación profesional y ética que refuerzan mis valores morales y caracterizan hoy mi persona.

A mi familia solo me queda decirles gracias por todo su apoyo, a mis Padres Margarita y Jesús por el amor, paciencia, por siempre alentarme a ser mejor e inculcarme valores que profeso hoy; a mis hermanas Diana Paola y Carol por siempre ser esas confidentes y motivación que necesitaba para seguir adelante; a mis tíos Rosa y Hernán por impulsarme siempre a romper mis límites y expectativas propias; a mis abuelos Celia, Armando, Jacinto y Luz que con su experiencia en la vida me aconsejaron y desearon siempre lo mejor.

También agradezco a la vida por permitirme conocer personas increíbles que me apoyaron durante la carrera y en el proceso de culminación de este trabajo.

Por último, pero más importante agradezco a Dios por llenarme de amor, salud y estabilidad, ya que sin eso esto no hubiera sido posible llegar hasta donde estoy ahora.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 5 |
| GLOSARIO DE ABREVIATURAS | 6 |
| RESUMEN | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| <i>Toxoplasma gondii</i> , características y ciclo biológico..... | 9 |
| Toxoplasmosis adquirida y congénita..... | 11 |
| Respuesta inmunológica contra <i>T. gondii</i> | 13 |
| Respuesta inmunológica en la toxoplasmosis congénita | 13 |
| Fisiología del receptor neonatal para la fracción constante gamma de inmunoglobulinas IgG (FcRn) durante el embarazo..... | 15 |
| ANTECEDENTES | 16 |
| JUSTIFICACIÓN | 17 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... | 18 |
| HIPÓTESIS..... | 18 |
| OBJETIVOS | 18 |
| METODOLOGÍA..... | 19 |
| Animales de experimentación..... | 19 |
| Modelo de embarazo..... | 20 |
| Extracción de RNA de placenta | 22 |
| RT-qPCR para la determinación de la expresión del FcRn, TGF- β , IL-6 e IL-10..... | 23 |
| qPCR presencia/ausencia de DNA de <i>T. gondii</i> | 26 |
| Análisis de resultados y estadística..... | 27 |
| RESULTADOS | 29 |
| Citología vaginal | 29 |
| Expresión del receptor FcRn y las citocinas IL-6, IL-10 y el TGF- β | 32 |
| Detección de <i>T.gondii</i> en las placentas por qPCR presencia/ausencia..... | 33 |
| DISCUSIÓN..... | 34 |
| CONCLUSIONES..... | 38 |
| ANEXO..... | 39 |
| BIBLIOGRAFÍA | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> | 11 |
| Figura 2. Relación entre la tasa de transmisión congénita y el daño causado por la transmisión congénita durante el tiempo de gestación. | 12 |
| Figura 3. Respuesta inmunologica proinflamatoria contra <i>T. gondii</i> durante la gestación..... | 14 |
| Figura 4. Comparación entre la placenta humana y murina. | 15 |
| Figura 5. Tiempo y temperatura por ciclos de la qPCR estandar de 2 horas de 40 ciclos para las sondas taqman empleadas en la metodología. | 25 |
| Figura 6. . Citología vaginal: en esta figura se pueden observar las diferentes poblaciones celulares presentes en la vagina. | 30 |
| Figura 7. Citología vaginal con tinción azul de alcian modificada representativa de metaestro post-coito..... | 31 |
| Figura 8. Gráficas de variación en la expresión de los genes que codifican para FcRn (fcgrt); IL-6 y TGF- β para cada uno de los tres grupos: no infectadas, infectadas con 10^4 parásitos e infectadas con 10^5 parásitos. | 32 |
| Figura 9. Grafica de qPCR presencia/ausencia para un fragmento del gen B1 o GPDH de <i>T. gondii</i> | 33 |

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

CCL. Ligando de quimiocina.

cDNA. Ácido desoxirribonucleico complementario.

CICUAL. Comité institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

DENV. Virus del dengue.

DL50. Dosis Letal media.

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

Dpc. Dias post coito.

Dpi. Dia post infección.

FcRn. Receptor neonatal de la fraccion cristalisada de inmunoglobulinas

GOI. Gen de interes.

GPDH. Glicerol-3- fosfato deshidrogenasa.

HEC-1A. Linea celular de adenocarcinoma endometrial.

HKG. Gen endogeno.

IFN- γ . Interferon gamma.

IgG. Inmunoglobulina G.

IgM. Inmunoglobulina M.

IL. Interleucina.

MAMPs. Patrones moleculares asociados a microbios.

NF- κ B. Factor nuclear kappa B.

PBS. Buffer de fosfatos.

qPCR. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RNA. Ácido ribonucleico.

RT-PCR. Retrotranscripcion- Reacción en cadena de la polimerasa.

SIDA. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SSF. Solución salina fisiologica.

TGEV. Virus de la gastroenteritis transmisible.

TGF- β . Factor de crecimiento transformante beta.

TLR. Receptor tipo Toll.

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa.

VIH-1 Virus de inmunodeficiencia humana tipo.

ZIKV. Virus del zika.

RESUMEN

La toxoplasmosis congénita es causada por la transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* de madre a hijo durante el embarazo. Puede causarle daños neuro-oftálmicos o incluso sistémicos al feto, que pueden durar toda la vida. Se sugiere que varios receptores de la respuesta inmunológica -supuestamente relacionados con la protección-, podrían paradójicamente favorecer la transmisión congénita, tales como el FcRn, el cual media el transporte de IgG de la madre al feto a través de la placenta. Esta hipótesis surge del hecho de que la curva de de probabilidad de infección congénita es paralela a la expresión del FcRn placenta y de que in vitro hemos observado en el laboratorio que la opsonización con anticuerpos IgG facilita la entrada del parásito a células endoteliales, en las que se expresa este receptor. También se ha considerado que el ambiente inmunológico regulado o exacerbado -mediado por la liberación de ciertas citocinas- influye en el paso vertical de la madre al feto. Se tiene documentado que la expresión del FcRn se modifica en presencia de algunas infecciones virales en las que se induce un ambiente pro-inflamatorio. Por estas razones, el objetivo de este trabajo fue analizar si la expresión en la placenta del FcRn y las citocinas TGF- β IL-6 e IL- 10 se modifica en un modelo en ratón de infección congénita por *T. gondii* en el tercer tercio de gestación.

Nuestros resultados muestran que la infección con *T. gondii* durante el tercer tercio de gestación modifican la expresión del FcRn, TGF- β , IL-6 pero no de la IL- 10, la cual no fue detectada en las placentas de ratonas no infectados ni en las placentas de ratonas infectados. Además, observamos que la infección con *T. gondii* induce la expresión del FcRn dependiendo de la carga parasitaria en el tercer tercio de gestación en ratonas, generando una respuesta proinflamatoria modulada, debido al aumento de expresión en las citocinas TGF- β e IL-6.

INTRODUCCIÓN

***Toxoplasma gondii*, características y ciclo biológico**

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado causante de la toxoplasmosis, que infecta células nucleadas principalmente de hospedadores endotérmicos, siendo los felinos sus hospedadores definitivos (Molina et al ,2019). El resto de los animales homeotermos que llegan a ser infectados con *T. gondii*, incluyendo al ser humano, se consideran hospedadores intermediarios. La reproducción sexual del parásito solo es posible en los hospedadores definitivos, mientras que en los hospedadores intermediarios se reproduce de forma asexual (Giraldo, 2008).

Las principales formas parasitarias de *Toxoplasma gondii* son tres:

- Taquizoito. Forma infectiva asexual de replicación rápida, su apariencia es arqueada con un tamaño de 6 a 8 μm .
- Ooquiste. Tienen forma ovoide miden aproximadamente de 10 a 12 μm ; los ooquistes inmaduros o no esporulados (no infecciosos) son liberados al ambiente mediante las heces de los hospedadores definitivos, y en el ambiente maduran o esporulan conteniendo 8 esporozoitos infecciosos.
- Colonia de bradizoitos (quiste). Son formadas por varios miles de bradizoitos (forma lenta de replicación asexual de *T. gondii*), contenidas en una estructura llamada quiste, cuyo tamaño va de 10 a 100 μm . La colonia de bradizoitos se referirá en este trabajo como quistes; los quistes son la forma de infección crónica, ya que permanecen dentro de los tejidos

T. gondii puede agruparse en 3 diferentes líneas clonales de acuerdo a su genoma, tales como tipo I, tipificada cepa RH; tipo II, cepa ME49; y tipo III. El tipo I es la forma más virulenta y letal en ratones, con una DL50 <10 y solo se llega a la fase aguda de la infección; mientras que los tipos II y III, de virulencia menor en comparación con el tipo I, con una DL50 <100 llegan hasta una fase crónica de la

infección. *T. gondii* tipo II es la más frecuente en pacientes con SIDA y tipo II cepa ME49 en toxoplasmosis congénita (Gavrilescu *et al*, 2001).

El ciclo biológico de *T. gondii* depende de hospedadores definitivos y hospedadores intermediarios. Los felinos, hospedadores definitivos, como el gato doméstico se infectan consumiendo ratones infectados con quistes tisulares, dentro de los cuales hay bradizoitos (forma de replicación lenta); estos son liberados por acción de las enzimas gástricas del gato (Molina *et al* , 2019) . Una vez liberados los bradizoitos en el sistema digestivo del gato, invaden el epitelio intestinal y comienzan a reproducirse de forma sexual, lo cual culmina en la generación de ooquistes con esporozoitos no esporulados (no infecciosos). Los ooquistes son liberados al ambiente durante la deposición de heces y tardan de 3 a 5 días en esporular (ser infecciosos), dependiendo de las condiciones ambientales, como un clima húmedo y cálido. Una vez esporulados, los hospedadores intermediarios se pueden infectar por el consumo de alimentos o agua contaminada (Romero, 2018). El parásito accede al tracto digestivo donde los esporozoitos son liberados por acción de las enzimas gástricas e infectan el epitelio intestinal. Con esto comienza su reproducción asexual, diferenciándose rápidamente a taquizoítos (forma de replicación rápida), los cuales rompen los enterocitos infectados y continúan infectando células aledañas, hasta llegar a circulación sanguínea y linfática. Los taquizoitos se diferencian a bradizoitos, los cuales forman quistes tisulares en los tejidos del hospedador (Giraldo, 2008).

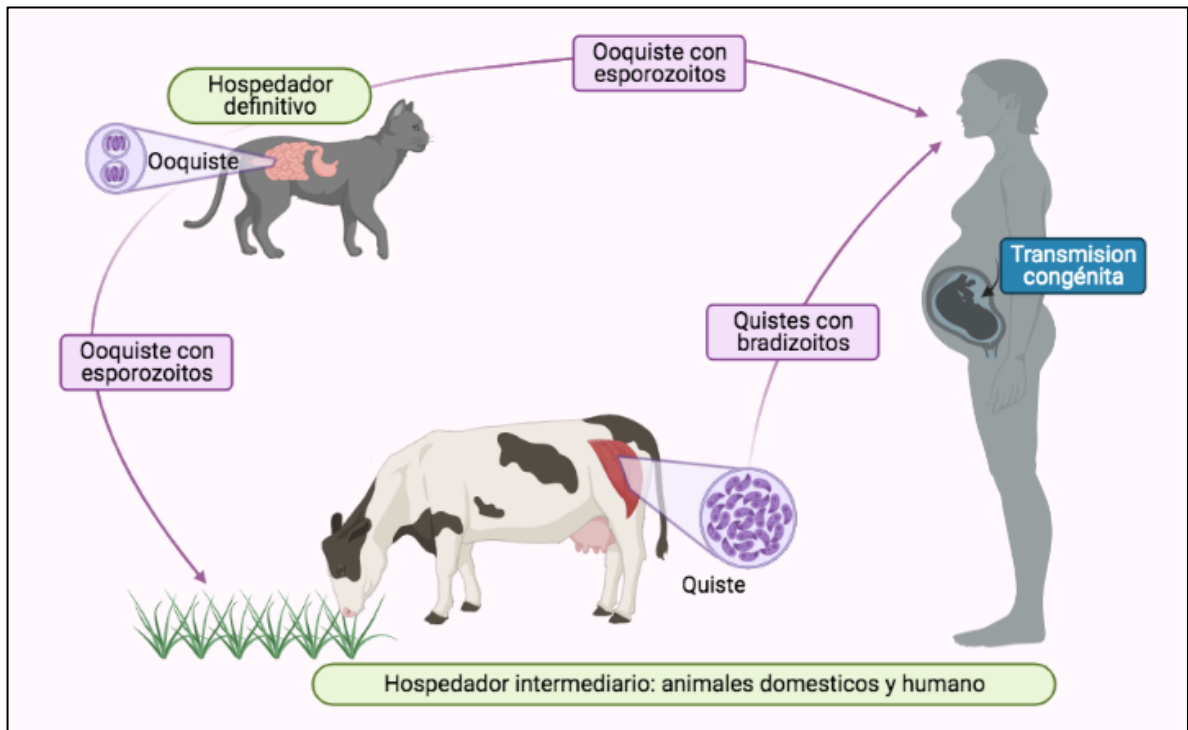


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Las vías de acceso del parásito al ser humano son por consumo de alimentos y agua contaminada con quistes u ooquistes del parásito (Infección adquirida) y transmisión de madre a feto, una vez que la mamá haya adquirido la infección (infección congénita). Imagen creada en BioRender

Toxoplasmosis adquirida y congénita

La forma de infección por *T. gondii* puede ser denominada como adquirida o congénita. La infección adquirida es denominada así cuando la infección es causada por el consumo de alimentos y agua contaminada con el parásito, mientras que la infección congénita se refiere al paso del parásito de la madre al feto durante el embarazo, puede provocar un amplio espectro de manifestaciones clínicas en fetos/infantes infectados, llegando así a comprometer su calidad de vida o incluso provocarles la muerte (Molina *et al*, 2019) .

Vela-Amieva y colaboradores (2005) determinaron que la tasa de incidencia del 0.05% de la toxoplasmosis congénita en la Ciudad de México, es de aproximadamente 2 casos por cada 1000 recién nacidos (Vela-Amieva *et al*, 2005).

La tasa de transmisión congénita depende del trimestre de embarazo en el cual la madre se infecta con el parásito, guardando una relación inversa con los daños que el parásito genera en el feto. Es más probable que la infección al feto suceda en el tercer trimestre del embarazo, generando lesiones o daños en el feto menos severas, en comparación con los dos trimestres anteriores (Dunn *et al*, 1999).

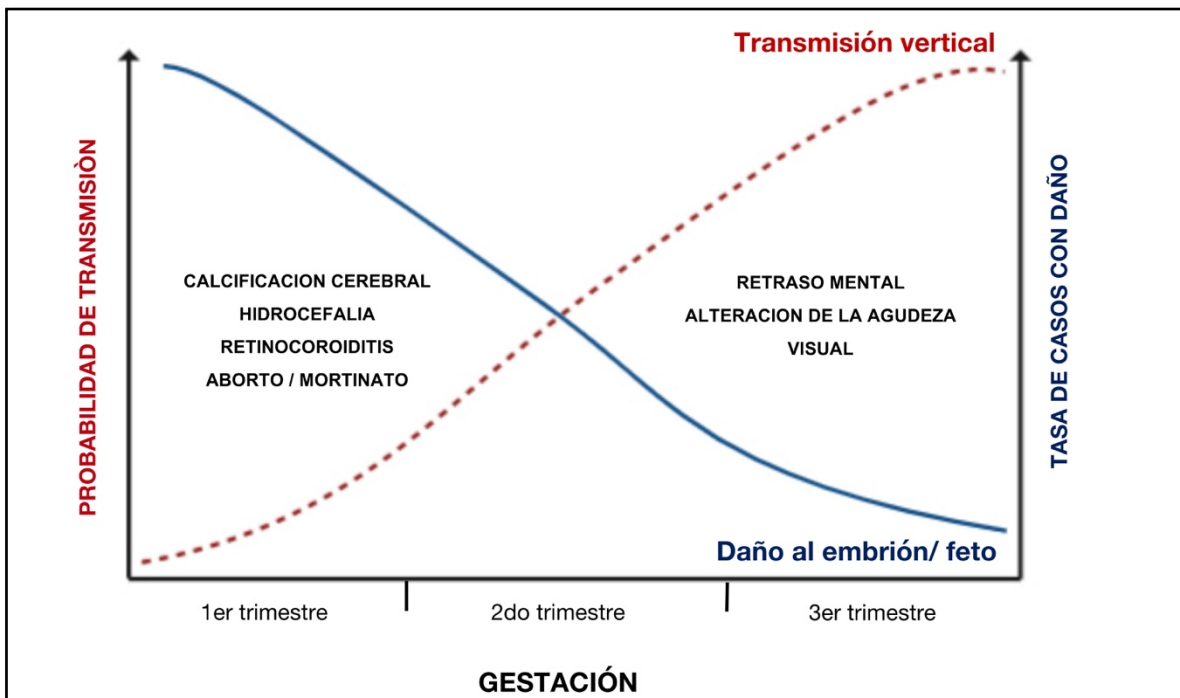


Figura 2. Relación entre la tasa de transmisión congénita y el daño causado por la transmisión congénita durante el tiempo de gestación. La probabilidad de transmisión congénita (transmisión vertical) es menor en el primer trimestre de gestación, pero aumenta conforme avanza la gestación, siendo el tercer trimestre donde hay una mayor probabilidad, sin embargo el daño al embrión/feto causado por la infección es más grave o fatal, en el primer trimestre, ya que normalmente desencadena abortos mientras que en el tercer trimestre son menos graves los daños. Modificada de (Dunn *et al*, 1999).

Respuesta inmunológica contra *T. gondii*

Una vez que el parásito invade al hospedador, éste último es capaz de reconocerlo e iniciar una respuesta inmunológica en su contra. En células inmunológicas no especializadas como las células epiteliales del tracto digestivo (Amersfoort, 2022), se expresan receptores como los TLRs (Cruz *et al*, 2019), los cuales son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, del inglés *Microbe-Associated Molecular Patterns*) de *T. gondii*, induciendo el reclutamiento de células inmunológicas especializadas tales como las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. Estas células en conjunto fagocitan y liberan citocinas proinflamatorias, interferón gama (IFN- γ), las interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); y moduladoras de la inflamación como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), del inglés *Transforming Growth Factor beta*) o la IL-10 (Cruz *et al*, 2019). Este ambiente de citocinas promueve la activación de células B, para que se diferencien a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las células plasmáticas producen inmunoglobulina M (IgM) en la fase aguda de la infección y posteriormente cambian a producir IgG. Tanto la IgM como la IgG pueden opsonizar al parásito, con lo que se puede activar la vía clásica del complemento y estimular la fagocitosis del parásito (Correa *et al*, 2011).

Respuesta inmunológica en la toxoplasmosis congénita

Las mujeres embarazadas son individuos inmunocompetentes, por lo tanto, son capaces de montar una respuesta inmunológica proinflamatoria al momento de adquirir la infección por *T. gondii*, de manera similar a lo descrito arriba. Sin embargo, se ha planteado que esta respuesta proinflamatoria puede ser regulada o exacerbada (Figura 3) (Correa *et al*, 2011).

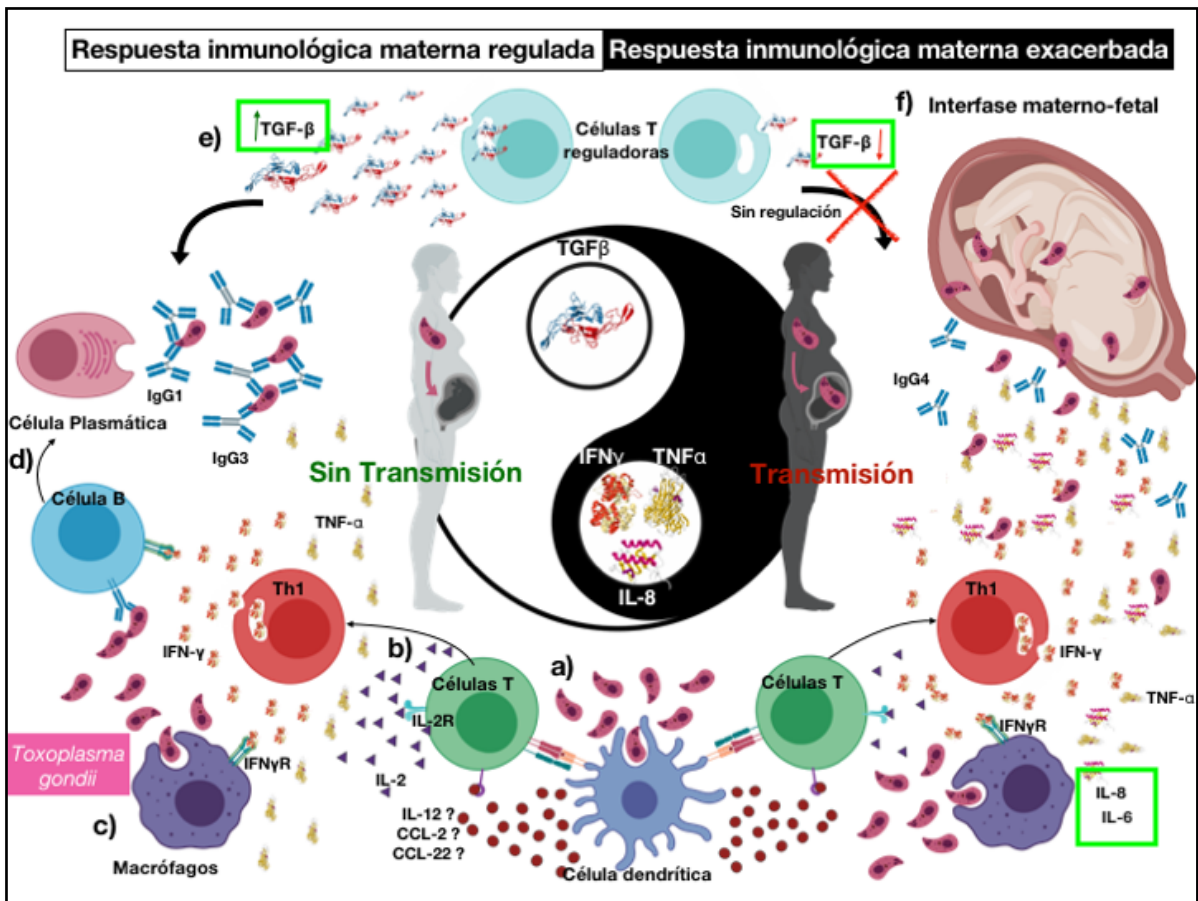


Figura 3. Respuesta inmunológica proinflamatoria contra *T. gondii* durante la gestación. (a) *Toxoplasma gondii* es reconocido por las células inmunitarias de la madre, como células dendríticas, (b) las cuales fagocitan, procesan el antígeno parasitario y producen citocinas y quimiocinas como IL-12, CCL-2 y CCL-22, las cuales activan a las células T vírgenes; (b) una vez activadas las células T vírgenes por el reconocimiento del antígeno de *T. gondii*, comienzan a producir citocinas como: IL-2, IFN- γ TNF- α . (c) El desarrollo de un ambiente pro inflamatorio estimula a otras células inmunitarias como macrófagos, los cuales median la fagocitosis del parásito. (d) Varias citocinas estimulan la activación de células B e inducen el cambio de clase de inmunoglobulinas. (e) Es posible que TGF- β tenga un papel esencial en el control de la transmisión vertical del *T. gondii*, severidad y diseminación de la infección congénita. (f) La poca producción o la ausencia de TGF- β se relaciona con un perfil proinflamatorio exacerbado que se asocia a la transmisión vertical, la severidad y diseminación del parásito en los neonatos. Modificado de (Gómez-Chávez *et al*, 2019).

En trabajos realizados en el Laboratorio de Inmunología Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría se ha descrito que en las madres con respuesta inmunológica proinflamatoria exacerbada se favorece la transmisión congénita y el desarrollo de

lesiones clínicas más graves en los neonatos infectados, mientras que una respuesta inmunológica proinflamatoria regulada se asocia con una menor transmisión del parásito (Gómez-Chávez *et al*, 2019). Cabe señalar que tanto en una respuesta inmunológica proinflamatoria regulada y no regulada, se producen anticuerpos IgG opsonizantes anti-*T. gondii*.

Fisiología del receptor neonatal para la fracción constante gamma de inmunoglobulinas IgG (FcRn) durante el embarazo

La placenta múrida comparte cierta similitud con la placenta humana, ambas son del tipo hemocorial, lo que quiere decir que solo hay una barrera epitelial que separa la sangre materna de los componentes fetales. Para el caso de los humanos la barrera epitelial consta de una capa siendo una placenta hemomonocorial, mientras que para los múridos son tres capas de epitelio las que dividen la sangre materna de los componentes fetales (Furukawa *et al*, 2014).

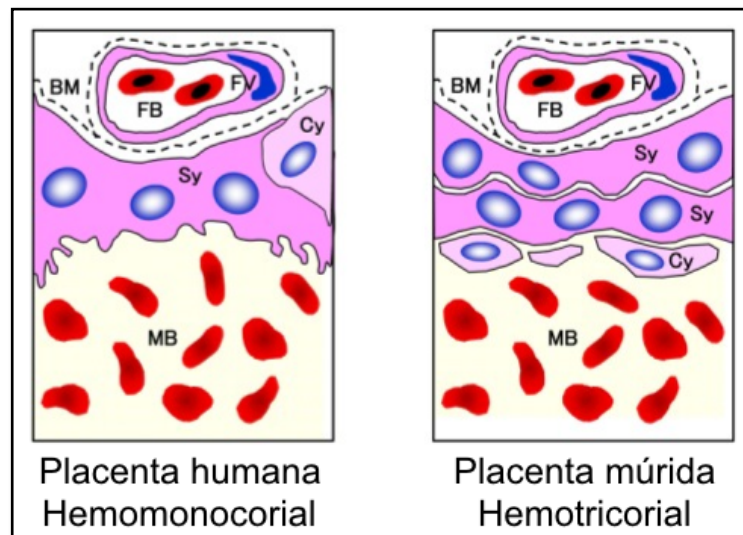


Figura 4. Comparación entre la placenta humana y múrida. MB, membrana basal; Sy, sincitiotrofoblasto; Cy, citiotrofoblasto; BM, membrana fetal; FB sangre fetal; FV, vaso fetal. Modificada de (Furukawa *et al*, 2014).

En placenta humana el FcRn se expresa a partir de la semana 13 del embarazo. Una de las funciones de este receptor es transferir inmunidad de forma pasiva al feto, ya que media el paso de IgG a través de la placenta, en teoría protegiendo al bebé durante su primer año de vida (Saji *et al*, 1999).

El FcRn, siendo un heterodímero, consta de una cadena α y una $\beta 2$ microglobulina y el ligando de este receptor es la inmunoglobulina G (IgG). Se encuentra presente en varias especies y distribuido en células de la barrera hematoencefálica, del epitelio de la vía aérea superior, de riñón, del endotelio vascular y en células presentadoras de antígenos profesionales, así como en otras células de origen hematopoyético. (Roopenian y Akilesh, 2007)

En humanos el FcRn es detectado en los sincitiotrofoblastos y células endoteliales de los vasos fetales de la placenta y en los móridos se detecta en las células endoteliales del endodermo del saco vitelino (Sari *et al*, 2017).

ANTECEDENTES

Rathore y colaboradores (2019) estudiaron en un modelo mórido cómo la presencia de anticuerpos IgG contra virus del Dengue, favorecían el paso del virus del Zika por placenta. Encontraron que el FcRn es una de las vías de acceso del virus del Zika hacia el feto para causar daños en él, así que decidieron medir su expresión, lo que demostró que este receptor se sobre expresaba en los fetos en aquellos ratones infectados con Zika en comparación con los que no.

Por otro lado, en un estudio realizado *in vitro* en enterocitos de porcino, también se detectó que el FcRn se sobreexpresa en aquellas células que fueron infectadas con el

virus de gastroenteritis transmisible (TGEV, del inglés *Transmissible gastroenteritis virus*) (Guo *et al* , 2016).

En el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, se encontró una relación positiva entre la presencia de anticuerpos IgG 1 anti-*T. gondii* en un mayor porcentaje (más del 50%) de madres con hijos congénitamente infectados que presentaron manifestaciones clínicas más graves (Cañedo-Solares *et al* , 2008). Paradójicamente esto se encuentra asociado a la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* en madres a la gravedad de las manifestaciones clínicas producidas en sus hijos.

Este hallazgo resulta contradictorio con la idea general de que la actividad del FcRn protege al feto. Nosotros sugerimos que los anticuerpos producidos por la madre contra el parásito podrían favorecer que los taquizoitos sean concentrados en la placenta, infectándola y en consecuencia infectar al feto. Otra posibilidad es que el FcRn facilite por transcitosis el paso de taquizoitos opsonizados con anticuerpos IgG maternos (Correa *et al* , 2011).

JUSTIFICACIÓN

La tasa de transmisión congénita de *T. gondii* incrementa hacia el final del embarazo (figura 3); interesantemente la expresión del FcRn también es mayor en el último trimestre del embarazo (Dunn *et al* , 1999).

El papel fisiológico del FcRn es reconocer y participar en el paso de IgG de la madre al feto en condiciones normales. Sin embargo, en varios trabajos realizados en el Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría se ha planteado la posibilidad de que este receptor esté involucrado en la transmisión congénita de *T. gondii*. Por lo tanto, establecer el grado de expresión del FcRn en la

placenta y si el parásito modula esta expresión ayudaría a dilucidar el papel de este receptor en la toxoplasmosis congénita (Correa et al , 2007).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿*T. gondii* induce la sobre expresión del FcRn en placentas del tercer tercio de la gestación en múridos?

HIPÓTESIS

Si hay infección por *T. gondii* en placentas del tercer tercio de gestación, entonces, se inducirá la sobre expresión del FcRn; mientras que en en placentas del tercer tercio de gestación no infectadas no se verá afectada la expresión del FcRn.

OBJETIVOS

Determinar el efecto de *T. gondii* sobre la expresión del FcRn en placentas del tercer tercio de gestación en un modelo múrido de infección congénita.

- Determinar la expresión de las citocinas IL-6, IL-10 y TGF- β en placenta
- Analizar el efecto de la carga parasitaria sobre la expresión del FcRn
- Detectar la presencia de parásitos en la interfaz materno-fetal

METODOLOGÍA

Diagrama general de trabajo

| | Semanas | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| Animales de experimentación: Recepción y aclimatacion | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Modelo de embarazo: grupo 1 | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | |
| Modelo de embarazo: grupo 2 | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | |
| Modelo de embarazo: grupo 3 | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| Extraccion de RNA en placentas | | | | | | ■ | | | | ■ | | | | ■ | | | | |
| Obtencion de cDNA por RT-PCR | | | | | | | ■ | | | | ■ | | | | ■ | | | |
| qPCR para la determinación de la expresión del FcRn, TGF-β, IL-6 e IL-10. Usando el cDNA. | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ |
| Extracción de DNA en placenta | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ |
| qPCR presencia/ausencia para <i>T. gondii</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ |

Animales de experimentación

Se emplearon 20 ratones *Mus musculus*, 15 hembras BALB/C y 5 machos C-57BL/6 de 8-12 semanas de edad. El marcaje de cada animal se realizó con plumón indeleble en el pelaje de la cabeza, el lomo, el cuello, la cola y las extremidades, generando en cada individuo un patrón de marcaje único.

Los animales se mantuvieron dentro del bioterio (avalado por el CICUAL: comité institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio 040/2018) de la Torre

de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, con periodos de luz/oscuridad de 12 horas, con comida y agua *ad libitum* en condiciones de cama y ambiente acorde a la NOM-062-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, bajo la supervisión de la Secretaria del CICUAL la M. en C. Lizbeth Xicotencatl García.

Modelo de embarazo

Después de asignarle identificación a cada animal las hembras se pesaron y se les realizó un lavado vaginal para hacer un análisis citológico empleando una tinción modificada de azul de alcian: combinación de giemsa con azul de alcian (anexo 1) (Sugiyama et al , 2021).

Para el lavado vaginal se tomaron 20 μ L de solución salina fisiológica (SSF), se sujetó a la hembra y se colocó la punta de la micropipeta en la vulva y se realizó el lavado inyectando y succionando la SSF con la micropipeta, al menos dos veces; posteriormente se colocó la SSF en un portaobjetos y se dejó secar al aire a temperatura ambiente; después se dejó sumergido en metanol absoluto durante 15 minutos y se enjuagó con agua corriente. Se realizó la tinción modificada de azul de alcian: gimsa y azul de alcian (Sugiyama, 2021) sumergiendo en la solución durante 10 minutos. Se enjuagó con agua corriente y dejó secar para realizar el análisis citológico.

La proporción de células en el análisis citológico se usó para identificar el estadio del ciclo estral de cada una de las hembras. Diestro, mayor presencia de leucocitos (4/5 del campo visual o más) con pocas células epiteliales nucleadas (1/5 del campo visual o menos). Proestro, mayor presencia de células epiteliales nucleadas y células epiteliales mucosales (3/4 del campo visual), que de células epiteliales queratinizadas (1/4 del campo visual o menos). Estro, presencia de células epiteliales queratinizadas.

Metaestro, presencia de células epiteliales queratinizadas (1/2 campo visual o menos) y leucocitos (1/2 campo visual o más)(Cora et al , 2015).

Las hembras fueron seleccionadas según su citología vaginal: proestro y estro; ya seleccionadas se colocaron con el macho en proporción 3:1 hembra: macho, siguiendo un modelo de harén. Se mantuvieron juntos por 18 horas, de las 17:30 h hasta las 7:30 h del día siguiente, durante el periodo de oscuridad (periodo de mayor actividad).

Para comprobar si hubo coito se buscó tapón vaginal y se llevó a cabo una segunda citología vaginal para observar en el microscopio un cambio en el ciclo estral o la presencia de espermatozoides. Adicionalmente se registró el peso diario de las hembras que estuvieron en contacto con el macho para confirmar la gestación al día 12 post-coito (*dais post coitum*, dpc). Un incremento de 5 g en el peso de las hembras 12 dpc fue usado para confirmar la gestación y mantenerlas sin contacto con el macho hasta los 15 dpc.

A los 15 dpc se infectaron con taquizoitos de *T. gondii* Tipo II ME49 en amortiguador de fosfatos salino (PBS) o se administró el vehículo (SSF) a través de la vena lateral de la cola, según fue para cada grupo:

- Grupo1, 50 μ L de SSF; n=5 hembras
- Grupo 2, con 10^4 taquizoitos de *T. gondii* Tipo II ME49 en 50 μ L de PBS; n = 5 hembras
- Grupo3, con 10^5 taquizoitos de *T. gondii* Tipo II ME49 en 50 μ L de PBS; n = 5 hembras

Al día 1 post-infección (dpi) se procedió a la eutanasia por dislocación cervical de los 3 grupos y se extrajeron los cuernos uterinos con los productos fetales. Los cuernos uterinos se cortaron a la mitad. Una mitad se colocó en formalina amortiguada (anexo 2). La otra mitad se separó en la placenta, feto, membrana fetal e implantaciones de placenta en el útero. Individualmente, todos los tejidos obtenidos se congelaron empleando nitrógeno líquido. Al azar se seleccionó una pieza de cada tejido y se

colocaron por separado en 1 mL de TRIzol Reagent (Gibco BRL, USA) y se almacenaron a -80° C hasta su procesamiento para la extracción de RNA total.

Extracción de RNA de placenta

El RNA total se extrajo de una placenta por cada hembra gestante en cada uno de los grupos mediante el método de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987) (Rio et al, 2010). Permitiendo que se descongele la placenta con TRIzol Reagent (Gibco BRL, USA), para traspasarlo en un mortero se agregó nitrógeno líquido, las veces necesarias para macerar completamente el tejido. El tejido macerado se colocó de nuevo en el tubo donde se tenía preservado, se agregaron 0.2 mL de cloroformo (Sigma-Aldrich, USA) por cada mL de TRIzol Reagent (Gibco BRL, USA) en la muestra y se agitó por 15 s. Después se llevó a centrifugar a 10000g por 10 min a 5°C. Se Traspasó la fase clara (la fase de arriba) a un tubo nuevo, debidamente etiquetado, sin perturbar la interfase y se le agregó 0.5 mL de isopropanol por mL de TRIzol Reagent (Gibco BRL, USA), se agitó vigorosamente y dejó toda la noche a -20° C.

Una vez transcurrido el tiempo mencionado se recolectó el RNA precipitado centrifugando a 10000g por 10 min a 5° C, para después decantar con cuidado el sobrenadante. Para poder resuspender el RNA precipitado primero se realizaron dos lavados con etanol con la finalidad de quitar la mayor cantidad de proteínas que pudieran estar presentes aun en el precipitado. Para el primer lavado se agregó 1 mL de etanol (Sigma-Aldrich, USA) al 75%, se centrifugó a 10000 g por 5 min a 4°C y se decantó con cuidado el sobrenadante; en el segundo lavado se resuspendió el precipitado en 1 mL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, USA), se centrifugó a 10000 g por 5 min a 4°C y decantó el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado por 15 minutos para resuspender después en 50 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC) (Thermo Scientific, USA) y se incubó a 55-60°C por 10 min.

El RNA obtenido se cuantificó en el espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, USA) y el DNA remanente fue degradado usando para cada muestra en un tubo nuevo: 2 μ L de 10X Buffer DNasa I (Invitrogen, USA) y 1 U DNasa I (Invitrogen, USA) por 4 μ g de RNA total; se ajustó el volumen del tubo con agua inyectable a 20 μ L. Se incubó por 30 min a 37 °C. Para inactivar la DNasa I (Invitrogen, USA) se agregó 2.5 μ L de 25 mM EDTA (Invitrogen, USA) e incubó por 10 min a 65 °C - 75 °C.

Para verificar la integridad del RNA antes de llevar a cabo la RT-PCR se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, con un amortiguador de corrida Tris Borato EDTA (TBE), se colocó en cada pozo del gel un volumen total de 5 μ L: 2 μ L de muestra, 1 μ L de gelred (Biotum, USA) y 2 μ L de amortiguador de carga Orange LD (Thermo Scientific, USA). Se dejó correr la electroforesis a 80 V por 50 minutos. La integridad del RNA fue determinada en un fotodocumentador (BioDoc-It Imaging System, USA), identificando la presencia de las bandas (homogéneas e intensas) visibles gracias a la tinción con gelred (Biotum, USA), correspondientes al rRNA 28s, rRNA 18s, rRNA 5.8s y rRNA 5s.

RT-qPCR para la determinación de la expresión del FcRn, TGF- β , IL-6 e IL-10.

Obtención de cDNA por RT-PCR

Primero se ajustó el volumen de las muestras para tener 4 μ g de RNA. Se mezclaron bien los reactivos de Invitrogen, USA antes de usarlos. En un tubo estéril de 0.5 mL previamente etiquetado se mezclaron: la cantidad de volumen correspondiente a 4 μ L de RNA, 1 μ L de 10 mM dNTP mix, 1 μ L Oligo dT 0.5mg/mL y se ajustó a un volumen final de 10 μ L con agua DEPC. Se incubó esta mezcla RNA/primer a 65° C por 5 minutos y después se colocó en hielo por al menos 1 minuto.

En otro tubo se preparó la reacción 2X mix agregando para 16 reacciones: 32 μ L de 10X RT buffer, 64 μ L de 25 mM $MgCl_2$, 32 μ L de 0.1 M DTT y 16 μ L de RNasa OUT (40U/ μ L).

Después se agregaron 9 μ L de este mix 2x a cada tubo de RNA/ primer mezcla que se preparó primero, se mezcló e incubó a 42°C por 2 minutos. Concluido ese tiempo se agregó 1 μ L de SuperScript II RT a cada tubo excepto al control; para este se agregó agua DEPC. Se volvió a Incubar a 42° C por 50 minutos y para terminar la reacción se llevó a 70° C por 15 minutos y colocó en hielo. Se agitaron bien los tubos y se agregó 1 μ L de RNasa H a cada tubo e incubó a 37° C por 20 minutos, obteniendo así el cDNA.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti de Applied Biosystems, México.

qPCR para la determinación de la expresión del FcRn, TGF- β , IL-6 e IL-10.

La qPCR que se realizó fue una duplex ya que se emplean dos sondas por pozo de la placa. La primer sonda corresponde al gen que se expresa en la placenta y no sufre modificaciones en su expresión debido a la infección, que es el gen endógeno o *Housekeeping Gene* (HKG), en nuestro caso fue el gen rRNA 18s y la segunda sonda corresponde *gene of interest* (GOI), o gen de interés, que puede estar o no modificado debido a la infección presente en nuestro trabajo las moléculas a determinar expresión.

La qPCR a partir del cDNA obtenido se realizó con sondas Taqman de Thermo Scientific, USA. Las sondas usadas fueron las siguientes: Mm04277571_s1 para el gen endógeno rRNA 18s, Mn12054551_m1Fcgrt para el FcRn, Mn00446190_m1Il6 para la IL-6, Mm1227699_m1Tgf1 para el TGF- β y Mm1288386_m1Il10 para la IL-10. La preparación de reactivos y llenado de la placa se realizó en una campana de flujo laminar.

El cDNA obtenido previamente se usó como molde para determinar la expresión de los genes de interés a una dilución 1:20- del cual se agregaron 2.5 μ L a cada pozo de la placa de 48 pozos usada para la qPCR y posteriormente 7.5 μ L de la mezcla de reactivos todos de Thermo Scientific, USA, que llevan a cabo la reacción; para 50 reacciones: 250 μ L de Master mix, 15 μ L Sonda 1 (HKG), 25 μ L Sonda 2 (GOI) y 85 μ L de agua inyectable.

Una vez llenada la placa de 48 pozos se colocó en el termociclador (Step One real-time PCR system, Applied biosystems, México) y se ajustaron los parámetros de una qPCR de cDNA duplex cuantitativa por el método $\Delta\Delta C_t$ estándar de 2 horas (Figura 5).

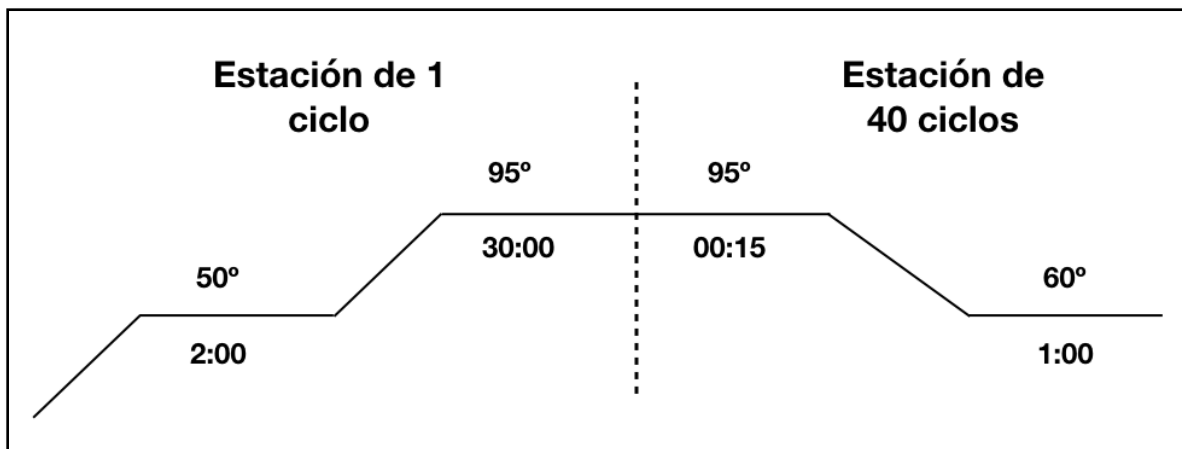


Figura 5. Tiempo y temperatura por ciclos de la qPCR estándar de 2 horas de 40 ciclos para las sondas taqman empleadas en la metodología.

qPCR presencia/ausencia de DNA de *T. gondii*

Extracción de DNA de placenta

Las cantidades usadas en la técnica es para cada 100 mg de tejido.

Cada placenta fue macerada y colocada en 1 mL de solución de lisis celular (Qiagen, USA), incubando por 1 hora a 56° C. Después se agregaron 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL, Qiagen, USA) y se dejó incubando toda la noche a 56° C para pasar a tubos Falcón de 15 mL la solución obtenida, tratando de no traspasar los pedazos de tejidos que no hayan sido lisados completamente. Se adicionó a cada tubo 1 mL de solución precipitadora de proteínas (Qiagen, USA), y agitó vigorosamente con vortex por 20 s y hasta ver blanca la solución, se centrifugó a 806g por 10 minutos.

En otro tubo Falcón se agregaron 2 mL de 2-propanol (100%, Sigma, USA) y se decantó el sobrenadante de los tubos centrifugados en el nuevo tubo. Se mezcló por inversión hasta ver hebras de DNA. De nuevo se centrifugó a 3000 rpm/ 10 minutos y una vez más se decantó el sobrenadante en un frasco de residuos y lavó el precipitado (DNA) con 2 mL de etanol (70%, Sigma, USA) para volver a centrifugar a 3000 rpm/ 10 minutos. Se decantó el sobrenadante en un frasco de residuos y se dejó evaporar el remanente de etanol. El DNA fue hidratado comenzando a adicionar 50 µL de solución de hidratación (Gentra systems, USA), hasta que todo el DNA quedó en solución. Posteriormente se cuantificó el DNA en solución con el espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, USA).

qPCR presencia/ausencia

Se realizó una qPCR presencia/ausencia para detectar la presencia de *T. gondii* en placenta, utilizando sondas TaqMan para un fragmento del gen *gpdh* del parásito (conocido también como *B1*) a partir de las extracciones de DNA total de placenta.

La preparación de reactivos y el llenado de la placa de 48 pozos se realizaron en una campana de flujo laminar.

Se cálculo tener 500 ng de DNA en 2.5 µL diluyendo el DNA obtenido. Para la mezcla de reactivos (Applied Systems, USA) se usaron para 50 reacciones: 250 µL de

TaqMan Universal PCR Master Mix, 25 µL de Oligos y sondas, 50 µL de 10x Exo IPC Mix, 10 µL de 50x Exo IPC DNA y 40 µL de Agua inyectable.

Se agregaron 7.5 µL de la mezcla de reactivos a cada pozo de la placa y acorde al diseño de la placa se colocaron 2.5 µL de DNA muestra; 2.5 µL 10x Block Exo IPC (control interno); 2.5 µL de agua inyectable (control negativo); y 2 µL de DNA de *T. gondii* ME49 (control positivo). Excepto el control positivo, cada muestra, control negativo y control interno se hicieron por triplicado. Después se ajustaron los parámetros en el equipo de qPCR (Step One real-time PCR system, Applied biosystems, México), para una PCR presencia/ausencia estándar de 2 h para una placa de 48 pozos.

Análisis de resultados y estadística

El cambio en la expresión de los genes de interés se determinó mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2006). Este método evalúa el cambio de la expresión genética usando como control la expresión de un gen endógeno (*HKG*, del inglés house keeping gene) que se expresa de forma constante en el tejido y los genes de interés (GOI, del inglés gene of interest). El equipo de tiempo real después de la amplificación arroja un valor de ciclo umbral o Ct para el HKG y el GOI de cada muestra, con lo que se puede calcular el cambio en la expresión del GOI entre los grupos analizados.

Por ejemplo:

| | Ct HKG | Ct GOI |
|------------------------|--------|--------|
| No infectada (control) | 25.10 | 31.64 |
| Infectada (muestra) | 23.92 | 35.61 |

$$\Delta Ct (control) = Ct GOI - Ct HKG$$

$$\Delta Ct (control) = 31.64 - 25.10$$

$$\Delta Ct (control) = 6.54$$

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct \text{ GOI} - Ct \text{ HKG}$$

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = 35.61 - 23.92$$

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = 11.69$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{control})$$

$$\Delta\Delta Ct = 11.69 - 6.54$$

$$\Delta\Delta Ct = 5.15$$

$$\text{Cambio en la expresión} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{Cambio en la expresión} = 2^{5.15}$$

$$\text{Cambio en la expresión} = 35.5$$

RESULTADOS

Citología vaginal

Los resultados de citología vaginal se obtuvieron por lavado vaginal para después realizar una tinción modificada de azul de alcian. Dependiendo del estadio del ciclo estral cambia la proporción de poblaciones celulares observadas al microscopio. Diestro: mayor presencia de leucocitos con pocas células epiteliales nucleadas. Proestro: Mayor presencia de células epiteliales nucleadas y células epiteliales mucosales, que de células epiteliales queratinizadas. Estro: presencia de células epiteliales queratinizadas. Metaestro: presencia de células epiteliales queratinizadas y leucocitos. (Figura 6)

Las hembras cuya citología vaginal resultara en Proestro y Estro se considera receptiva al macho, lo que aumentaba la probabilidad de coito, estando juntos durante el periodo nocturno por 18h. Al finalizar este periodo de tiempo se considera que hubo coito si se veía tapón vaginal en la vulva de las hembras o bien si en la citología se observan espermatozoides. (Figura 7)

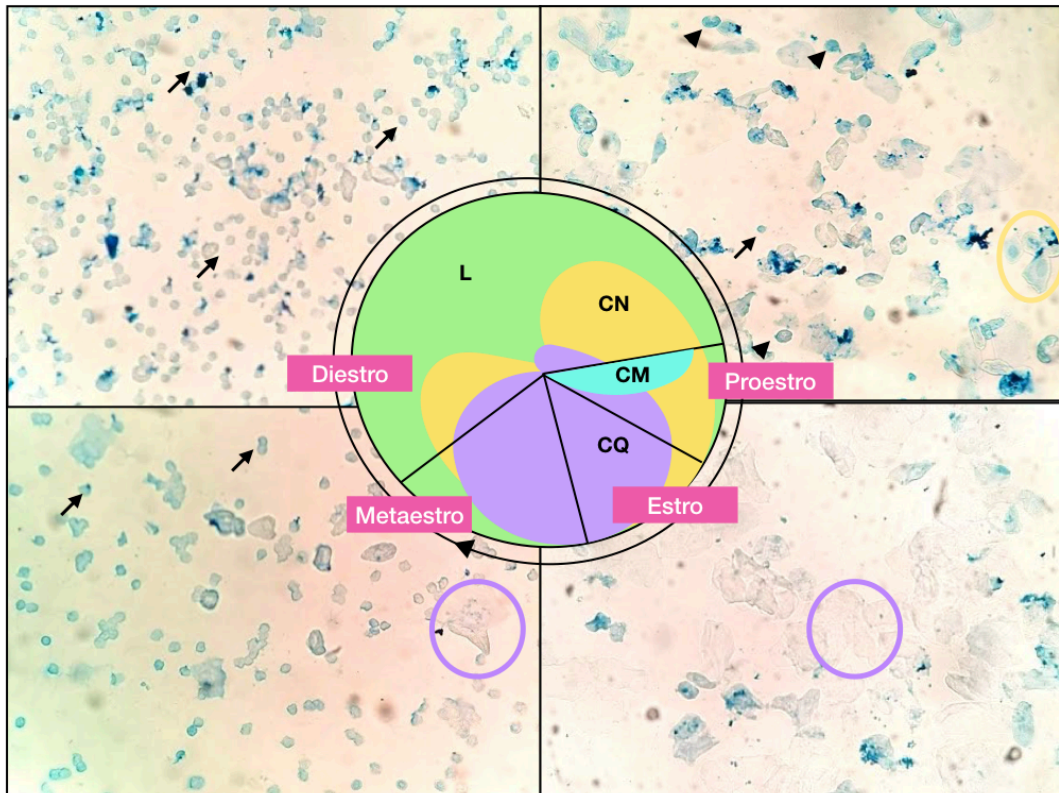


Figura 6. . Citología vaginal: en esta figura se pueden observar las diferentes poblaciones celulares presentes en la vagina. L = leucocitos flechas; CN = células epiteliales nucleadas circulares en amarillo; CM = células epiteliales mucosales cabeza de flecha; CQ = células epiteliales queratinizadas circulares en morado. 400x, modificado de(Cora *et al*, 2025) con fotomicrografías originales.

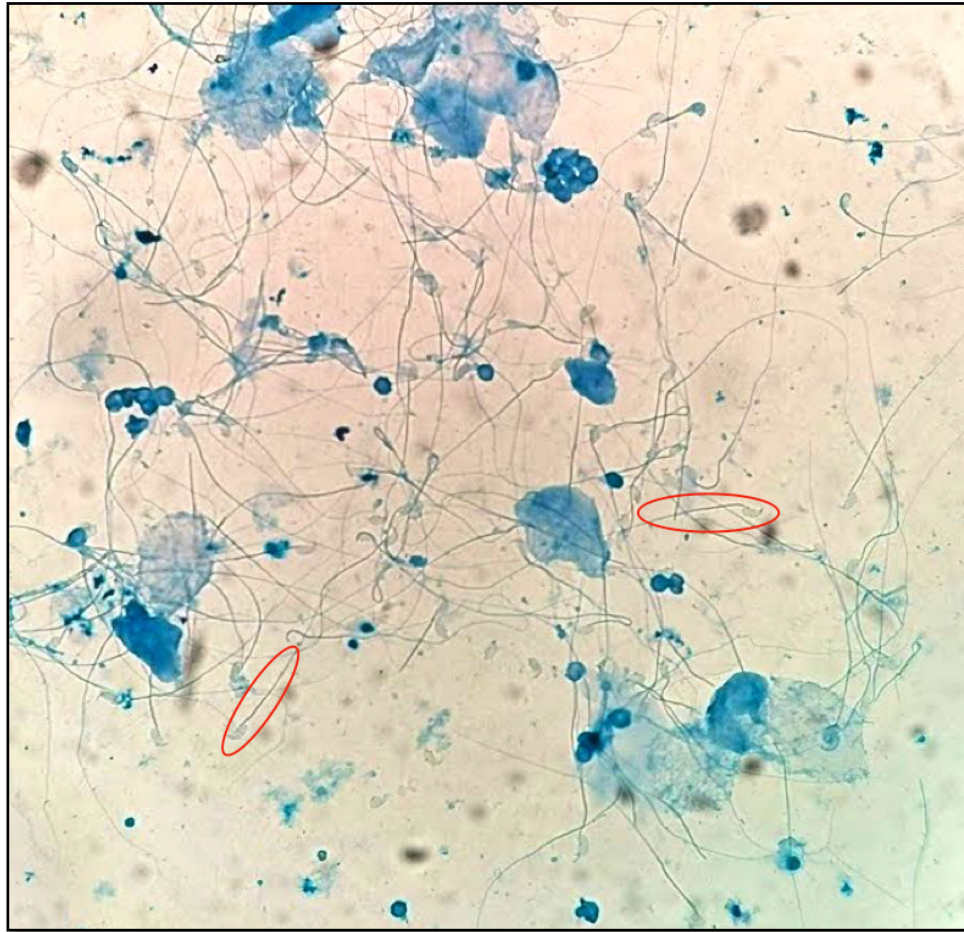


Figura 7. Citología vaginal con tinción azul de alcian modificada representativa de metaestro post-coito. Se observa presencia de espermatozoides (rodeado en rojo). 400x. Fotomicrografía original

Expresión del receptor FcRn y las citocinas IL-6, IL-10 y el TGF- β

Los resultados arrojados por la RT-qPCR demostraron que en placentas del tercer tercio de gestación de ratonas infectadas con 10^4 y 10^5 taquizoitos con la cepa ME49 de *T.gondii* hay un incremento en la expresión del receptor FcRn, las citocinas IL-6 y TGF- β ; en comparación con las placentas de ratonas no infectadas. También se realizó una RT-qPCR para determinar la expresión de IL-10, pero la expresión de esta citocina no fue detectada en ninguna de las placentas analizadas de los 3 grupos (Figura 8).

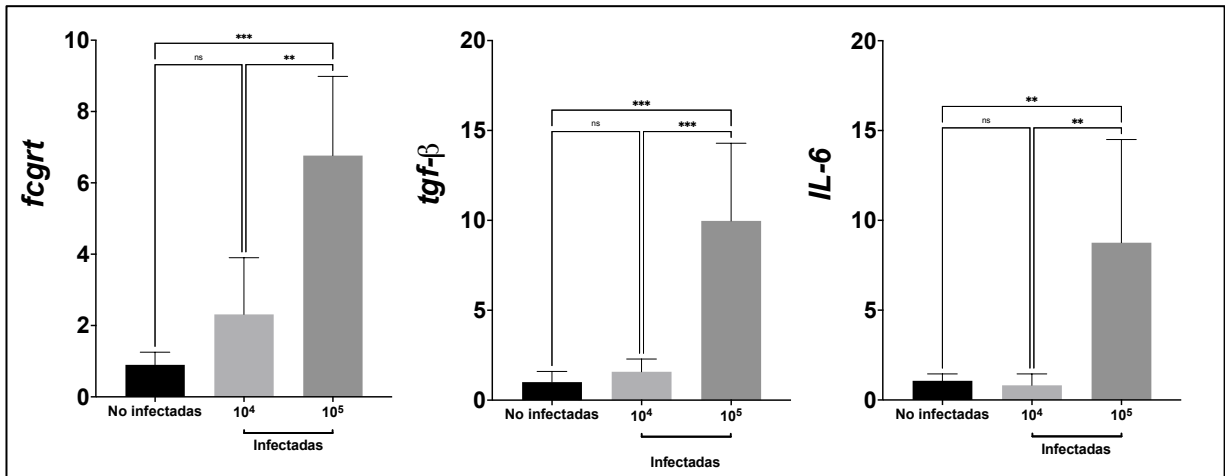


Figura 8. Gráficas de variación en la expresión de los genes que codifican para FcRn (*fcgrt*); IL-6 y TGF- β para cada uno de los tres grupos: no infectadas, infectadas con 10^4 parásitos e infectadas con 10^5 parásitos. La expresión de los genes es adimensional y se determinó mediante RT-qPCR; los datos se analizaron por ANOVA-TUKEY; ** $p \leq 0.05$ * $p \leq 0.005$.**

Detección de *T.gondii* en las placentas por qPCR presencia/ausencia.

Con el proposito de confirmar la presencia del parasito en este tejido y por ende la infección. Se realizo una qPCR presencia/ausencia para lograr detectar a *T. gondii* en la placenta, utilizando un fragmento del gen B1 o GPDH el cual es unico para *T. gondii*.

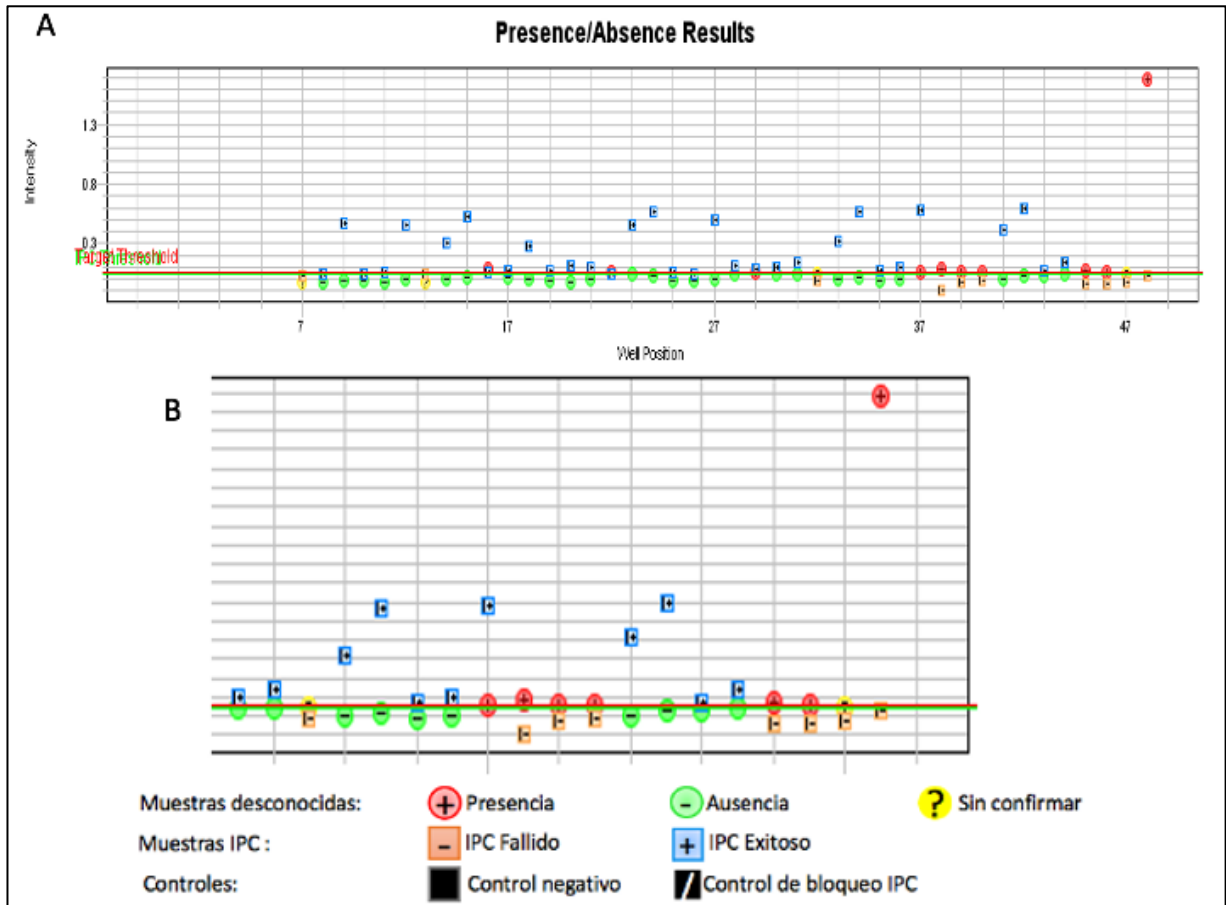


Figura 9. Grafica de qPCR presencia/ausencia para un fragmento del gen B1 o GPDH de *T. gondii*. A, En la gráfica podemos ver en el eje "x" los ciclos de la qPCR y en el eje de las "y" intensidad que más hace referencia a la fluorescencia emitida por la sonda al momento de llevarse a cabo la qPCR e indica las copias amplificadas. La línea roja y la línea verde son los puntos de corte de presencia/ausencia de DNA de *T. gondii* y los controles internos (IPC) de la reacción, cuanto más cercanos estén estos dos puntos de corte, el ensayo se considera válido. B, La qPCR se hizo por triplicado para cada muestra dando presencia de *T. gondii* (positivas, +rojo); solo las muestras correspondientes a dos placentas, que corresponden a hembras infectadas con 10^4 y 10^5 cada una. El positivo más alto en la gráfica corresponde al control positivo.

DISCUSIÓN

T. gondii es un parásito intracelular obligado capaz de atravesar barreras fisiológicas que protegen a órganos como el ojo, el cerebro y la placenta; es también capaz de desencadenar una respuesta inmunológica proinflamatoria mediada principalmente por IFN- γ y la activación de linfocitos Th1, para finalmente activar a los linfocitos B e inducir la producción de anticuerpos anti-*T. gondii*.

Los mecanismos sobre cómo *T. gondii* logra invadir la placenta y diseminarse de la madre al feto no han sido establecidos; sin embargo, se sabe que llega por vía sanguínea y se ha propuesto que una de las vías de infección a la placenta podría ser mediada por el receptor FcRn, que de manera fisiológica tiene un papel crucial en la transferencia pasiva de inmunidad humoral al feto, ya que media el paso de IgG materna por transcitosis a través de la placenta. La madre inmunocompetente es capaz de reconocer al parásito e inducir una respuesta inmunológica capaz de llevar a la producción de anticuerpos específicos contra *T. gondii*. Se ha reportado la producción de anticuerpos de diferentes clases como IgM, IgG e IgA tanto en saliva como en suero (Cañedo-Solares *et al*, 2008). Los anticuerpos maternos pueden actuar opsonizando al parásito y con esto inducir la activación del complemento o la fagocitosis, lo que promueve la disminución de la carga parasitaria, protegiéndola de una infección severa y diseminada (Correa *et al*, 2007).

Paradójicamente para el feto, se ha reportado la existencia de una relación entre la subclase de inmunoglobulina G producida por la madre y el desarrollo de manifestaciones clínicas en el recién nacido infectado congénitamente, sugiriendo que el fenómeno de transporte de IgG de la madre hacia el feto podría no estar relacionado necesariamente con la protección (Cañedo, 2008). Además en el Laboratorio de Inmunología Experimental se han llevado a cabo ensayos *in vitro* en células humanas en donde la infección con parásitos opsonizados con IgG anti *T. gondii* tienden a ser internalizados en mayor número en comparación con parásitos no opsonizados (no publicado). Estos hallazgos han permitido sugerir la hipótesis de que la IgG anti *T.*

gondii materna que opsoniza al taquizoito durante el embarazo podría paradójicamente facilitarle ser movilizado por el FcRn en la placenta y favorecer la infección del feto.

En este sentido, existen varios trabajos en los cuales se reporta cómo el FcRn figura como mediador del paso de patógenos en diversos tejidos. Como se sabe *T. gondii* no es el único patógeno que se transmite vía congénita y causa graves lesiones y daños a largo plazo en el feto. Por ejemplo, en Centro América la causa más común de microcefalia en neonatos es debida a una infección congénita por el virus del Zika (ZIKV), el cual se ha vuelto una creciente epidemia en estas regiones. El ZIKV pertenece a la familia de los *Flaviviridae* y comparte una similitud antigénica con otro miembro de esta familia de virus como del Dengue (DENV), siendo el DENV endémico de las regiones de Centro América. Algo que llama la atención es que no todos los neonatos con microcefalia tienen madres seropositivas a ZIKV, teniendo en cuenta que el DENV y el ZIKV tienen similitud antigénica y afectan en las mismas regiones. En el 2019, Rathore y colaboradores se interesaron en la creciente epidemia en Centro América y sugieren que la infección por ZIKV es promovida de la madre al feto debido a la presencia de anticuerpos anti-Dengue, que como ya se mencionó antes, el virus del DENV es endémico de las mismas regiones de Centro América que reporta nacimiento de bebés con microcefalia causada por el ZIKV. Al igual que en el presente trabajo Rathore y colaboradores emplearon un modelo murino de embarazo en el que demostraron que el FcRn es sobre expresado en las placentas de hembras infectadas con ZIKV en conjunto con la inoculación de anticuerpos anti-Dengue, lo que favorece la transmisión vertical del ZIKV y como consecuencia la presencia de fetos con microcefalia. A pesar de esto, el FcRn no es el único mecanismo que usa ZIKV para invadir la placenta y acceder al feto; ya que en este mismo estudio se repitió el ensayo, pero con hembras *knock out* para FcRn y pese a que la expresión del FcRn estaba bloqueada hubo casos donde el virus del Zika logro infectar a los fetos, causándoles microcefalia, afectando 50% menos a los fetos en comparación con el ensayo anterior (Rathore *et al*, 2019).

Por otra parte, el FcRn no es exclusivo de la placenta, también se expresa en células del epitelio intestinal en donde su función es similar, captar IgG materna y por medio de transcitososis proporcionar inmunidad humoral al neonato, ya que la IgG es ingerida por el consumo de leche materna durante las primeras semanas de vida. Esto sucede con mamíferos como los porcinos; Guo y colaboradores (2016) realizaron ensayos *in vitro* con células epiteliales intestinales de porcinos infectadas con virus de gastroenteritis transmisible (TGEV) para determinar cómo la infección de este patógeno modificaba la expresión del FcRn porcino (pFcRn). La infección por TGEV sobre expresa el pFcRn mediante la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B), el cual es una familia de factores de transcripción que median e inducen la expresión de varios genes involucrados en la respuesta inmunológica innata y adaptativa, inflamación y enfermedades autoinmunes (Guo *et al*, 2016) (Gómez-Chávez *et al*, 2021). El TGEV no es el único virus que se ha visto favorecido por el FcRn para facilitar el acceso al tejido a invadir, en otro estudio realizado por Gupta y colaboradores (2013) se demostró como el FcRn puede favorecer el paso del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I) a través de las células del cérvix y uretra masculina, usando como modelo células humanas de adenocarcinoma endometrial HEC-1A. En este caso en concreto el FcRn no modificaba su expresión para así permitir el paso del virus mediante la unión de IgG neutralizante al mismo, sino que las condiciones del ambiente celular permitían la transcitososis endotelial en las células de los tejidos mencionados. Resulta que a pH de 6 el FcRn favorece el paso del VIH-I unido a anticuerpos neutralizantes específicos (Gupta *et al*, 2013).

En el caso de la toxoplasmosis congénita es de resaltar el paralelismo que guarda la tasa de transmisión vertical con la expresión del FcRn, ya que la probabilidad de transmisión al feto aumenta para el final de la gestación y la expresión del FcRn comienza a finales del primer trimestre y llega a la cúspide de su expresión para el tercer trimestre (Dunn *et al*, 1999). En el presente trabajo se encontró que el FcRn se sobre expresa dependiendo de la carga parasitaria infectada: 10^4 y 10^5 taquizoitos (Figura 8) de forma similar a la inducida por otros patógenos, apoyando la idea de que

el FcRn presente en el sincitiotrofoblasto de la placenta capta la IgG unida al taquizoito y permite que pase a través de la placenta hasta llegar al feto y así infectarlo. Sin embargo, no se considera el único mecanismo de invasión a la placenta ya que, aunque es poco probable *T. gondii* puede infectar al feto en el primer trimestre de gestación, donde el FcRn no se expresa aun en la placenta, considérese que en humanos la placenta se establece en el útero la tercera semana de gestación y sufre modificaciones hasta el cuarto mes (Santoja, 2009).

Además de la expresión del FcRn, se evaluó la expresión de citocinas que se asociaran a un ambiente regulado o modulado (IL-10 y TGF- β) e inflamatorio (IL-6), ya que se ha reportado que un ambiente proinflamatorio modulado reduce la probabilidad de que haya una transmisión vertical de la madre al feto (Gómez-Chávez *et al*, 2019). La IL-10 es una citocina antiinflamatoria producida por diferentes células y es un supresor de macrófagos e inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12 e IL-1 β disminuyendo la actividad del NF- κ B (Honigmann, 2018). Desafortunadamente, no se encontró expresión de IL-10 en la placenta en ninguno de los tres grupos, y aunque esta citocina se relacione con la regulación de la respuesta inmunológica proinflamatoria, no se tiene mucha información sobre su expresión en la interfase materno-fetal durante la infección congénita de *T. gondii*. El TGF- β es una citocina reguladora, ya que inhibe la expresión del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF- α) el cual es una citocina proinflamatoria y una de las primeras que se elevan en una respuesta inmunológica Th1 (Bermúdez, 1993). A partir de la infección con 10^5 taquizoitos se observó un aumento en la expresión de TGF- β esta citocina es mencionada como una de las claves para moderar la respuesta proinflamatoria y disminuir la transmisión vertical de la madre al feto o limitar el desarrollo de lesiones severas en el feto, causadas por la infección congénita (Gómez-Chávez *et al*, 2020).

La IL-6 es una citocina proinflamatoria que se expresa en periodos de estrés; favorece la producción de proteínas de fase aguda (Honigmann, 2018). Al igual que TGF- β , la IL-6 aumenta su expresión solo en la infección con 10^5 taquizoitos, generando así un

ambiente proinflamatorio debido a la reciente infección; hay que mencionar que la eutanasia de las hembras para el procesamiento de la placenta se realizó un día después de la infección, por lo que aún se encuentra en fase aguda la infección.

La detección del gen *B1* de *T. gondii* sirve para confirmar la presencia del parásito en diferentes tejidos (Kompalic-Cristo *et al*, 2007) como la placenta; sin embargo, no es sorprendente tener pocas placentas de diferentes hembras positivas a *T. gondii*, ya que la cantidad de DNA que es propio de la placenta contra el DNA de unos cuantos taquizoitos es mucho mayor, limitando la detección de la presencia del parásito, aunado a que las cepas tipo II de *T. gondii* se replican cada 7 horas (Radke, 2001). Sin embargo, debido a los cambios físicos y subjetivos que presentaron las hembras antes de la eutanasia: poca movilidad, pelaje erizado y sin brillo, aunado al aumento de la expresión de los genes del FcRn, la IL-6 y el TGF- β , se puede confirmar la infección de las hembras. Ahora bien, otro posible motivo por el cual no se haya podido detectar la presencia de *T. gondii*, en las placentas puede estar asociado a la baja carga parasitaria con la que infectamos o a la respuesta inmunológica materna en la que se induce la inflamación regulada por TGF- β , limitando el acceso del parásito a la placenta e impidiendo así la infección del feto.

Perspectivas

CONCLUSIONES

La infección con taquizoitos de *T. gondii* tipo II ME49 induce la expresión del FcRn dependiendo de la carga parasitaria en el tercer tercio de gestación en ratones, generando una respuesta proinflamatoria modulada, debido a al aumento de expresión en las citocinas TGF- β e IL-6. Sin embargo no se logró detectar la presencia del parásito en la interfase materno-fetal.

ANEXO

1. Tinción de Azul de Alcian modificada

Se Mezcla en proporción 1:1:10 azul de alcian al 0.1% en ácido acético al 3%, solución comercial de Giemsa y buffer de fosfatos 0.1M.

- a. 0.1%(m/v) Azul de Alcian 8 GX
- b. Ácido acético al 3%
- c. Buffer de fosfatos 0.1

2. Formalina amortiguada

3. TBE 10X 1L

- a. 121.1 g Base TRIS 1M
- b. 61.8 g Ácido bórico 1M
- c. 7.4 g EDTA (sal disódica) 0.02M

Para preparar el TBE 1X 500 mL, se tomaron 50 mL de TBE 10X y se diluye en 450 mL de agua desionizada.

4. Gel de agarosa al 1.5%

- a. Relacion peso/volumen (g/mL)
- b. 1.5 g de agarosa en 100 mL TBE 1X
- c. Ajustar la cantidad de agarosa, en función del volumen a usar

BIBLIOGRAFÍA

Amersfoort, J., Eelen, G., Carmeliet, P.(2022). Immunomodulation by endothelial cells – partnering up with the immune system?. **Nature**, **22**, 576-588. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00694-4>

Arce, G. (2019). *Fenotipo de la respuesta inmune en menores de un año con infección congénita por Toxoplasma gondii* [Tesis de especialidad, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

Cañedo-Solares, I., Galván-Ramírez, M., Luna-Pastén, H., Rodríguez-Pérez L., Ortiz-Alegria, B., Rico-Torres, C., Vela-Amieva, M., Pérez-Andrade, M., Figueroa-Damián, R. y Correa D. (2008). Congenital toxoplasmosis specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. **The pediatric infectious disease journal**, **27** (5), 469-474. DOI: 10.1097/INF.0b013e31816591df

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, **162**, 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)

Cora, M., Kooistra, I. y Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. **Toxicologic pathology**, **43** (6), 776-793. DOI: 10.1177/0192623315570339

Correa, D., Caballero-Ortega, H., Rico-Torres, I., Ortiz-Alegría, B., Becerra-Torres, E., Olmedo-Hernandez, M., Medina-Escutia, M., Murrieta, S., Hernández-Islas, J. (2007) Immunobiology of congenital toxoplasmosis. En L. Terrazas (Ed) **Advances in the immunobiology of parasitic diseases** (1ª ed ,199-224) Research Signpost. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083223541>

Correa, D., Rico-Torres, C., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, B., Caballero-Ortega, H., Figueroa-Damián, R. y López-Candiani, C. (2011) Paradoja inmunológica en la

toxoplasmosis congénita. **Biomédica**, **31** (sup 3.1) 189-191. [\[PDF\] revistabiomedica.org](http://revistabiomedica.org)

Cruz, M., Hernandez, A. y Contreras, A. (2019). El nexo entre biología, respuesta inmune y clínica en la infección por *Toxoplasma gondii*. **Revista cubana de investigaciones biomédicas**, **38** (4). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403002019000400014&lng=es&tlng=es.

Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., y Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet**, **353** (9167), 1829–1833. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)

Furukawa , S., Kuroda, Y. y Sugiyama, A. (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. **Journal of toxicologic pathology**, **27** (1), 11–18. DOI: 10.1293/tox.2013-0060.

Gavrilescu, L., y Denkers, E. (2001). IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of immunology**, **167** (2), 902–909. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.902>

Giraldo, M. (2008) Toxoplasmosis, **Medicina & Laboratorio**, **14** (5), 359-375.

Giraldo, M. (2008) Toxoplasmosis: un problema cada vez mayor, **Medicina & Laboratorio**, **14** (7-8), 309-310.

Gómez-Chávez, F., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L., Flores-García, Y., Luna-Pastén, H., Figueroa-Damián, R., Mora-González, J. y Correa, D. (2019). Maternal Immune Response During Pregnancy and Vertical Transmission in Human Toxoplasmosis . **Frontiers in immunology**, **10** (285), 1-7. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00285

Gómez-Chávez, F., Cañedo-Solares, I., Ortiz-Alegría, L., Flores-García, Y., Figueroa-Damián, R., Luna-Pastén, H., Gómez-Toscano, V., López-Candiani, C., Arce-Estrada, G., Bonilla-Rios, C., Mora-González, J., García-Ruiz, R. y Correa, D. (2020). A Proinflammatory Immune Response Might Determine *Toxoplasma gondii* Vertical Transmission and Severity of Clinical Features in Congenitally Infected Newborns. **Frontiers in immunology**, **11** (390). DOI: 10.3389/fimmu.2020.00390

Gómez-Chávez, F., Correa, D. Navarrete-Meneses, P., Cancino-Díaz, J. Cancino-Díaz, M. y Rodríguez-Martínez, S. (2021) NF-κB and Its Regulators During Pregnancy. **Frontiers in immunology**, **12** (679106). DOI: 10.3389/fimmu.2021.679106

Guo, J., Li, F., Qian, S., Bi, D., He, Q., Jin, H., Luo, R., Li, S., Meng, X. y Li, Z. (2016). TGEV infection up-regulates FcRn expression via activation of NF-κB Signaling. **Scientific Reports**, **6** (32154). DOI: 10.1038/srep32154

Gupta, S., Gach, J., Becerra, J., Phan, T., Pudney, J., Moldoveanu, Z., Joseph, S., Landucci, G., Supnet, M., Ping, L. Corti, D., Moldt, B., Hel, Z., Lanzavecchia, A., Ruprecht, R., Burton, D., Mestecky, J., Anderson, D. y Forthal, D. (2013). The Neonatal Fc Receptor (FcRn) Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Transcytosis across Epithelial Cells. **PLoS Pathog**, **9** (11): e1003776. DOI:10.1371/journal.ppat.1003776

Honigmann, E. (2018). Fundamentos de inmunología básica y su correlación clínica. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suárez-Mutis, M., Fernandes, O. y Britto, C. (2007) Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. **Parasitol Res**, **101**, 619-625 DOI 10.1007/s00436-007-0524-9

Molina, J., López, R. y Trinidad, S. (2019) **Microbiología y parasitología médicas de Tay** (5ª ed.). Méndez editores.

Pfaffl, M. (2006) Relative quantification. En Dorak, T. (Ed), **Real-time PCR**. (63-82). Taylor & Francis Group. <http://gmo-qpcr-analysis.com/dorak-book-real-time-pcr-2006.pdf#page=90>

Rathore, A., Saron, W., Lim, T., Jahan, N. y St. John, A. (2019) Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus–induced microcephaly in fetuses. *Science Advances*, 5 (2), DOI: 10.1126/sciadv.aav3208

Rio, D., Ares, M., Hannon, G. y Nilse, T. (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). **Protocolos de Cold Spring Harbor, 2010**(6). DOI:10.1101/pdb.prot5439

Romero, R. (2018). *Microbiología y parasitología humana : bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Ciudad de México: Médica Panamericana. <http://www.medicapanamericana.com.pbidi.unam.mx:8080/VisorEbookV2/Ebook/9786078546145>

Roopenian, D. y Akilesh, S. (2007). FcRn: el receptor Fc neonatal alcanza la mayoría de edad. **Nat Rev Immunol** 7 , 715–725 <https://doi.org/10.1038/nri2155>

Saji, F., Samejima, Y., Kamiura, S., y Koyama, M. (1999). Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. **Reviews of reproduction**, 4 (2), 81–89. <https://doi.org/10.1530/ror.0.004008>

Santoja, J. (2009). Placentación: Curso de doctorado. <https://www.uv.es/jose.j.santonja/Obstetricia%20General/Placentacion.pdf>

Sugiyama, M., Yasunaga, A., Kobayashi, R., Fukasawa, H., Hashimoto, O., Kurusu, S., Sasada, H. y Yoshioka, K. (2021) Improvement in identification of pro-estrous mice by using a novel method of detecting vaginal mucous cells. **Cell Tissue Res** 383, 1183–1190. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03310-w>

Vela-Amieva, M., Cañedo-Solares, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Pérez-Andrade, M., González-Contreras, C., Ortiz-Cortés, J., Ortega-Velázquez, V., Galván-Ramírez, M.,

Riuz-García, M., Saltigeral-Simentel, P., Ordaz-Favila, J., Sánchez, C. y Correa, D. (2005) Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 72(2), 142–144. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15741549/>