



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“CAMBIOS EN LA DISTRIBUCIÓN DEL CITOESQUELETO Y ORGANELOS  
DE LA CÉLULA HOSPEDERA DURANTE LA CISTOGÉNESIS DE  
*Toxoplasma gondii*”**

TESIS Que  
presenta

**M en C. KITZIA NOHEMÍ CASTRO ELIZALDE**

Para obtener el grado de  
**DOCTORA EN CIENCIAS**  
**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA**

Director de Tesis: Dr. Ricardo Mondragón Flores

**Ciudad de México**

**Febrero 2018**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio No. 16: Bioquímica Celular de Patógenos Intracelulares, en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unidad Zacatenco, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto #155459 y por el Estímulo a la Investigación Médica 2017 otorgado por la Fundación Miguel Alemán A.C. al Dr. Ricardo Mondragón Flores.

## AGRADECIMIENTOS:

Al **Dr. Ricardo Mondragón Flores**, por brindarme la confianza de desarrollar mi tesis de doctorado bajo su dirección y en su laboratorio, por su asesoría, apoyo, consejos y sabia dirección que contribuyó a formarme no sólo en lo profesional sino también en lo personal.

De igual manera agradezco a mis sinodales:

**Dr. José Manuel Hernández Hernández**

**Dr. Javier Ambrosio Hernández**

**Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega**

**Dr. José Víctor Calderón Salinas**

**Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes**

Por sus comentarios y puntos de vista que sin duda enriquecieron el contenido y enfoque de ésta tesis

Agradezco al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca crédito otorgada de Septiembre del 2013 a Agosto del 2017 para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en la especialidad de Bioquímica, con número de registro 261878.

Agradezco a la **QFB Mónica Mondragón Castelán** auxiliar de investigación del laboratorio 16 del departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN por la asistencia técnica proporcionada.

Agradezco al **Ing. José Claudio Jiménez Vargas** por la asistencia en la preparación del material utilizado.

Agradezco a la **QFB Sirenia González Pozos** de la Unidad de Microscopía Electrónica por la asistencia técnica proporcionada durante el análisis de microscopia electrónica.

Agradezco a **Lic. Priscila González Ceja** secretaria de la coordinación académica departamental por su apoyo en los trámites académicos.

Agradezco a **la unidad de producción experimental de animales de laboratorio (UPEAL)** del CINVESTAV Zacatenco por el apoyo proporcionado mediante el suministro de los animales de laboratorio utilizados en el presente trabajo de tesis.

Este trabajo lo dedico a:

A mis papas **Everardo Castro Angulo** y **María Elizalde Meza** y mi hermano **Everardo**, por todo su amor, apoyo, consejos, sacrificios y desvelos. Siempre estaré orgullosa de ustedes y son mi ejemplo a seguir.

A mi esposo **Abraham García Gil**, por todo su amor, paciencia, cariño y apoyo en todo momento.

A todos mis amigos, porque siempre, de alguna manera estaban ahí presentes para hacer a un lado la presión pasando momentos agradables.

## Resumen

El ciclo de vida de *T. gondii* presenta varias formas infecciosas, el **esporozoíto** presente en el ooquiste maduro excretado por las heces del hospedero definitivo, el **taquizoíto** que es la forma de rápida replicación y diseminación y el **bradizoíto** que es la forma de lenta proliferación, alojada en los quistes tisulares, manteniéndose así protegido de la acción de la respuesta inmune, así como del efecto de fármacos con actividad toxoplásmica.

En la infección por *T. gondii*, la primera barrera natural que atraviesa el parásito es el epitelio intestinal y para su diseminación, el endotelio vascular. Estudios previos demostraron que en el proceso de invasión, el parásito modula las uniones intercelulares y el citoesqueleto de la célula hospedera muy probablemente para favorecer su distribución sistémica, y una vez dentro de la célula y alojado en una vacuola parasitofora, se rodea de componentes del citoesqueleto como filamentos intermedios y de orgánulos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico.

Se ha propuesto que el proceso de enquistamiento tisular (cistogénesis) se inicia por la activación de la respuesta inmune contra el parásito. En la formación del quiste tisular se desconocen los inductores naturales específicos de la diferenciación a quiste así como los cambios que ocurren en la célula hospedera a nivel de uniones intercelulares, citoesqueleto y distribución de orgánulos citoplásmicos. La razón de ellos es que se carece de estrategias de inducción reproducible de la cistogénesis que permita el análisis secuencial del proceso. La diferenciación a bradizoítos y formación del quiste tisular se ha podido inducir *in vitro*, mediante el mantenimiento de la célula infectada bajo condiciones de estrés como pH alcalino, estrés nutricional o por exposición a citocinas como el IFN- $\gamma$ . Estas condiciones de inducción *in vitro* requieren tiempos de exposición muy prolongadas hasta de varias semanas y producen resultados de baja frecuencia, además de inducir daños severos en la célula hospedera. En el presente proyecto se indujo la cistogénesis *in vitro* en parásitos intracelulares desde las 12 h de proliferación mediante el tratamiento de taquizoítos extracelulares con ácido micofenólico. Utilizando esta estrategia experimental, se caracterizó el proceso de formación de un quiste tisular *in vitro* y se caracterizaron los cambios en la organización de orgánulos y del citoesqueleto de la célula hospedera. Nuestros resultados demostraron que el ácido micofenólico indujo la transformación de la vacuola parasitofora en una estructura quística en cuyo interior se alojan los parásitos y que tiene características estructurales similares a los quistes cerebrales del modelo de encefalitis murino. La pared quística formada a partir de la membrana de la vacuola parasitofora contiene a la glicoproteína CST1. A partir de geles bidimensionales y su respectivo Western blot se determinó el cambio en la expresión de proteínas como lo es SAG1 específica de taquizoítos y BAG1 específica de bradizoítos para corroborar el proceso de diferenciación de estadios. Adicionalmente, se detectó la pérdida de la red vesículo tubular, un cambio en la organización intravacuolar de los parásitos y la presencia de gránulos de amilopectina en el citoplasma de los mismos. Además se analizaron cambios en la expresión de proteínas en los dos estadios. Mediante ensayos de microscopia electrónica de transmisión y microscopia confocal se determinó que durante el enquistamiento del parásito, se modifica la organización del citoesqueleto de microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios de vimentina así como la organización de los orgánulos del hospedero como lo son las mitocondrias y el núcleo para favorecer la formación de la nueva estructura quística. Por otra parte también se determinó que la membrana de la vacuola sufre modificaciones con pérdida de las prolongaciones que se extienden hasta el núcleo.

## Abstract

The life cycle of *T. gondii* presents several infectious forms: the sporozoite present in the mature oocyst excreted by the feces of the definitive host, the tachyzoite which is the form of rapid replication and dissemination and the bradyzoite, which is the slow proliferation form, lodged in tissue cysts, thus lying protected from the action of the immune response as well as from the effect of drugs with toxoplasmic activity.

During *T. gondii* infection, the first natural barrier that crosses is the intestinal epithelium and for its dissemination, the vascular endothelium. Previous studies have shown that the parasite invasion modulates the host intercellular junctions and cytoskeleton to favor its systemic distribution. Once inside the host, the parasitofora vacuole is surrounded by cytoskeleton components as intermediate filaments and organelles such as the mitochondria and the endoplasmic reticulum.

The encystment process is initiated by the action of the immune response against the parasite. In tissue cyst formation, the specific natural inducers of cyst differentiation are unknown, as well as changes occurring in the host cell at the level of intercellular junctions, cytoskeleton and distribution of cytoplasmic organelles, largely due to the lack of induction protocols of cystogenesis that in a controlled and reproducible way would allow the sequential analysis of the process. The differentiation to bradyzoites and formation of the tissue cyst may be induced *in vitro* by maintaining the infected cell under stress conditions such as alkaline pH, nutritional stress or by exposure to cytokines such as IFN- $\gamma$ . These *in vitro* induction conditions require very long exposure times of up to several weeks and produce low frequency results in addition to inducing severe damage to the host cell. In our laboratory was possible to induce *in vitro* cystogenesis of tachyzoites since 12 hours of exposure with mycophenolic acid.

Using this experimental strategy in the present work, were characterized the process of formation of the pre-cystic structure as well as changes in the organization of organelles and cytoskeleton of the host cell. Our results demonstrated that the action of this drug induces the formation of a cystic structure with characteristics similar to the cysts of the murine model such as the presence of a cystic wall, loss of tubular vesicle network, change in organization of the parasites and the presence of amylopectin granules in the cytoplasm of the same, we also analyzed the change in the differential expression of proteins in the two stages. The change in protein expression was determined from two-dimensional gels and their respective Western blots, such as SAG1 specific for tachyzoites and BAG1 specific for bradyzoites to corroborate the process of differentiation of stages. By transmission electron microscopy and confocal microscopy, it was determined that during the parasite enquistation, this modifies the cytoskeletal dynamics of microtubules, actin filaments and intermediate filaments of vimentin as well as the organization of the host organelles such as Mitochondria and the nucleus to favor the formation of the new cystic structure. On the other hand also the changes that occurred in the membrane of the vacuole during the process of differentiation were studied, finding that it loses the extensions that extend to the nucleus of the host with respect to the time of proliferation after inducing the process of encystment.

## ÍNDICE

	Página
<b>I.- Introducción</b>	17
1.1 Ciclo de vida	17
1.2 Genotipos de <i>Toxoplasma</i>	21
1.3 Formas parasitarias de <i>Toxoplasma</i>	21
1.3.1 Taquizoíto	22
1.3.2 Bradizoíto	23
1.3.3 Proteínas estructurales y de superficie	24
1.3.4 Esporozoíto	25
1.3.5 Quiste tisular	26
1.4 Enquistamiento <i>in vivo</i>	28
1.5 Enquistamiento <i>in vitro</i>	30
1.6 Inducción del proceso de cistogénesis con AMF	33
1.7 Mecanismo de acción del AMF	34
1.8 Asociación entre organelos del hospedero y la VP	38
<b>II.- Justificación</b>	42
<b>III.- Hipótesis</b>	43
<b>IV.- Objetivo general</b>	43
4.1 Objetivos particulares	43
<b>V.- Estrategia experimental</b>	44
<b>VI.- Metodología</b>	45
6.1 Cultivo celular	45
6.2 Obtención y mantenimiento de la cepa RH de <i>T. gondii</i>	45
6.3 Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	45
6.3.1 Cepa RH	45
6.3.2 Cepa ME49	46
6.3.3 Cepa Prugniaud (PRU)	46
6.4 Infección de células con taquizoítos de <i>Toxoplasma</i>	46
6.5 Ácido micofenólico (AMF)	47
6.6 Método de inducción de la cistogénesis	47
6.7 Detección de CST1 de pared quística	47
6.8 Marcaje fluorescente de actina filamentosa, microtúbulos y filamentos de vimentina	48
6.9 Despolimerización de citoesqueleto	49
6.10 Marcaje fluorescente de membrana	49
6.11 Inmunofluorescencia de lámina $\beta$	49
6.12 Inmunofluorescencia de emerina	50
6.13 Marcaje fluorescente de mitocondrias	50
6.14 Inmunofluorescencia de GRA3	51
6.15 Inmunofluorescencia de GAP45	51
6.16 Purificación de quistes cerebrales de la cepa ME49 a partir de ratones infectados	52
6.17 Microscopia electrónica de transmisión (MET) de quistes tisulares de cepa ME49	52
6.18 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	53
6.19 Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de	53

diferenciación	
<b>VII.- Resultados</b>	56
7.1 La exposición de taquizoítos de la cepa RH al ácido micofenólico indujo la conversión de taquizoítos a bradizoítos	56
7.2 Cambios en la distribución de los parásitos durante el proceso de diferenciación	59
7.3 Expresión diferencial de moléculas durante la diferenciación inducida con AMF	61
7.4 Modificaciones morfológicas en la célula hospedera y en la VP durante el proceso de diferenciación del parásito inducido por AMF	62
7.5 Análisis de la expresión diferencial de proteínas durante el proceso de enquistamiento del parásito	70
7.6 Modificación de la membrana de la VP durante la proliferación de taquizoítos y el proceso de diferenciación del parásito	77
7.6.1 Cambios durante la proliferación del taquizoíto	77
7.6.2 Cambios durante la diferenciación del taquizoíto	78
7.7 Modificaciones de la membrana de la célula hospedero durante la proliferación y diferenciación de <i>Toxoplasma</i>	79
7.7.1 Durante la proliferación de taquizoítos	79
7.7.2 Durante la conversión taquizoíto a bradizoíto y formación de quiste tisular	81
7.8 Modificaciones del núcleo de la célula hospedero durante la proliferación del taquizoíto y el proceso de enquistamiento	85
7.8.1 Modificaciones en emerina	85
7.8.2 Análisis de las modificaciones de lamina $\beta$	91
7.9 Cambios en la distribución de las mitocondrias de la célula hospedero durante la proliferación de taquizoítos y el proceso de enquistamiento	101
7.10 Cambios en la distribución de filamentos de actina durante la proliferación intracelular y diferenciación de taquizoítos RH de <i>T. gondii</i> en células HEp-2	108
7.11 Efecto de la despolimerización de los filamentos de actina en el proceso de cistogénesis	115
7.12 Cambios en la distribución de los filamentos intermedios en la proliferación de taquizoítos y su proceso de diferenciación	117
7.13 Efecto de la despolimerización de los filamentos intermedios de vimentina durante el enquistamiento de <i>T. gondii</i>	123
7.14 Cambios en los microtúbulos durante la proliferación de taquizoítos y el enquistamiento de la cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	126
7.15 Efecto de la despolimerización de los microtúbulos durante el enquistamiento de <i>T. gondii</i>	129
7.16 Análisis de la estructura de quistes tisulares de la cepa ME49	131
<b>VIII.-Discusión</b>	133
<b>IX.- Conclusión</b>	141
<b>X.- Perspectivas</b>	142
<b>XI.- Bibliografía</b>	143
<b>XII.- Apéndice</b>	151
12.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	151

12.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida	151
12.3 Tinción con nitrato de plata	151
12.4 Tinción con azul de coomassie	152
12.5 Análisis estadístico	152
<b>XIII.- Anexo (Artículo)</b>	<b>152</b>

## Abreviaturas

Actina F	Actina filamentosa
Actina G	Actina globular
AMF	Ácido micofenólico
BAG1	Antígeno de bradizoíto 1
BSA	seroalbúmina de bovino
DMEM	Medio Dulbeco modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
CD	Citocalasina D
CF	Contraste de fases
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CK	Citoesqueleto
IF	Inmunofluorescencia
INF-γ	Interferón gamma
IMP	Inosina monofosfato
IMPDH	Inosina monofosfato deshidrogenasa
MEM	Medio mínimo esencial
MET	Microscopia electrónica de transmisión
OsO <sub>4</sub>	Tetraóxido de osmio
PAF	Paraformaldehído
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PBST	Solución salina en amortiguador de fosfatos y con Tween-20 al 1%
PRU	Cepa <i>Prugniaud</i> de <i>Toxoplasma</i>
SAG1	Antígeno de superficie 1
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFB	Suero fetal bovino
TBST	Solución buffer de tris con Tween-20
TgIMPDH	Inosina monofosfato deshidrogenasa de <i>Toxoplasma</i>
VP	Vacuola parasitófora
2D-PAGE	Electroforesis en gel de poliarilamida SDS de doble dimensión

## Índice de Figuras

		Página
Figura 1	Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Figura 2	Morfología de un taquizoíto y un bradizoíto	24
Figura 3	Morfología de un quiste tisular de la cepa ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i>	27
Figura 4	Papel de células Th1 y Th2 en la respuesta inmune	29
Figura 5	Factores asociados con la interconversión de taquizoíto a bradizoíto	33
Figura 6	Estructura química del ácido micofenólico	34
Figura 7	Estructura tetramérica de la IMPDH de tipo II de humano	35
Figura 8	Ruta biosintética de salvamento de purinas en <i>T. gondii</i>	36
Figura 9	Co-expresión de CST1 y BAG1 en células HEp-2 invadidas con RH tratadas con AMF en una concentración de 50 µg/ml a las 6, 12, 24, 36 y 48 h post-tratamiento	37
Figura 10	Cambios en el CK de la célula hospedera (MDCK) por efecto de la invasión de taquizoítos de la cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	41
Figura 11	Expresión de CST1 inducida por exposición de taquizoítos extracelulares al ácido micofenólico 50 µg/ml y posterior proliferación en células HEp-2 por 48 h	57
Figura 12	Porcentaje de VP positivas a CST1 a diferentes tiempos de proliferación y concentración de AMF	59
Figura 13	Distribución de los taquizoítos durante su proliferación y diferenciación en células HEp-2 marcando la proteína GAP45	61
Figura 14	Detección de SAG1, BAG1 y CST1 durante el proceso de diferenciación del parásito	62
Figura 15	Ultra estructura de células durante la proliferación del taquizoíto y el proceso de diferenciación del parásito inducido por el AMF	65
Figura 16	Morfología de estructuras tipo quísticas a los 5, 7 y 10 días de proliferación después de haber invadido las células con taquizoítos pre-tratados con AMF	67
Figura 17	Morfología de un pre-quiste obtenido mediante el tratamiento de taquizoítos extracelulares con AMF	68
Figura 18	Morfología de un quiste de 10 días de maduración, obtenido después del tratamiento de los taquizoítos extracelulares con AMF	69
Figura 19	Análisis de la expresión de proteínas de extractos total de taquizoítos de la cepa RH de <i>Toxoplasma</i>	73

Figura 20	Análisis de la expresión diferencial de proteínas de extractos total de estructuras pre-quísticas inducidas con el tratamiento de AMF	74
Figura 21	Modificaciones en la membrana de la VP durante la proliferación de los taquizoítos y el proceso de diferenciación en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	78
Figura 22	Tinción de la membrana de la célula HEp-2	79
Figura 23	Modificaciones en la membrana de la célula hospedera HEp-2 durante la proliferación del taquizoíto	81
Figura 24	Distribución de la membrana de la célula hospedera durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	83
Figura 25	Distribución de la membrana de la célula hospedera a los 5 días del proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	84
Figura 26	Distribución de la membrana de la célula hospedera a los 5 días del proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	85
Figura 27	Análisis del núcleo de la célula HEp-2 marcando emerina	86
Figura 28	Análisis de las modificaciones del núcleo marcando emerina durante la proliferación de los taquizoítos en células HEp-2	87
Figura 29	Análisis de las modificaciones del núcleo marcando emerina durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos en células HEp-2	89
Figura 30	Determinación cualitativa de la expresión de emerina durante el proceso de cigotogénesis de <i>Toxoplasma gondii</i>	90
Figura 31	Análisis de las modificaciones del núcleo marcando emerina a los 5, 7 y 10 días del proceso de diferenciación de taquizoítos en células HEp-2	91
Figura 32	Análisis del núcleo de la célula HEp-2 marcando lamina $\beta$	92
Figura 33	Análisis de las modificaciones del núcleo marcando lamina $\beta$ durante la proliferación de los taquizoítos en células HEp-2	93
Figura 34	Análisis de las modificaciones del núcleo marcando lamina $\beta$ durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos en células HEp-2	95
Figura 35	Determinación cualitativa de la expresión de lamina $\beta$ durante el proceso de cigotogénesis de <i>Toxoplasma gondii</i>	96

Figura 36	Análisis de las modificaciones del núcleo durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos en células HEp-2 a los 5, 7 y 10 días marcando lamina $\beta$	97
Figura 37	Análisis de la relación entre el núcleo del hospedero y la estructura quística de 10 días de maduración	98
Figura 38	Proyección en 3D de la relación entre el núcleo del hospedero y la estructura quística de 10 días de maduración	99
Figura 39	Cortes semi-finos de tejido de cerebro infectado con quistes de la cepa ME49	100
Figura 40	Ultra-estructura de quistes inducidos <i>in vitro</i> con AMF	101
Figura 41	Distribución de las mitocondrias en la célula HEp-2	101
Figura 42	Distribución de las mitocondrias durante la proliferación de los taquizoítos en células HEp-2	103
Figura 43	Distribución de las mitocondrias durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos en células HEp-2	105
Figura 44	Determinación cualitativa de la expresión de mitocondrias durante el proceso de cistogénesis de <i>Toxoplasma gondii</i>	106
Figura 45	Distribución de las mitocondrias durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	107
Figura 46	Distribución de los filamentos de actina en las células HEp-2 a 48 h de proliferación	108
Figura 47	Distribución de los filamentos de actina en las células HEp-2 por efecto de la proliferación de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	110
Figura 48	Distribución de los filamentos de actina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	112
Figura 49	Determinación cualitativa de la expresión de Actina F durante el proceso de cistogénesis de <i>Toxoplasma gondii</i>	113
Figura 50	Distribución de los filamentos de actina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 a los 5 días después del tratamiento con AMF	114
Figura 51	Distribución de los filamentos de actina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 a los 7 y 10 días después del tratamiento con AMF	115
Figura 52	Efecto de la despolimerización de los filamentos de actina en el proceso de cistogénesis	116
Figura 53	Distribución de FI de vimentina en células HEp-2	117
Figura 54	Distribución de los filamentos de vimentina durante la proliferación de los taquizoítos y el proceso de diferenciación en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	119

Figura 55	Disminución de la expresión de vimentina durante el proceso de cistogénesis de <i>Toxoplasma gondii</i>	120
Figura 56	Distribución de los filamentos de vimentina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	121
Figura 57	Efecto de la despolimerización de los filamentos de vimentina en el proceso de cistogénesis	123
Figura 58	Distribución de los microtúbulos en la célula HEp-2	124
Figura 59	Distribución de los microtúbulos durante la proliferación de los taquizoítos y el proceso de diferenciación en células HEp-2 después del tratamiento con AMF	125
Figura 60	Determinación cualitativa de la expresión de microtúbulos durante el proceso de cistogénesis de <i>Toxoplasma gondii</i>	126
Figura 61	Distribución de los microtúbulos durante el proceso de diferenciación a los 5, 7 y 10 días en células después del tratamiento con AMF	127
Figura 62	Efecto de la despolimerización de los microtúbulos en el proceso de cistogénesis	128
Figura 63	Efecto de la despolimerización del citoesqueleto en la expresión de CST1	130
Figura 64	Quistes cerebrales de la cepa ME49 observado por SEM	131
Figura 65	Organización interna de los bradizoítos	132

### Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Moléculas de bradizoítos y su distribución topográfica	31
Tabla 2	Proteínas que disminuyen su expresión después de haber inducido el enquistamiento con AMF	75
Tabla 3	Proteínas que incrementan su expresión después de haber inducido el enquistamiento con AMF	76

## I.- Introducción

*Toxoplasma gondii* es la única especie del género *Toxoplasma*, está ubicado en el *Phylum* Apicomplexa, clase *Sporozoa* y subclase *coccidia* (Francia & Striepen, 2014). Otros parásitos incluidos en el mismo orden incluyen *Isospora*, *Eimeria*, *Neosporum* y *Sarcocystis*. El nombre de la especie proviene de *Ctenodactilus gondii*, roedor del cual fue aislado por primera vez *T. gondii*, y el nombre del género se deriva de *toxon*, palabra griega que significa arco, y se refiere a la forma de media luna del taquizoíto extracelular cuando aparece *in vitro* (Ferguson, 2009).

### 1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* se desarrolla en dos tipos de hospederos, el hospedero definitivo que incluye a los felinos en donde se desarrolla el ciclo sexual de reproducción y los hospederos intermediarios que incluyen a todos los animales de sangre caliente (aves y mamíferos) en donde se desarrolla la replicación asexual del parásito (Figura 1), *Toxoplasma* es capaz de replicarse e infectar cualquier célula nucleada de animales homeotermos, (Katris et al., 2014). Hay dos forma infectivas y de transmisión de la toxoplasmosis, el **ooquiste** que aloja a esporozoitos infectivos, es liberado en las heces de los felinos infectados siendo el resultado de un proceso de reproducción sexual, y el **quiste tisular** presente en todos los hospederos infectados, corresponde a una estructura presente en todos los tejidos de los hospederos intermediarios aloja bradizoítos y es formado por un proceso de reproducción asexual (Dubey et al., 1998) El ciclo de vida inicia cuando un felino, como el gato doméstico, se infecta mediante la ingesta de una presa contaminada (ratón /rata, aves, etc) que tiene quistes tisulares. Durante el paso por el estómago y el intestino del gato, el quiste tisular se rompe mediante la acción de las enzimas digestivas, liberando a los bradizoítos, los cuales invaden a los enterocitos del intestino delgado del gato. Es en el intestino del gato donde se inicia un proceso de diferenciación celular en el cual el bradizoíto se transforma en 5 diferentes formas parasitarias sexuales morfológicamente distintas entre sí y que evolucionan hasta formar las estructuras conocidas como microgametos y macrogametos. Los microgametos son la forma parasitaria masculina de *Toxoplasma*, que se caracteriza por ser flagelada y altamente dinámica, se exterioriza de la célula invadida hacia el

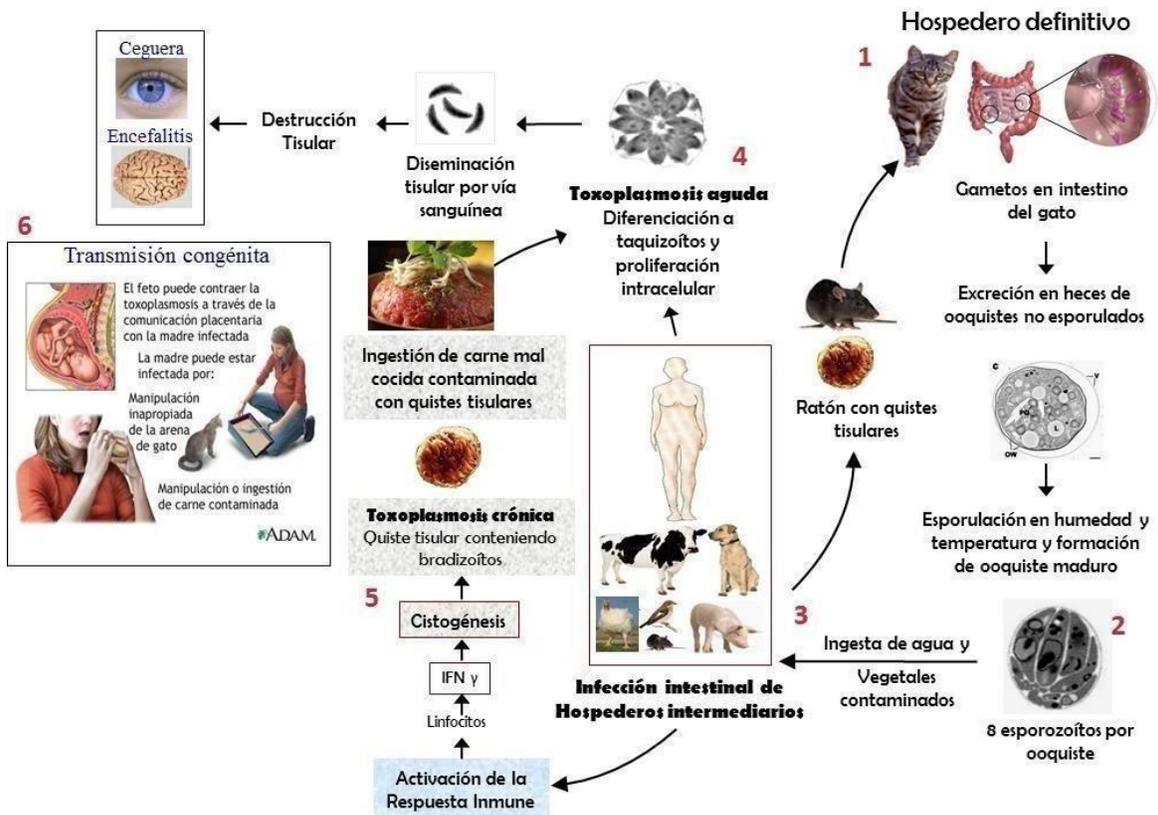
lumen intestinal, detecta al enterocito invadido que aloja en su interior a la forma femenina del parásito conocida como macrogametocito, penetra al enterocito y la fertilizan dando como resultado a un cigoto que posteriormente se transformará en un ooquiste inmaduro excretado en las heces. A la fecha se desconocen los mecanismos de diferenciación de estas 5 formas parasitarias, solo hay descripciones morfológicas de las mismas. Los ooquistes excretados son inmaduros, es decir que no alojan formas parasitarias desarrolladas y por lo tanto no son infectivos, éstos maduran en 2-3 días en el medio ambiente y en condiciones de temperatura y humedad adecuadas. La maduración o esporulación de los ooquistes genera 8 esporozoitos altamente infectivos en su interior, los ooquistes maduros infectivos pueden encontrarse en fuentes de agua, hortalizas y alimentos por lo que su ingesta en condiciones de poca higiene representa una importante forma de transmisión de la toxoplasmosis (Dubey & Frenkel, 1976; Hutchison, 1965; Mondragón, 2014).

Cuando los hospederos intermediarios consumen a los ooquistes maduros, los esporozoitos intraquísticos son liberados e invaden a los enterocitos intestinales alojándose dentro de una vacuola parasitófora (VP) que representa el nicho intracelular de proliferación y diferenciación celular del parásito. Dentro de la VP los esporozoitos rápidamente se transforman en taquizoítos, una forma altamente replicativa e infectiva, que prolifera mediante un proceso de división asexual conocido como endodiogenia en el cual dentro de un taquizoíto madre se desarrollan dos células hijas (Black & Boothroyd, 2000; Mondragón, 2014). Cada etapa de división se lleva a cabo en 3-4 h (Díaz, 2014). Cuando el interior de la VP se llena de taquizoítos, estos salen de la célula invadida destruyéndola y diseminándose por el torrente sanguíneo a todos los órganos del cuerpo. La exteriorización del parásito genera la destrucción celular y en consecuencia la sintomatología característica de la parasitosis (dolor de cabeza, fiebre, etc.).

Como resultado de la proliferación del parásito en el organismo, se liberan componentes del parásito que son detectados por el sistema inmunitario de defensa generando la activación de una respuesta inmune con la producción de anticuerpos (no protectores) así como la activación de células T con liberación de citocinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y TNF $\alpha$  entre otras. La presencia de IFN- $\gamma$  es detectada de alguna forma por los taquizoítos intracelulares activando su diferenciación a la

forma del bradizoíto y generando un quiste tisular (Castro, KN. 2014). Este quiste tisular es una estructura redondeada rígida, rica en carbohidratos que genera una cubierta tipo quitinosa y que es resistente a los embates por cualquiera de los mecanismos efectores de la respuesta inmune tanto celular como molecular así como al efecto de fármacos anti-parasitarios. Es dentro del quiste tisular que el parásito sobrevive en forma de bradizoíto en los diferentes tejidos por prácticamente toda la vida del hospedero.

Cuando un animal o individuo ingiere carne mal cocida contaminada con quistes tisulares, se lleva a cabo la infección con liberación de los bradizoítos a nivel intestinal. Estos invaden a las células del epitelio intestinal en forma similar a como lo hacen los esporozoitos provenientes de los ooquistes y se diferencian rápidamente dentro de la VP en taquizoítos. La diseminación de la parasitosis a todos los órganos la realizan los taquizoítos los cuales ya sea dentro de fagocitos o en forma libre pueden atravesar barreras fisiológicas como la hemato-encefálica, la placentaria y la ocular generando daños irreversibles y mortales que van desde la corioretinitis con pérdida de la visión, el aborto así como la encefalitis con muerte de la persona (Dubey et al., 1998; Mondragón, 2014).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.** (1) Los felinos y el gato doméstico son los hospederos definitivos en quienes se lleva a cabo el ciclo sexual dando como resultado un cigoto que es liberado al medioambiente en las heces. (2) En el medio ambiente se forman 8 esporozoítos infectivos que se pueden encontrar contaminando hortalizas, agua y alimentos. (3) Los hospederos intermediarios se infectan al ingerir a los oocistos maduros. (4) Los esporozoítos invaden el epitelio intestinal y se diferencian en taquizoítos. La invasión y proliferación descontrolada de los taquizoítos genera la Toxoplasmosis en su fase aguda en donde todos los órganos son susceptibles de ser invadidos. (5) Se genera una toxoplasmosis crónica cuando hay una activación del sistema inmune del hospedero con la activación de linfocitos y la secreción de INF  $\gamma$ , el cual induce el enquistamiento del parásito, esta forma de latencia caracterizada por el quiste tisular aloja a los bradizoítos y les proporciona protección a fármacos y al sistema inmune. (6) En mujeres embarazadas, los taquizoítos atraviesan la placenta e infectan al producto produciendo ceguera, malformaciones e incluso aborto. (Modificado de R. Mondragón, 2014).

## 1.2 Genotipos de *Toxoplasma*

El género *Toxoplasma* se ha clasificado en tres linajes clonales (tipo I, II y III), que han sido documentados en América del norte y Europa con base en el genoma, el tipo de hospedero al que invade, su grado de virulencia y su habilidad para formar quistes (Behnke et al., 2011). Los análisis indican que estos linajes clonales surgieron después de un solo cruce genético y su rápida expansión como resultado de la adquisición de la infectividad oral directa (Su et al., 2003). Se estima que este cruce genético ocurrió hace aproximadamente 10,000 años, coincidiendo con el establecimiento de la agricultura y la domesticación de animales como el gato (Fux et al., 2007). En el genotipo I se encuentra la cepa RH, la cual es considerada de virulencia elevada con una letalidad del 100% (LD<sub>100</sub>) al infectarse ratones con un solo parásito, adicionalmente presenta una elevada motilidad *in vitro* y una rápida diseminación *in vivo*, y por ello es considerada como una cepa no formadora de quiste. En el genotipo II se tienen como ejemplos a las cepas 76K y ME49 las cuales se caracterizan por tener una virulencia intermedia e inducen una fuerte respuesta pro-inflamatoria, finalmente en el genotipo III están las cepas NED y VEG por que causan el 50% de letalidad con aproximadamente 10<sup>6</sup> y por ello se consideran de baja virulencia, las líneas clonales difieren entre sí en solo 1-2 % a nivel nucleótido (Sibley et al., 2009). Las cepas tipo II y III son cepas formadoras de quiste (Behnke et al., 2011), en humanos la mayoría de las infecciones congénitas y en pacientes con SIDA, son ocasionadas por cepas del tipo II, que también son comunes en animales de granja (Howe & Sibley, 1995). En general las cepas II y III son más comunes en animales.

## 1.3 Formas parasitarias de *Toxoplasma*

*Toxoplasma* presenta 3 estadios infecciosos durante su ciclo de vida, el **taquizoíto**, de rápida replicación y alta movilidad e infectividad y se encuentra dentro de las VP's, el **bradizoíto**, de lenta movilidad y proliferación, localizado en los quistes tisulares y el **esporozoíto**, presente en el interior de ooquistes maduros.

### 1.3.1 Taquizoíto

Una de las formas más dinámicas e invasivas de *Toxoplasma* es el taquizoíto (Figura 2) que mide aproximadamente de 6 a 8 micras (Gómez Mondragón, 2014; Otify, 2012), y es capaz de invadir cualquier célula nucleada del organismo así como a eritrocitos aunque no prolifera en ellos. Tiene forma de media luna, presenta un núcleo, una única mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, una región apical que es característica del *Phylum* Apicomplexa y en la cual se encuentran dos de los tres organelos secretores, las roptrías y los micronemos, tiene un citoesqueleto apical especializado que incluye un anillo polar apical, el conoide, anillos pre-conoidales, un conjunto de 22 microtúbulos subpeliculares organizados desde el anillo polar así como una red submembranal de filamentos que envuelve a todo el parásito. Tanto los microtúbulos subpeliculares como la red submembranal de filamentos determinan la característica forma de media luna del parásito así como sus propiedades de motilidad (Patrón et al., 2005). El conoide es un organelo retráctil compuesto de unidades filamentosas que tienen un arreglo helicoidal en el sentido de las manecillas del reloj. El anillo polar apical es un centro organizador (MTOC) de 22 microtúbulos subpeliculares que se extienden hasta tres cuartas partes del cuerpo del parásito. Un tercer tipo de organelos secretores son los gránulos densos que están dispersos por todo el citoplasma del parásito. El contenido secretado desde los tres organelos secretores, micronemos, roptrías y gránulos densos, participa en los procesos de adhesión, motilidad e invasión a la célula hospedera así como para la formación de la VP y de una red vesículo-tubular intravacuolar que conforman el nicho intracelular del parásito. *Toxoplasma* tiene un apicoplasto, un organelo trimembranal resultante de una endosimbiosis primitiva con un alga verde (Dubey, 1994), que es un organelo esencial para el parásito, contiene la maquinaria enzimática para la biosíntesis de lípidos así como de purinas a través de la ruta de Shikimato que sintetiza bases púricas a partir del corismato (Ramakrishnan et al., 2012). Todo el parásito se encuentra rodeado por una estructura trimembranal conocida como películo. Está formado por la membrana plasmática que rodea a todo el parásito, así como por un conjunto de vesículas aplanadas y dispuestas en forma de mosaico que asemejan un complejo

bimembranal, este complejo es conocido como complejo membranal interno (CMI). El películo está involucrado en diversos eventos dinámicos como lo son la secreción, motilidad y evasión de la respuesta inmune. Los componentes de la membrana son liberados a través de un proceso denominado capping, en el cual algunos componentes pueden ser desplazados desde el extremo apical hacia el extremo posterior del parásito en donde dichos elementos son liberados, además el películo posee proteínas relacionadas al citoesqueleto como lo es la actina, lo cual apoya la idea de que es una estructura implicada en algún evento dinámico como lo es la motilidad (Nichols & Chiappino, 1987).

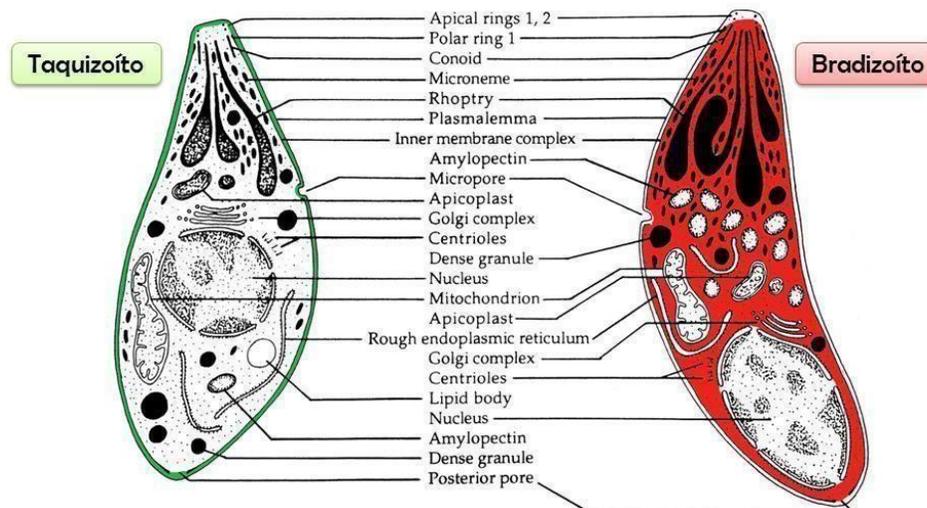
### **1.3.2 Bradizoíto**

El bradizoíto es la forma de lenta reproducción del parásito, posee una forma de media luna y pueden llegar a medir hasta 7  $\mu\text{m}$  (Figura 2), (Dubey et al., 1998). Los bradizoítos se encuentran dentro de los quistes tisulares los cuales están distribuidos en una amplia variedad de tejidos, pero son más comunes en tejidos musculares y neuronales como el cerebro, corazón, músculo esquelético y la retina (Ferguson & Hutchison, 1987; Gómez de León C.T. & Mondragón, 2014).

Estructuralmente los bradizoítos difieren de los taquizoítos, ya que en ellos el núcleo se encuentra situado en la región posterior, mientras que en los taquizoítos está localizado en la parte media, además la apariencia de las roptrías es más electrodensa. La densidad de las roptrías varía con la edad del quiste tisular, mientras más viejo sea el quiste más electrodensas son las roptrías, la mayoría de los bradizoítos poseen de 1 a 3 roptrías mientras que los taquizoítos tienen de 6-8 roptrías. En los bradizoítos se observa un incremento en el número de micronemos con una distribución submembranal, en contraste con los taquizoítos que están solo en el extremo apical; Adicionalmente se detectan numerosos gránulos de amilopectina, los cuales en el taquizoíto son escasos o ausentes (Dubey et al., 1998; Gómez de León C.T. & Mondragón, 2014; Weiss & Kim, 2000).

Los bradizoítos son más resistentes a la acción de enzimas proteolíticas que los taquizoítos, permaneciendo viables aún después del tratamiento por 2 h con una

solución de pepsina ácida, mientras que los taquizoítos solamente resisten por 10 min al tratamiento (Jacobs, Remington, & Melton, 1960). En un estudio en el cual se eliminó el CO<sub>2</sub> de las condiciones de cultivo celular por dos semanas a parásitos de la cepa tipo II (Prugniaud) se observó que los bradizoítos inmaduros se replicaron en un lapso de 12 h (comparado con el de un taquizoíto, el cual solo requiere de 5 h aproximadamente) y en forma asincrónica a través de una combinación de endodiogenia y endopoligenia (replicación asexual mediante la cual se forman más de dos células hijas dentro de una madre) (Dzierszinski et al., 2004; Luder & Rahman, 2017).



**Figura 2. Morfología de un taquizoíto y un bradizoíto.** En verde se marca la proteína SAG-1 presente en la membrana del parásito y en rojo se representa la proteína citosólica BAG-1, (modificado de Dubey, 1998; Gómez del León C., & Mondragón R, 2014).

### 1.3.3 Proteínas estructurales y de superficie

Durante la inter-conversión de estadios (taquizoítos a bradizoítos) se presentan cambios morfológicos y moleculares, que incluyen expresión de antígenos estadio específicos y alteraciones en el metabolismo (Lekutis et al., 2000), muchos de estas diferencias se demostraron mediante el uso de antisueros policlonales y con técnicas de Western blot, inmuno-fluorescencia y ELISA (Dubey, 1997; Fortier et

al., 1996; Lekutis et al., 2000).

La mayoría de los antígenos identificados hasta el momento en taquizoítos como bradizoítos pertenecen a dos diferentes familias: SAG1 y SAG2 (surface antigens). La **familia SAG1** incluye a SAG3, (BSR)4 (bradyzoite specific recombinant), Proteínas SRS 1-3 (SAG-related sequences), SAG5, SAG5.1 y SAG5.2. SAG1 y SRS1–SRS3 están presentes únicamente en taquizoítos, BSR4 sólo en bradizoítos y SAG3 en ambos (Dzierszinski et al., 2004). Dentro de la **familia SAG2** se encuentran SAG2A (antes SAG2), SAG2B-SAG2D. SAG2A y SAG2B que se expresan exclusivamente en taquizoítos, mientras que SAG2C y SAG2D se expresan solamente en bradizoítos (Fortier et al., 1996). Las enzimas y el metabolismo bioquímico de los bradizoítos no se han estudiado en detalle debido a la complejidad para obtenerlos en cantidades suficientes *in vitro*. Utilizando técnicas de biología molecular se han podido identificar diferentes enzimas como las enolasas de taquizoítos y bradizoítos, la glucosa-6-fosfato isomerasa y el lactato deshidrogenasa (LDH). Se ha demostrado que los bradizoítos poseen una ATPasa que está ausente en los taquizoítos (Dzierszinski et al., 2004). En el estadio de taquizoíto podemos encontrar antígenos específicos como: SAG1, SAG2A, SAG2B, LDH1 y ENO2, mientras que proteínas propias de bradizoítos están: SAG2C, SAG2D, SAG4 y BSR4. A la fecha se sabe que únicamente SAG3 se presenta en ambos estados. En cuanto al estadio de bradizoíto, las que son específicas son SAG2C, SAG2D, SAG4, la recombinante específica de bradizoíto 4 (BSR4), el antígeno de matriz (MAG1), LDH2, la enolasa ENO1 y el antígeno de bradizoíto 1 (BAG1) (Lyons, McLeod, & Roberts, 2002). La detección de estas moléculas mediante el uso de anticuerpos permite determinar el estado de diferenciación del parásito en una célula o en un tejido determinado.

#### **1.3.4 Esporozoíto**

El ooquiste inmaduro no infeccioso, se libera en las heces de los gatos infectados, esporula en el medio ambiente mediante condiciones adecuadas de humedad y temperatura en un lapso de 1 a 5 días después de la excreción en heces, adquiriendo una forma ovoide con un tamaño de 10-12  $\mu\text{m}$ , y conteniendo 8 esporozoítos infecciosos. El esporozoíto es similar estructuralmente al taquizoíto

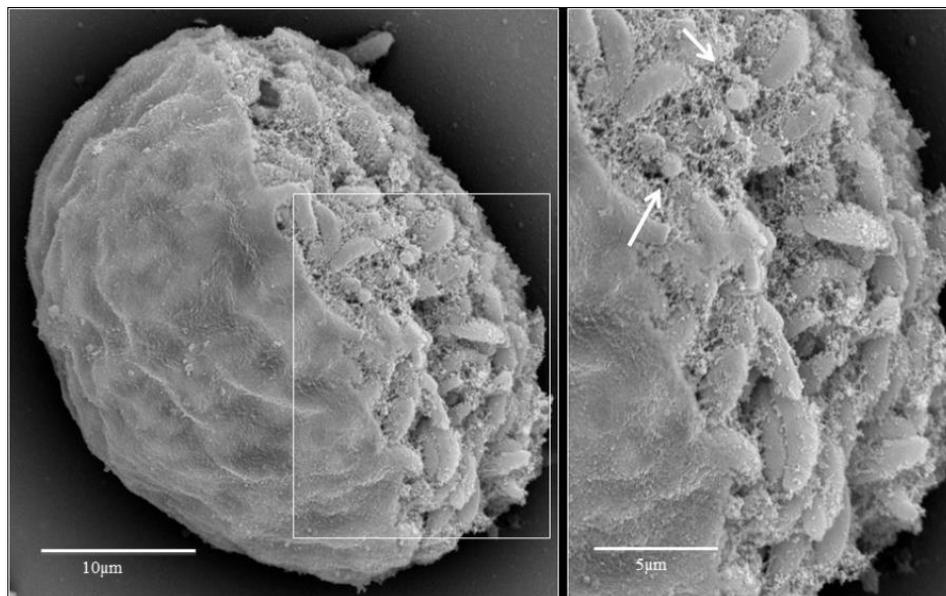
excepto por la mayor presencia de micronemos y roptrías y diversos componentes propios de esta forma parasitaria. El ooquiste puede permanecer viable por largos periodos en ambientes de alta humedad (Dubey et al., 1998; Frenkel et al., 1970; Gómez de León C.T. & Mondragón, 2014).

### 1.3.5 Quiste tisular

Los quistes tisulares son las estructuras que alojan a los bradizoítos en los tejidos del hospedero infectado y pueden tener una permanencia desde años hasta toda la vida del hospedero (Figura 3). Su tamaño varía, pero en promedio un quiste tisular inmaduro puede medir desde 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contener dos bradizoítos mientras que un quiste maduro puede medir de 50 a 70  $\mu\text{m}$  de diámetro y albergar de 1,000 a 2,000 bradizoítos en su interior (Castro, KN. 2014; Weiss & Kim, 2000). Estudios realizados *in vivo* han demostrado que el tamaño del quiste tisular depende de la madurez del quiste, del tipo de célula hospedera infectada y del método citológico utilizado para hacer la medición. El quiste en miocitos es 2-3 veces más grande que aquellos en células neurales. Mediciones hechas en quistes extraídos de cerebros mostró un crecimiento uniforme hasta las 10 primeras semanas, después de las cuales se presenta una considerable variabilidad en tamaño, debido quizá a una segunda generación de quistes tisulares. El tejido quístico puede alcanzar hasta 60  $\mu\text{m}$  de diámetro y contener unos 60,000 organismos. El tamaño de los quistes puede variar dependiendo de la cepa de *T. gondii* (Dubey, 1997). En cerebro, no suelen pasar de los 70  $\mu\text{m}$  de diámetro y generalmente tienen una forma esferoidal, mientras que en tejido muscular pueden llegar a medir hasta 100  $\mu\text{m}$  y son más alargados (Dubey et al., 1998). Es tema de controversia si el fenotipo de la célula infectada es determinante para la inter-conversión de *T. gondii*.

El quiste se compone principalmente de la pared quística y la matriz quística. La pared es rica en carbohidratos como la N-acetil galactosamina y N-acetilglucosamina, está cargada negativamente, es delgada de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor y posee una permeabilidad que deja cruzar moléculas de hasta 10 kDa. Además presenta una glicoproteína denominada CST1 con ubicación abundante en la pared quística, y que ha sido ampliamente utilizada como

marcador de la pared del quiste tisular, otra proteína de abundante concentración en la pared es GRA5 y en menos proporción GRA1, GRA3 y GRA6 (Dzierszinski et al., 2004; Lane et al., 1996). Adicionalmente, la matriz intraquística está compuesta por dos fases una compacta y rígida y otra más esponjosa. Estas dos fases de la matriz intraquística presentan un material filamentososo y vesicular, esto determinado por el tamaño que presentan las vesículas ya que las pequeñas oscilan entre 50 y 140 nm de diámetro mientras que las grandes presentan una cobertura densa en su superficie externa y miden entre 250 y 700 nm de diámetro (Lemgruber et al., 2011).



**Figura 3. Morfología de un quiste tisular de la cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*.** Organización interna de los bradizoítos, embebidos en una red fibrosa con presencia de pequeñas vesículas esféricas (Flechas) (Hernández Contreras, 2012).

#### **1.4 Enquistamiento *in vivo***

Los mecanismos que se han propuesto en relación al proceso de enquistamiento de *T. gondii* se han relacionado con el mantenimiento de los parásitos bajo condiciones de estrés. En animales infectados, se propone que el estrés sea generado por la activación de células de la respuesta inmune y por el efecto de citocinas liberadas como una respuesta del hospedero a la presencia del parásito. El proceso de infección y la fase aguda de la toxoplasmosis se caracterizan por la

presencia del estadio de taquizoíto. Durante la fase inicial de la infección, los macrófagos constituyen el principal mecanismo de defensa del hospedero, mediante la fagocitosis del parásito, por otro lado, las células asesinas naturales (NK) también contribuyen con un efecto citotóxico directo. La respuesta inmune celular se activa cuando macrófagos o células dendríticas, también conocidas como células presentadoras de antígeno (APC), fagocitan al patógeno y lo procesan enzimáticamente, presentando componentes del patógeno en la membrana unidos a moléculas del complejo de histocompatibilidad. La presentación de estas moléculas del patógeno por estas APC a células T en reposo, induce su activación metabólica y diferenciación en dos poblaciones, las células T CD4<sup>+</sup> o cooperadoras y las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (Yarovinsky, 2014).

Las células CD4<sup>+</sup> se han clasificado como Th1 y Th2 de acuerdo a las citocinas que secretan una vez activadas (Figura 4). Por ejemplo las células Th1 secretan interferón  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), el cual activa a los macrófagos para ejercer una actividad citotóxica contra patógenos intracelulares virus y bacterias; Adicionalmente secretan interleucina 2 (IL- 2), que activa a linfocitos, macrófagos y células NK y finalmente secretan al factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) o linfoxina que promueve la inflamación. Por otro lado, las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 y IL-13 que activan a eosinófilos y basófilos que actúan contra parásitos extracelulares y gusanos. También secretan a la IL-10 que regula negativamente la activación de linfocitos y la función de macrófagos (Abbas, 2012). Junto con las células Th1, las NK y los macrófagos también contribuyen en la producción de IFN- $\gamma$  (Yarovinsky, 2014).

## Th1

Fuente Celular	Citocina liberada	Principal Función
Células Th1, NK	IFN- $\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunidad celular (Activación de macrófagos)</li> <li>• Control de patógenos intracelulares</li> <li>• Inhibe la vía de Th2</li> </ul>
Células Th1	IL-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activación de linfocito, NK y macrófagos</li> </ul>
Células Th1, linfocitos B	TNF- $\beta$ (linfotóxina)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promueve la inflamación</li> </ul>

## Th2

Fuente Celular	Citocina liberada	Principal Función
Células Th2, NK	IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunidad mediada por Ac</li> <li>• Control de infecciones parasitarias</li> <li>• Inhibición de IL-1, TNF y IL-6</li> </ul>
Células Th2 y mastocitos	IL-5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciación de eosinófilos</li> </ul>
Células Th2 y macrófagos	IL-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activación de linfocitos</li> <li>• Induce producción de proteínas de la fase aguda (inflamación)</li> </ul>
Células Th2	IL-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe producción de IL por linfocitos</li> <li>• Inhibe función de macrófagos</li> </ul>

**Figura 4. Papel de células Th1 y Th2 en la respuesta inmune.**

El IFN- $\gamma$  es una citocina que limita la replicación intracelular del *Toxoplasma* (Rosowski et al., 2014), cuya importancia fue evidenciada en ratones transgénicos carentes de IFN- $\gamma$  y que fueron infectados generando su muerte en contraste con los animales normales que solo desarrollaron una toxoplasmosis crónica con presencia de quistes tisulares (Suzuki et al., 1988). La administración exógena del INF- $\gamma$  en los animales deficientes, los protegió de una infección letal. Aunque no está del todo claro su papel específico, se ha encontrado que el INF- $\gamma$  induce a la enzima que degrada al triptófano la indolamina 2,3- deoxigenasa (Rosowski et al., 2014), generando posiblemente una carencia de este aminoácido lo que se ha asociado con una disminución de la replicación del parásito y con la formación del quiste.

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es otra citocina que también se ha vinculado con la inducción de la diferenciación a bradizoítos en macrófagos murinos invadidos. El TNF- $\alpha$  presenta un efecto sinérgico con el IFN- $\gamma$  para facilitar la conversión a bradizoítos (Bohne et al., 1994). En un estudio realizado en

fibroblastos humanos se determinó que la interleucina 6 (IL-6) favorece la formación de bradizoítos *in vitro* (Weiss et al., 1995). A la fecha se desconocen las señales involucradas en la inducción del enquistamiento del parásito.

### **1.5 Enquistamiento *in vitro***

Existen diversas estrategias experimentales con las cuales se puede inducir el enquistamiento de *T. gondii in vitro* (Figura 5), todas están relacionadas al mantenimiento del parásito bajo estados de estrés, pero se desconocen el o los mecanismos que regulan y que inducen el disparo de dicho proceso. En la mayoría de las líneas celulares se obtienen quistes, más este hecho no ha sido cuantificado. Para la inducción *in vitro* de la formación de quistes de *T. gondii* se han utilizado diferentes líneas celulares como células Vero, fibroblastos de prepucio humano (HFF), macrófagos murinos, neuronas de rata, astrocitos y microglia las cuales se han invadido con parásitos de diferentes cepas de *T. gondii* como RH, ME49, NTE, PLK, VEG y algunas cepas exóticas como: COUG, CAST, GPHT, MAS, FOU (Ferreira da Silva et al., 2008). Asimismo, se desconocen la mayoría de eventos moleculares y morfológicos involucrados en la diferenciación celular de taquizoíto a bradizoíto, ni tampoco cuales son los cambios que ocurren en la célula hospedera como resultado del enquistamiento. Hasta el momento se han identificado antígenos estadio-específicos así como modificaciones en el metabolismo durante la conversión de taquizoíto a bradizoíto o cistogénesis (Tabla 1) (Castro, KN. 2014; Sullivan & Jeffers, 2012).

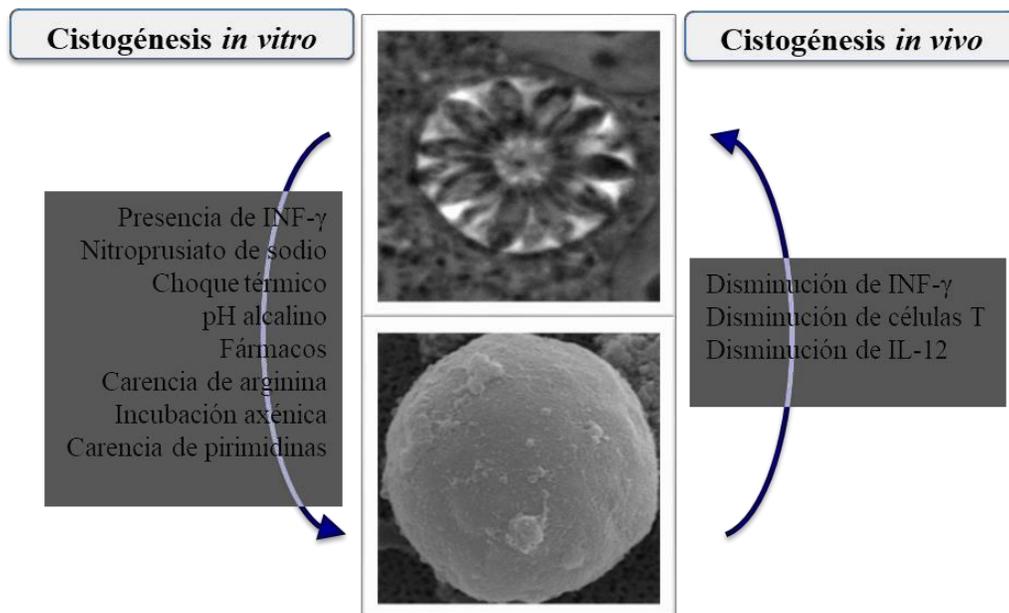
Nombre de antígeno	Distribución por inmunofluorescencia
BAG1 (hsp30)	Citoplasma
BAG5	Citoplasma
BSR4 (p36)	Superficie
SAG4	Superficie
MAG1	Matriz
P21/p21	Superficie
P43/p34	Superficie
CST1	Pared quiste tisular

**Tabla 1. Moléculas de bradizoítos y su distribución topográfica.**

Las estrategias experimentales que se han utilizado para inducir el proceso de cistogénesis, consisten en mantener a las células infectadas bajo condiciones de estrés, tales como: 1) cultivo de células infectadas por varios días o semanas en condiciones de pH alcalino (8.0-8.2), la cual es la estrategia más comúnmente empleada para inducir la conversión de taquizoítos a bradizoítos *in vitro*, y los bradizoítos obtenidos por esta técnica representan el fenotipo más definido que puede ser obtenido en condiciones *in vitro*. Una de las desventajas de la inducción a pH alcalino por periodos muy prolongados, es que afecta severamente a la célula hospedera impidiendo así la caracterización de los cambios celulares durante la cistogénesis; 2) exposición del parásito a nitroprusiato de sodio, el cual actúa como una fuente de óxido nítrico exógeno (NO) y que también inhibe proteínas involucradas en la cadena respiratoria de la mitocondria del parásito (Bohne et al., 1994); 3) la presencia de IFN- $\gamma$  en el cultivo celular infectado, limita la replicación del parásito e induce la formación de quistes *in vitro*. Sin embargo el INF- $\gamma$  solo es efectivo en ciertas cepas de *Toxoplasma* así como también en ciertas líneas celulares, ésta estrategia es ineficaz en inducir la diferenciación a bradizoítos de la cepa virulenta RH de *Toxoplasma* o de las a-virulentas VEG y ME49 (Soete & Dubremetz, 1996); 4) la temperatura también es utilizada como una estrategia para la inducción *in vitro* de la cistogénesis, consiste en mantener a las células no infectadas por 2 h a 34°C para que adquieran termo-tolerancia. Las

células son llevadas a 37°C por 2 h más, para su infección con los taquizoítos y posteriormente es elevada a 43°C la temperatura de incubación a durante 12-48 h, después las células son mantenidas de nuevo a 37°C por el tiempo que dure el experimento, y bajo estas condiciones, se observa desde las 48 h, la presencia de estructuras quísticas similares a las aisladas de cerebros de ratones infectados; sin embargo la eficiencia es muy baja y poco reproducible (Soete et al., 1994); 5) el estrés nutricional también puede inducir el enquistamiento del parásito, la limitación de nutrientes como arginina bloquea la replicación de *T. gondii* y dispara la diferenciación a bradizoítos y la formación de quiste (Fox et al., 2004). Debido a que *T. gondii* carece de la enzima necesaria para sintetizar arginina *de novo*, requiere por lo tanto incorporar este aminoácido de la célula hospedera para su propio metabolismo; 6) Por último, la exposición a fármacos anti-parasitarios y compuestos químicos como la pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, espiramicina, hidronaftoquinonas y macrólidos de nueva generación, que afectan la replicación, inducen la cistogénesis (Ribeiro et al., 2017).

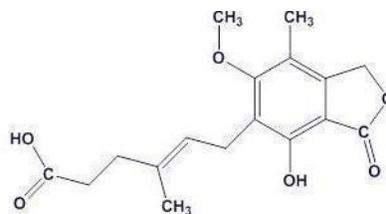
La principal desventaja en todas las estrategias de inducción de cistogénesis antes mencionadas, es la baja frecuencia de cistogénesis con una baja reproducibilidad así como al efecto deletéreo que produce la exposición prolongada de las células hospederas a las condiciones de estrés. En conjunto esto ha dificultado la caracterización de los cambios celulares de la célula hospedera que se presentan en la formación del quiste tisular *in vitro*.



**Figura 5.- Factores asociados con la interconversión de taquizoíto a bradizoíto.** Del lado izquierdo se enlistan los mecanismos involucrados con el cambio al estadio de bradizoíto mientras que al lado derecho se muestran los relacionados a la reactivación del parásito es decir la transformación de bradizoíto a taquizoíto (K. N. Castro, 2014; Hernández Contreras, 2012).

### 1.6 Inducción del proceso de cistogénesis con AMF

Recientemente se encontró en nuestro laboratorio que el ácido micofenólico puede inducir la diferenciación del parásito para modificar a la célula hospedera y formar un quiste tisular *in vitro* (Castro, KN. 2013). El ácido micofenólico (AMF) (Figura 6) es un fármaco utilizado en la clínica como un potente inmunosupresor que bloquea la síntesis *de novo* de purinas en los linfocitos al inhibir a la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). Este compuesto es derivado de la fermentación por *Penicillium stoloniferum* y especies relacionadas al cual se le han atribuido varias propiedades antibacterianas, anti-fúngicas, antivirales, antitumorales, anti-psoriásicas, antirreumáticas e inmunosupresoras, (Puig, 1996). En la clínica, el AMF es utilizado para evitar el rechazo agudo de trasplante alogénico renal, cardíaco o hepático.



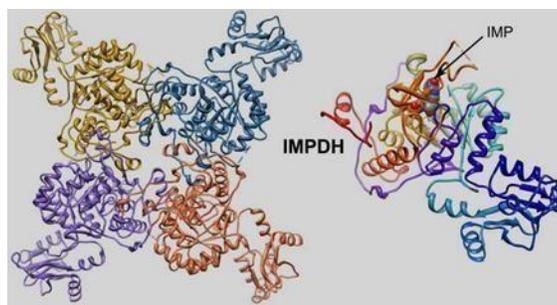
**Figura 6. Estructura química del ácido micofenólico.** Molécula responsable de la actividad biológica (inmunosupresora). Producto de la degradación del micofenolato de mofetilo.

### 1.7 Mecanismo de acción del AMF

En los linfocitos la principal vía de síntesis de purinas es la también conocida como vía *de novo* que utiliza a la IMPDH. Existe una vía de salvamento que utiliza a la hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HXGPRT) pero es poco relevante en los linfocitos (Sullivan et al., 2005). El AMF actúa en las células eucariotas como inhibidor no competitivo y reversible de la IMPDH imprescindible para la síntesis *de novo* de los nucleótidos de guanina y por lo tanto es necesaria para que los linfocitos T y B activados puedan proliferar y actuar. Asimismo, el AMF inhibe la transferencia de residuos azúcares como la manosa y la fucosa a las glicoproteínas de adhesión, disminuyendo la capacidad de adherencia de los linfocitos activados al endotelio vascular y por ende, reduciendo su potencial de ataque y lesión. El AMF es pues, un inhibidor del metabolismo de las purinas con un efecto relativamente selectivo sobre los linfocitos, al depender éstos mucho más que otras células en proliferación (hematopoyéticas, germinales, neutrófilos, etc.) de las síntesis *de novo* de purinas para su expansión y diferenciación funcional (Puig, 1996).

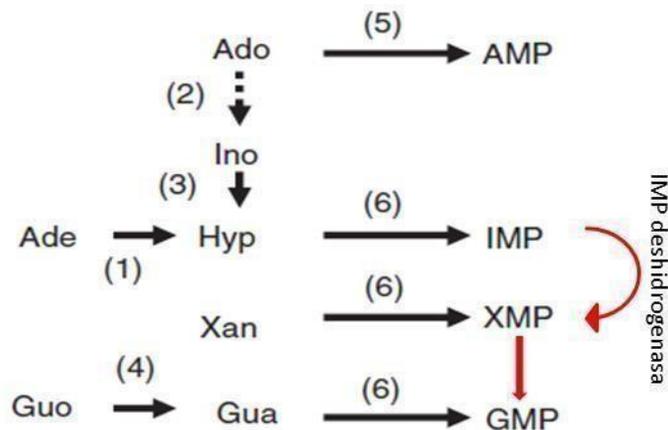
La inhibición de la expansión clonal de los linfocitos activados, disminuye la formación de anticuerpos (Ig) y de la síntesis de IL-1, IL-6, factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF), todos ellos factores determinantes de la capacidad proliferativa de fibroblastos y de células musculares lisas de la pared vascular. El efecto inmunosupresor del AMF está basado en sus efectos selectivos sobre el sistema inmune. Previene la proliferación de células T, linfocitos y la formación de anticuerpos por las células B. Puede también inhibir el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación (Puig, 1996). Este fármaco tiene alta afinidad al sitio de

unión de NAD de la IMPDH principalmente de la isoforma tipo II en humanos e interacciona con la enzima después de que los sustratos NAD e IMP se le unen (Puig, 1996). La enzima IMPDH se encuentra en humanos y en diversos organismos cuya función radica en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina, cataliza la oxidación de inosina 5' monofosfato (IMP) a xantina 5' monofosfato (XMP), siendo este el primer paso en la síntesis de nucleótidos de guanina. En varios organismos así como en el humano se han detectado 2 genes que codifican para 2 isoformas de la enzima, la IMPDH tipo I y la tipo II. En general la IMPDH de tipo I de humano predomina en retina, bazo y células mononucleares de la sangre, pero es expresada en niveles bajos, mientras que la expresión de la tipo II se incrementa durante la proliferación celular (Hedstrom, 2009; Krzysztof, 2003). Todas las estructuras de la IMPDH muestran una organización homo-tetramérica presentando dos dominios, uno catalítico el cual es un barril  $\alpha/\beta$  y un subdominio que contiene 2 subdominios CBS (cistationina beta sintasa) que regulan la actividad de los dominios enzimáticos y transporte asociados en respuesta a moléculas de unión con grupos adenosil, el sitio activo se encuentra localizado en la cara C-terminal del barril  $\alpha/\beta$  (Figura 7).



**Figura 7. Estructura tetramérica de la IMPDH de tipo II de humano (Hedstrom, 2009).**

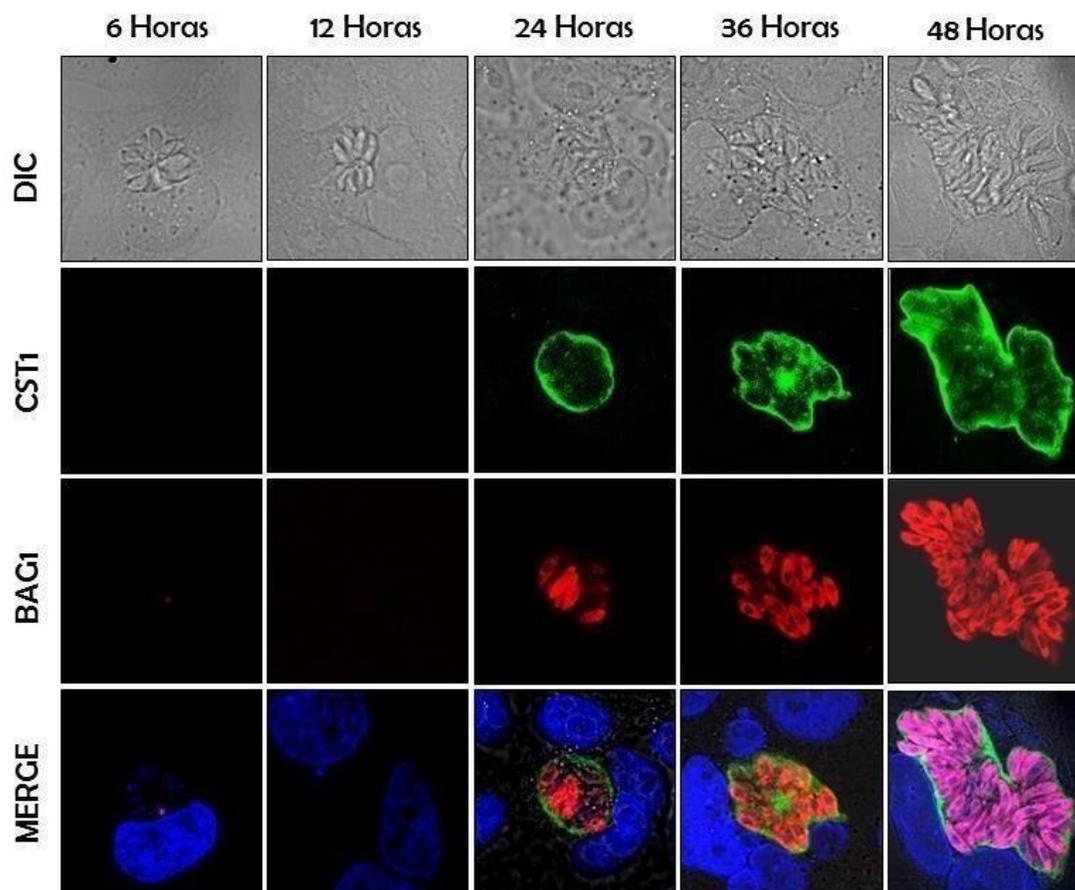
Esta enzima es inhibida por el fármaco AMF o por análogos de nucleótidos de adenina. En *Toxoplasma* se ha reportado la existencia de la TgIMPDH, la cual tiene un 53 % de identidad con la IMPDH tipo II de humano (Sullivan et al., 2005). Dado que *T. gondii* no cuenta con una ruta biosintética *de Novo* de purinas la enzima IMPDH es de vital importancia para su replicación, por su participación en el proceso de salvamento de purinas, (Figura 8) (Krzysztof, 2003).



**Figura 8. Ruta biosintética de salvamento de purinas en *T. gondii*.** La inosina monofosfato (IMP) se sintetiza a partir de la adenosina (Ado) proveniente de la célula hospedera y que es reclutada hacia el citoplasma del parásito a través de un transportador presente en la membrana del mismo. La IMPDH oxida a la IMP en Xantina monofosfato (XMP), y posteriormente una molécula de glutamina cede el grupo amida al carbono 2 de la xantina para formar Guanosina monofosfato (GMP) y después sintetizar GTP y así el parásito poder replicarse. Ade, adenina; Ino, inosina; Guo, guanosina; Gua, guanina; Hyp, hypoxanthine; Xan, xanthine. Las enzimas son (1) adenine deaminase, (2) Adenosine deaminase, (3) Inosine phosphorylase, (4) Guanosine phosphorylase, (5) Adenosine kinase (AK) y (6) Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HXGPRTase), (Modificado de Louis M. Weiss, *et al.* 2007).

En el trabajo de tesis de maestría de Hernández Contreras (2012) se demostró el efecto del ácido micofenólico como un inductor de la expresión de una glicoproteína característica de la pared de quiste tisular, la CST1. Se demostró que el AMF indujo *in vitro* el proceso de cistogénesis en taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*, la cual está considerada como una cepa no formadora de quiste debido a su alta virulencia que mata al hospedero antes de que se generen algún quiste cerebral. Este fenómeno se observó al exponer a células HEP-2 infectadas con taquizoítos de la cepa RH con el fármaco AMF, encontrándose desde las 24 h la expresión de proteínas específicas del estadio de bradizoíto (BAG-1) y del quiste tisular (CST1) (Figura 9) (Hernández Contreras, 2012). Por el diseño experimental desarrollado en ese estudio en el cual tanto la célula hospedera como el parásito eran expuestos al fármaco, se afectaban las características de proliferación y morfología de la célula hospedera impidiendo realizar una

interpretación adecuada de los resultados. Por esta razón, se modificó la estrategia experimental.



**Figura 9. Co-expresión de CST1 y BAG1 en células HEp-2 invadidas con RH y tratadas con AMF en una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a las 6, 12, 24, 36 y 48 h.** Contraste de interferencia Diferencial (DIC), Verde: glicoproteína de pared de quiste CST1 marcada con lectina *D. biflorus*-FITC, Rojo: proteína de bradizoítos BAG1, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Escala = 5  $\mu\text{m}$ , (Hernández Contreras, 2012).

Con este fin, en estudios realizados en mi tesis de maestría (Castro, KN. 2013), se estableció una metodología en la que parásitos extracelulares y purificados se expusieron al AMF, se retiró el fármaco y se usaron para invadir a las células hospederas en ausencia de AMF. Esta nueva estrategia experimental, no solo activó la diferenciación del parásito a la forma del bradizoíto con la expresión de la proteína BAG1 y expresión de la glicoproteína CST1 en la membrana vacuolar, sino que también lo hizo desde las 24 h de exposición y además al no entrar el AMF en contacto con la célula hospederas, no se afectó su viabilidad, morfología o

proliferación. Utilizando esta estrategia, se hizo una caracterización preliminar de la distribución de filamentos de actina de la célula hospedera durante la transformación a quiste *in vitro* utilizando un marcador fluorescente específico para filamentos de actina (Falacidina-rodaminada o fluoresceinada).

El ácido micofenólico es empleado comúnmente en estrategias experimentales en varios organismos incluyendo *Toxoplasma* con el fin de obtener cepas modificadas genéticamente (Donald et al., 1996; Rommereim et al., 2013). Bajo tales estrategias, se adiciona xantina al medio de cultivo, esta molécula es un sustrato de la enzima HXGPRT de la ruta alterna de salvamento para la biosíntesis de purina. A la fecha, en ninguna de las estrategias reportadas para la obtención de cepas KO de *Toxoplasma* usando ácido micofenólico, se ha reportado la diferenciación de los taquizoítos a bradizoítos y formación de quistes tisulares, probablemente debido a que la xantina es utilizada por el parásito para cumplir con los requerimientos metabólicos purínicos, mientras que la enzima IMPDH es bloqueada por él AMF, evitando así que el parásito entre en un proceso de estrés y por lo tanto no inicie su diferenciación.

### **1.8 Asociación entre organelos del hospedero y la VP**

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado que establece una relación única con su célula hospedera, con la finalidad de sobrevivir y asegurar su replicación dado que el parásito requiere tomar diversos nutrientes del hospedero, como lo es el triptófano, arginina, purinas, iones o el colesterol. La membrana plasmática de la VP evita la fusión con lisosomas de la célula hospedera que pueden destruir al parásito (Sinai & Joiner, 2001). Se ha propuesto que el contenido de las roptrías es el responsable de otorgarle la propiedad no fusogénica a la membrana de la VP y el reclutamiento de algunos organelos de la célula hospedera (Kim & Weiss, 2004; Sinai & Joiner, 2001). El poro de la membrana de la VP le permite al parásito obtener pequeños metabolitos solubles de aproximadamente 1.5 kDa como lo son las glucosa, diversos iones y aminoácidos (Schwab et al., 1994). Se ha demostrado que la secreción secuencial de proteínas por parte del parásito son eventos críticos en el proceso de invasión y en el establecimiento de la infección. *Toxoplasma* tiene la capacidad de movilizar

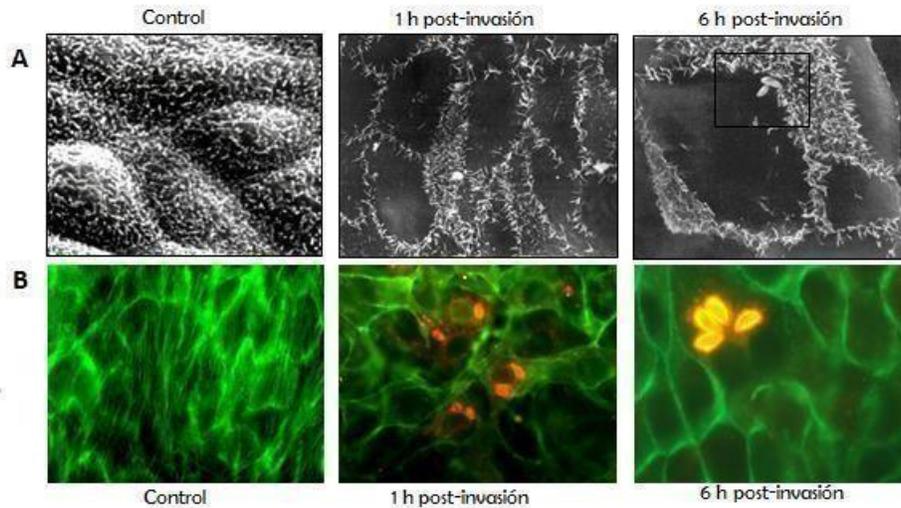
una serie de moléculas efectoras que pueden interaccionar con el hospedero durante el proceso de infección, estas incluyen adhesinas que contribuyen a la unión y penetración, proteasas que pueden facilitar la invasión o migración a los tejidos del hospedero y enzimas metabólicas potencialmente involucradas en la adquisición de nutrientes (Zhou et al., 2005).

Se ha observado que una vez que el parásito entra en la célula blanco existe un reordenamiento de los organelos del hospedero, llevando al establecimiento de la VP a las zonas adyacentes al núcleo del hospedero y manteniendo una estrecha asociación con las mitocondrias y el retículo endoplásmico (Sinai et al., 1997). Se ha estudiado que la proximidad de las mitocondrias a la membrana de la VP es de aproximadamente 12 nm mientras que la del retículo endoplásmico es de 18 nm, además esta asociación es dependiente de una invasión activa por parte del parásito. Por otra parte, la asociación de estos componentes del hospedero no es por consecuencia de las limitaciones del espacio citoplasmático de la célula hospedera ni tampoco por el aumento del tamaño de la VP, ya que esta relación permanece constante a medida que el parásito prolifera (Magno et al., 2005; Sinai et al., 1997), lo cual no sucede con otros organismos como *Leishmania amazonensis* y *Coxiella burnetti*, ya que a pesar de las vacuolas de estos organismos crecen considerablemente más que la de *T. gondii*, los organelos del hospedero nunca se observan estrechamente relacionados con las VP de estos patógenos (Sinai et al., 1997).

Por otra parte la adhesión e invasión de patógenos en células de mamíferos está acompañada por un re-arreglo del citoesqueleto del hospedero, esto para favorecer la entrada del patógeno, algunos microorganismos como *E. coli* pueden inducir los cambios en el citoesqueleto liberando moléculas efectoras que modifican las vías de señalización de la célula blanco (Finlay & Abe, 1998). Con respecto a la invasión y proliferación de taquizoítos de *T. gondii*, se ha observado una asociación de filamentos intermedios tipo vimentina hacia la VP desde la hora después de la invasión, este recubrimiento de la VP se inicia en la superficie nuclear de la célula hospedera (Halonen & Weidner, 1994). Durante la replicación del parásito, los filamentos intermedios de vimentina se reordenan progresivamente alrededor de la membrana de la VP, además los filamentos

intermedios de vimentina que se originan a partir de la superficie nuclear de la célula hospedera se reordenan progresivamente alrededor de la VP. Durante las infecciones, la organización del citoesqueleto de vimentina es normal en toda la célula y aparece redefinido solo en las proximidades de la VP. Análisis en el cual se despolimerizan los filamentos intermedios con inhibidores de fosfatasa como ácido okadaico y caliculina A, mostraron que hay un retardo en la asociación de la VP al núcleo, concluyendo que los filamentos intermedios de vimentina del hospedero sirven para acoplar a la VP a la superficie nuclear de la célula hospedera (Halonen & Weidner, 1994). En relación a los microtúbulos de la célula hospedera, existe un estudio en el que se invadieron células de músculo esquelético por taquizoítos y se observa que estos rodean a la VP, sugiriendo que tienen como función crear una barrera a la fusión fagolisosomal (Andrade, Stumboet al., 2001).

En la tesis de maestría de S. Muñiz, se determinó que durante la invasión y proliferación de taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma*, se presenta una reorganización del citoesqueleto de filamentos de actina en células epiteliales infectadas del tipo MDCK. Se encontró una disminución de las fibras de stress en la región basal y citoplasmática, principalmente en la zona donde se encontraba la VP, incrementándose la marca de actina filamentosa en las zonas de uniones intercelulares, mientras que en la cara apical de la célula hospedera hubo una formación de cúmulos de microvellosidades, indicando que la presencia del parásito indujo cambios en el citoesqueleto de actina de la célula MDCK (Figura 10) (Muñiz Hernández, 2004).



**Figura 10.** Cambios en el CK de la c3lula hospedera (MDCK) por efecto de la invasi3n de tachizo3itos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. (A), micrograf3as de microscop3a electr3nica de barrido de monocapas de c3lulas MDCK infectadas con tachizo3itos. (B), fotograf3as de confocal de filamentos de actina (verde) y tachizo3itos (rojo), (Mu3niz Hern3ndez 2004).

A la fecha no se conocen los mecanismos por los cuales diferentes organelos del hospedero migran hacia el sitio donde se encuentra la VP, as3 mismo se desconoce su regulaci3n y la funci3n que cumplen estas asociaciones en los procesos de proliferaci3n del par3sito y en su mantenimiento.

En relaci3n a la asociaci3n de organelos o de componentes del citoesqueleto al quiste tisular hay un estudio en el cu3l se encontr3 que, adem3s de una asociaci3n de filamentos intermedios de la c3lula hospedera a la VP, tambi3n sugiere que los elementos de citoesqueleto espec3ficamente filamentos intermedios en c3lulas gliales se asocian a la pared del quiste (Halonen et al., 1998), en este estudio se analiz3 la interacci3n de los filamentos intermedios con quistes de *Toxoplasma gondii* inducidos *in vitro* mediante el tratamiento con nitroprusiato de sodio en astrocitos de rat3n y en quistes aislados de cerebro de ratones infectados. Se detect3 que los filamentos gliales, detectados por inmuno-tinci3n de la prote3na 3cida fibrilar glial, se acumulaban alrededor del per3metro de los quistes a medida que estos se desarrollaban, mientras que por microscop3a electr3nica se determin3 que se forma una capa de filamentos gliales alrededor del quiste.

## II.- Justificación

A la fecha se desconoce los procesos celulares y moleculares que dan como resultado la formación del quiste tisular de *T. gondii*. En células invadidas se ha descrito que durante la proliferación intracelular de taquizoítos, se asocian a la VP diversos organelos como las mitocondrias, retículo endoplásmico así como componentes del citoesqueleto como los filamentos intermedios, aunque a la fecha se desconocen los efectos que dichas asociaciones producen en el parásito en proliferación, en la célula hospedera o en el proceso de cistogénesis así como las funciones que cumplen.

Durante la formación del quiste tisular, no se conoce el proceso por el cual se forma la pared quística y la contribución particular de la célula hospedera y del propio parásito en dicho proceso biosintético. Se desconoce si los componentes de los organelos que se asocian a la VP también contribuyen en la formación de la pared del quiste tisular cuando el parásito entra en el proceso de diferenciación para esa transformación, o si estos organelos son degradados y no tienen relación alguna con el proceso de enquistamiento. La falta de información en este sentido, se debe en gran medida a que a la fecha no se cuentan con estrategias que permitan la inducción del enquistamiento *in vitro* en forma controlada. Lo que se conoce son diversos métodos que al inducir condiciones de estrés en el parásito (pH 8.2, INF- $\gamma$ , etc.), activan la cistogénesis aunque con una baja frecuencia dentro de un cultivo celular y con formación de estructuras pseudo-quísticas que se detectan hasta después de 1 mes del tratamiento y con evidente daño de la célula hospedera. Este tiempo tan largo ha impedido la caracterización detallada y en secuencia de los eventos celulares, bioquímicos y moleculares que se presentan en la célula hospedera durante la cistogénesis y que resultan en la formación de un quiste tisular. En la presente tesis doctoral se estudiaron los cambios en la distribución de organelos y del citoesqueleto y de su posible efecto en la formación del quiste tisular *in vitro* utilizando la estrategia de inducción de la cistogénesis como es la exposición al AMF de taquizoítos de *T. gondii*.

### **III.- Hipótesis**

El proceso de diferenciación de *Toxoplasma gondii* con el tratamiento con ácido micofenólico induce estructuras quísticas con características estructurales similares a las obtenidas del modelo murino, además de un re-arreglo de componentes del citoesqueleto y organelos del hospedero para favorecer dicha diferenciación.

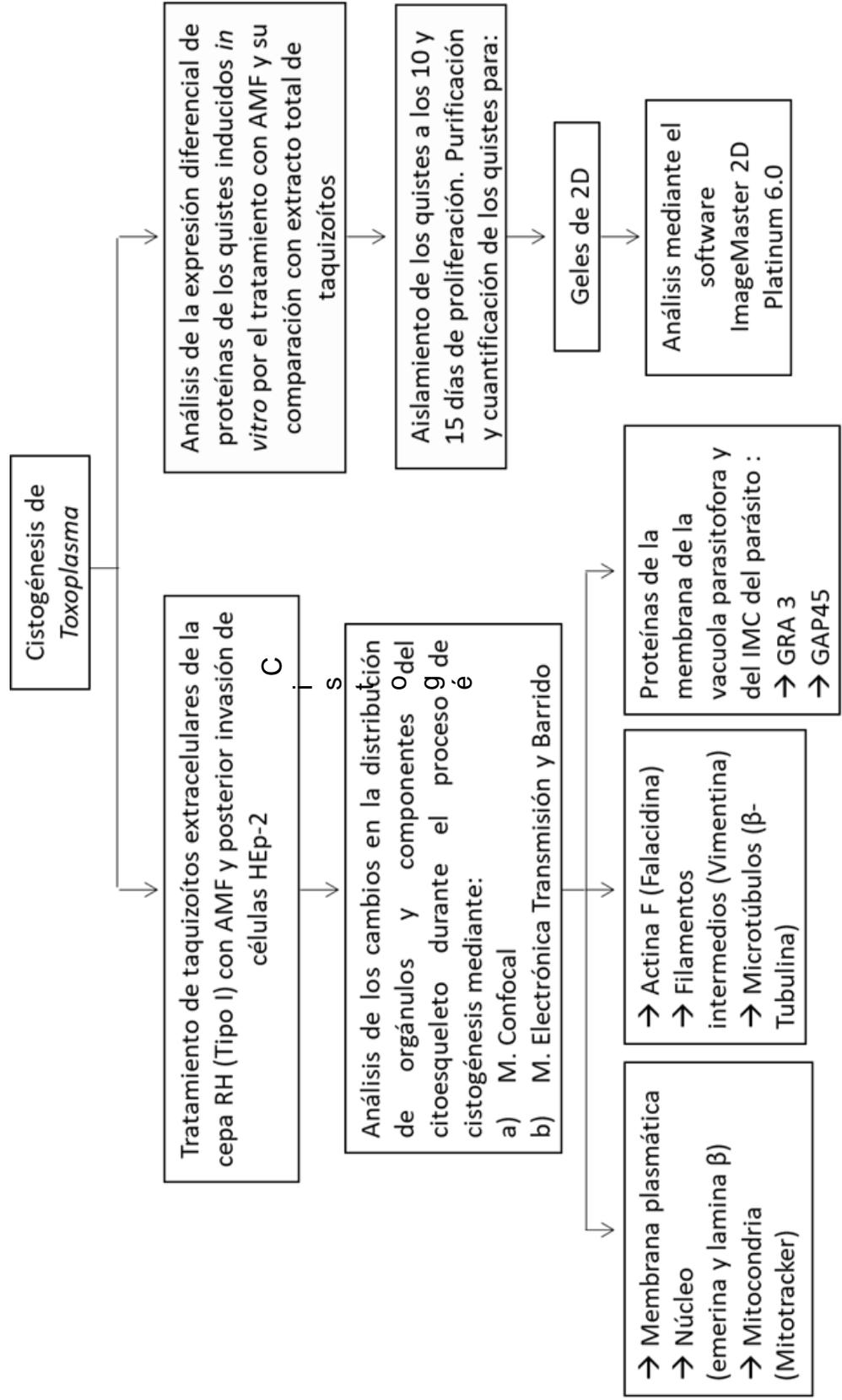
### **IV.- Objetivo general**

Caracterizar los cambios en la distribución de los organelos y del citoesqueleto de la célula hospedera durante la conversión taquizoíto a bradizoíto y formación del quiste tisular de *Toxoplasma in vitro*.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- 1.- Inducir la cistogénesis de *Toxoplasma* por inhibición de la TgIMPDPH y evaluarla mediante la detección de CST1 y BAG1.
- 2.- Analizar los cambios en la organización estructural de la VP y de los parásitos intravacuolares que derivan en la formación de la estructura pre-quística mediante la tinción de proteínas específicas de la membrana de la VP.
- 3.- Caracterizar la evolución en la formación de la estructura pre-quística determinando el destino de la membrana plasmática de la célula invadida.
- 4.- Determinar los cambios en la distribución de organelos (mitocondrias, núcleo) y de los componentes del citoesqueleto (filamentos intermedios de vimentina, microtúbulos y microfilamentos de actina) de la célula hospedera durante el proceso de cistogénesis de la cepa RH de *T. gondii*.
- 5.- Determinar los cambios en la expresión de proteínas durante la diferenciación del parásito.

### V.- Estrategia experimental



## **VI.- Metodología**

### **6.1 Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular HEp-2 (células epiteliales humanas de carcinoma de laringe) (HEp-2, ATCC-CCL 23), que se mantuvo en medio mínimo esencial (MEM, GIBCO, Carlsbad, CA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 8 % bajo incubación a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.2 Obtención y mantenimiento de la cepa de *T. gondii***

Se utilizaron taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*, los cuales se mantuvieron mediante la inoculación intraperitoneal de  $5 \times 10^4$  taquizoítos en 100  $\mu$ l de PBS estéril (solución salina fosfatos en mM: 138 NaCl, 2.7 KCl, 8.1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) en ratones de la cepa Balb/C. A los 3 o 4 días se sacrificaron por dislocación cervical, se les inocularon 5 ml de PBS estéril en la cavidad peritoneal y se cosecho el exudado peritoneal rico en taquizoítos. La suspensión se centrifugo a 520 g por 10 min y el botón celular se resuspendió en PBS. Los taquizoítos adicionalmente se filtraron a través de membranas de policarbonato de poros de 5 micras (Millipore, Bedford MA) para eliminar los macrófagos contaminantes. El número de taquizoítos se ajustó a  $1 \times 10^7$ /ml y se inocula ratones sanos para continuar con el mantenimiento de la cepa. Durante el manejo de taquizoítos se siguen las medidas de bioseguridad para el manejo de patógenos de nivel de bioseguridad tipo II, como son: el uso de bata, guantes, cubre bocas, y condiciones de esterilidad. El manejo de los animales se realiza de acuerdo a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y siguiendo el protocolo aprobado por parte del CICUAL del CINVESTAV-Zacatenco con el número 190-16.

### **6.3 Cepa de *Toxoplasma gondii***

**6.3.1 Cepa RH.** Corresponde a la población clonotípica tipo I de *T. gondii*, la cual presenta un alto grado de virulencia y tiene rápida diseminación y

proliferación, por lo cual aparentemente no forma quistes tisulares debido a su letalidad. Se mantiene en cultivos celulares y en ratones inoculados por vía intraperitoneal solo el estadio de taquizoíto (Selseleh et al., 2013).

**6.3.2 Cepa ME49.** Corresponde a una cepa de *Toxoplasma* de tipo II que se caracteriza por ser de baja virulencia y que se ha reportado como una cepa que forma quistes tisulares en ratones inoculados por vía oral, las cepas tipo II son las comúnmente asociadas con toxoplasmosis humana (Kim & Weiss, 2004; Sibley, Khan, Ajioka, & Rosenthal, 2009). En cultivo celular, puede mantenerse como taquizoítos, aunque su crecimiento es muy lento y con una muy baja invasividad. Debido a la dificultad para su mantenimiento *in vitro*, es poco utilizada en ensayos de proliferación y cistogénesis *in vitro*. Esta cepa se utilizó en el presente trabajo con el fin de conocer las propiedades de los quistes cerebrales.

**6.3.3 Cepa PRUGNIAUD (PRU).** Corresponde a una población clonotípica del tipo III de *Toxoplasma* que se caracteriza por ser de baja virulencia y lenta replicación. Esta cepa que ha sido ampliamente reportada, tiene una alta predisposición al enquistamiento *in vivo* e *in vitro*, por tal motivo ha sido empleada para el estudio de la cistogénesis de *Toxoplasma*. Su capacidad invasiva aunque limitada, es superior a la de la cepa ME49, razón por la cual se utilizó como control en la inducción de la cistogénesis en condiciones de cultivo *in vitro* a pH de 8.2 (Soete & Dubremetz, 1996).

#### **6.4 Infección de células con taquizoítos de *Toxoplasma***

Se cultivaron células HEp-2 con el inóculo de  $1.6 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo MEM al 8 %. Cuando se alcanzó un 70 % de confluencia se infectaron las células con taquizoítos en una relación 1:50 (célula-parásito) por 2 h. Posteriormente se lavaron las células con medio de cultivo a fin de eliminar los parásitos extracelulares y se proliferaron en medio de cultivo con suero al 8%, en incubadora de CO<sub>2</sub> y a 37 °C a los tiempos deseados para cada experimento.

### **6.5 Ácido micofenólico (AMF)**

Se utilizó el fármaco ácido micofenólico (AMF) de la marca SIGMA-Aldrich México (FL-1031), el cual se disolvió en 5 ml de DMSO y fue almacenado a 4 °C, para generar una solución stock de 50 mg/ml. Los controles negativos de los ensayos del AMF incluyeron DMSO en medio MEM a la misma concentración que la utilizada a las diferentes concentraciones del AMF.

### **6.6 Método de inducción de la cystogénesis**

Se trataron taquizoítos de la cepa RH con 20 y 50 µg/ml de AMF en medio MEM durante 4 h a temperatura ambiente, se centrifugaron a 520 g por 10 min para retirar el fármaco y finalmente se lavaron por centrifugación una vez con MEM. Se cuentan los taquizoítos en cámara de Neubauer y se invaden células HEp-2 que son crecidas sobre cubreobjetos estériles de vidrio a una confluencia del 70 % y en una relación 1:50 (célula: parásito) por 2 h a 37 °C. Se lavan 2 veces con MEM estéril para eliminar los taquizoítos extracelulares y se dejan los cultivos infectados para su crecimiento a diferentes tiempos de acuerdo a cada condición experimental en medio MEM con 8 % de SFB a 37 °C. Como control negativo se expusieron las células infectadas con medio MEM/SFB al 8 % más DMSO durante el mismo tiempo. Las concentraciones de AMF usadas (20 y 50 µg/ml) fueron determinadas con base en la caracterización realizada previamente durante la tesis de maestría (Castro, KN. 2013).

### **6.7 Detección de CST1 de pared quística**

Para la detección de CST1, las células HEp-2 invadidas con taquizoítos pre-tratados con AMF 20 y 50 µg/ml por 4 h, se fijaron con paraformaldehído (PAF) al 4 % por 30 min a temperatura ambiente (TA), las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5 % durante 5 min, nuevamente se lavaron con PBS y se bloquearon con suero fetal bovino al 1 % por 30 min. Posteriormente las células se incubaron con la lectina de *Dolichos biflorus* (lectina DBA) acoplada a FITC o a TRIT-C (Vector Laboratories, Inc., Burlingame CA) (dil 1:200 en PBS) 10 µg/ml por 2 h a TA.

Esta lectina se une específicamente a la glicoproteína CST1 de la pared quística (Zhang, et. al 2001). Se lavaron las células con PBS y se incubaron con DAPI 1 mg/ml (Molecular Probes, Oregon, USA) durante 20 min, finalmente se realizaron lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos en portaobjetos empleando 7  $\mu$ l de Vectashield (Vector laboratorios, Burlingame, CA), se sellaron con barniz de uñas transparente y las laminillas fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Axioscope II-Mot /Zeiss, Germany) así como en el microscopio confocal LSM 700 (Carl Zeiss. Germany).

### **6.8 Marcaje fluorescente de actina filamentosa, microtúbulos y filamentos de vimentina**

Las células HEp-2 invadidas con taquizoítos pre-tratados con AMF 50  $\mu$ g/ml por 4 h se incubaron por 1, 12, 24, 48, 72 h y 5, 7 y 10 días a 37 °C en MEM al 8 % SFB, después de cada tiempo se lavaron con PBS para eliminar el medio y se fijaron con PAF al 4 %. Una vez fijadas, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1 % durante 30 seg, se lavaron con PBS y se bloquearon las células con SFB al 1 % por 30 min. Para teñir a: a) los filamentos de actina, se incubaron las células con Falacidina-TRITC 0.1 mg/ml (SIGMA-Aldrich, St Louis MO, P-1951) durante 2 h a TA, b) los microtúbulos, se utilizó un anticuerpo contra  $\alpha$ -tubulina de ratón 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas, EUA.) y c) los filamentos intermedios se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti vimentina 1:40 (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, MO, V6630). Las células fueron incubadas toda la noche a 4°C y se lavaron al día siguiente con PBS. Para el marcaje de microtúbulos y filamentos intermedios se hizo una incubación adicional con un anticuerpo secundario chivo anti-ratón acoplado a TRIT-C (Jackson Immune Research) 1:200 por 1 h a TA, se lavan con PBS y finalmente se tiñeron con lectina DBA acoplada a FITC. Después de un lavado con PBS, las preparaciones se incubaron por 20 min con DAPI 1  $\mu$ g/ml (Molecular Probes, Oregon, USA, H21492) y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010) en portaobjetos de vidrio.

### **6.9 Despolimerización de citoesqueleto**

Las células HEp-2 se invadieron con taquizoítos pre-tratados con AMF 50 µg/ml por 2 h a 37 °C, se lavaron para retirar los parásitos extracelulares y se incubaron con: a) 1 y 10 µM de Citocalacina D, b) 2 y 5 mM de acrilamida (Shiver, Sackett, Knipling, & Wolff, 1992) y c) con 0.25 y 0.5 µM de Nocodazol por 1 y 2 h a 37 °C, para despolimerizar filamentos de actina, filamentos intermedios de vimentina y microtúbulos respectivamente. Después de cada tiempo se lavaron con MEM al 8 % de SFB para eliminar el fármaco y se incubaron durante 72 h. Después del tiempo de incubación, se procesaron las muestras para fluorescencia marcando las diferentes proteínas de citoesqueleto actina F, vimentina y tubulina como se mencionó anteriormente, así como la detección de la glicoproteína CST1 con la lectina de *Dolichos biflorus*.

### **6.10 Marcaje fluorescente de membrana**

Después de cada respectivo tiempo (1, 12, 24 y 48 h y 5, 7 y 10 días) se fijaron las células infectadas con taquizoítos pre-tratados con el AMF con PAF al 4 %, se lavaron con PBS, se colocó la molécula de aglutinina de Germen de Trigo (Nagata & Burger, 1974), conjugado de tetramethylrhodamine 10 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA, W849) durante 20 min a TA, se lavó con PBS, se bloquea con SFB al 1 % por 30 min, se tiñó con lectina de *DBA* acoplada a FITC, se lavaron con PBS. Por último se incubaron por 20 min con DAPI 1 µg/ml (Molecular Probes, Oregon, USA, H21492) y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010) en portaobjetos de vidrio.

Para teñir el núcleo de la célula hospedera se siguieron dos marcadores:

### **6.11 Inmunofluorescencia de lámina β nuclear**

Después de cada tiempo, se fijaron las células infectadas con taquizoítos pre-tratados con el AMF con PAF al 4 %, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2 % 10 min, se lavaron con PBS, se bloquearon con SFB al 1 % por 30 min, se colocó el anticuerpo primario anti lámina β una hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C. Después se lavó con PBS, se coloca el anticuerpo

secundario chivo anti-conejo acoplado a TRIT-C (Jackson Immune Research) 1:200 por 1 h a TA, se lavó con PBS, se tiñó con lectina de *DBA* acoplada a FITC, se lavó con PBS y por último se incubaron por 20 min con DAPI 1 µg/ml (Molecular Probes, Oregon, USA, H21492) y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010) en portaobjetos de vidrio. La lámina nuclear está distribuida por debajo de la membrana nuclear y su distribución solo está interrumpida en los poros nucleares.

### **6.12 Inmunofluorescencia de emerina**

Después de cada respectivo tiempo se fijaron las células infectadas con taquizoítos pre-tratados con el AMF con PAF al 4 %, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2 % 10 min, se lavaron con PBS. Después se bloquearon con SFB al 1 % por 30 min, se coloca el anticuerpo primario anti emerina una hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C, se lavaron una vez con PBS mas Tritón X-100 0.2 % 5 min en agitación y dos más con PBS, se coloca el anticuerpo secundario chivo anti-conejo acoplado a TRIT-C (Jackson Immune Research) 1:200 por 1 h a TA, se lava con PBS, se tiñe con lectina de *DBA* acoplada a FITC, se lavó con PBS y por último se incubaron por 20 min con DAPI 1 µg/ml (Molecular Probes, Oregon, USA, H21492) y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010) en portaobjetos de vidrio.

### **6.13 Marcaje fluorescente de mitocondrias**

Después de cada tiempo respectivo las células infectadas con taquizoítos pre-tratados con el AMF se incuban con el compuesto Mitotracker Red 580 (Molecular Probes, Oregon, USA, M22425) 10 nM 30 min a 37 °C, se lavó con PBS, se fijó con glutaraldehído al 0.05 % 1 h a TA, se lavó con PBS, se permeabilizo con Tritón X-100 0.5 % 3 min, se lavó con PBS, se bloqueó con SFB al 1 % 20 min a TA, se tiñó con lectina de *DBA* acoplada a FITC, se lavaron con PBS y por último se incubaron por 20 min con DAPI 1 µg/ml (Molecular Probes, Oregon, USA, H21492) y se montaron con Vectashield (Vector

Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010) en portaobjetos de vidrio. Los colorantes MitoTracker se utilizaron cada vez con mayor frecuencia para análisis funcionales y de morfología de las mitocondrias. El patrón de la fluorescencia que producen sugiere que son específicos para dichos organelos. Estos colorantes son derivados de clorometil-rosaminas y se vuelven fluorescentes solamente cuando son oxidados dentro de las células. Debido a su potencial de membrana, las mitocondrias funcionales incorporan el colorante y éste se acumula en su interior, ahí, el grupo clorometil reacciona con grupos tiol presentes en péptidos y proteínas para formar un conjugado que puede ser fijado con aldehídos (de La Monte & Wands, 2001). La oxidación del MitoTracker Red por cultivos viables da origen a células que muestran un patrón "punteado" fluorescente, cuya distribución se ha asociado con las mitocondrias (Leira, Vieites, Vieytes, & Botana, 2001).

#### **6.14 Inmunofluorescencia de GRA3**

Después de cada tiempo respectivo se fijaron las células infectadas con taquizoítos pretratados con el AMF con PAF al 4 %, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.25 % 1 min, se lavó con PBS, se bloquearon con SFB al 1 % por 30 min, se colocó el anticuerpo primario anti GRA3 1:10 (donado por la doctora Dominique Soldati Favre de la Facultad de Medicina de la Universidad de Ginebra) toda la noche a 4 °C, se lavó con PBS, se colocó el anticuerpo secundario chivo anti-ratón acoplado a TRIT-C (Jackson Immune Research) 1:200 por 1 h a TA, se lavó con PBS, se tiñó con lectina de *DBA* acoplada a FITC, se lavaron con PBS y por último se incubaron por 20 min con DAPI 1 µg/ml (Molecular Probes, Oregon, USA, H21492) y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010) en portaobjetos de vidrio.

#### **6.15 Inmunofluorescencia de GAP45**

Después de los tiempos de proliferación antes indicados, las células infectadas con taquizoítos pre-tratados con el AMF se fijaron con PAF al 4 %, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5 % 5 min, se lavó con PBS,

se bloquearon con SFB al 1 % por 30 min, se colocó el anticuerpo primario anti GAP45 1:1000 (donado por la Dra. D. Soldati) toda la noche a 4 °C, se lavó con PBS, se colocó el anticuerpo secundario chivo anti-conejo acoplado a TRIT-C (Jackson Immune Research) 1:200 por 1 h a TA, se lavó con PBS, se tiñó con lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC, se lavaron con PBS y por último se incubaron por 20 min con DAPI 1 µg/ml (Molecular Probes, Oregon, USA, H21492) y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA 94010) en portaobjetos de vidrio.

### **6.16 Purificación de quistes cerebrales de la cepa ME49 a partir de ratones infectados**

Los quistes se obtuvieron de cerebros de ratones C57BL6 previamente infectados por vía oral con aproximadamente 40 quistes. Los ratones se sacrificaron de 6 a 8 semanas después de la infección mediante dislocación cervical y se extrajo el cerebro. Este se macero en 2 ml de PBS empleando un homogeneizador de vidrio. La suspensión de tejido cerebral con quistes se filtraron empleando una gaza doble para eliminar pedazos grandes de materia, el filtrado se centrifugó a 150 g por 5 min, se desechó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en PBS. Posteriormente se colocaron pequeñas alícuotas de la suspensión en una caja Petri de vidrio y empleando un microscopio estereoscópico y una pipeta Pasteur se aislaron los quistes y se colocaron en un tubo eppendorf con 500 µl de MEM. Todo el procedimiento se realizó en esterilidad y con las medidas de bioseguridad correspondientes. Todo el tejido infectado así como los quistes purificados que no se utilizaron, se neutralizaron mediante adición de hipoclorito de sodio al 5 % en agua.

### **6.17 Microscopia electrónica de transmisión (MET) de quistes tisulares de cepa ME49**

Los quistes purificados se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % por 2 h, se lavaron con PBS por centrifugación a 150 g por 10 min. Luego se post-fijaron con OsO<sub>4</sub> al 1 % en PBS a 4 °C y a TA por 1 h respectivamente, las muestras se lavaron nuevamente y se deshidrataron con

concentraciones crecientes de etanol desde 50 hasta 100 % por 15 min en cada concentración, el etanol a 100 % se repitió tres veces a TA y en agitación. Posteriormente, las muestras se infiltraron gradualmente en una mezcla de resina Spurr-etanol absoluto (1:1), 2 h a TA, después se colocaron en un mezcla resina Spurr-etanol (3:1), 2 h a TA y finalmente se realizaron tres cambios de resina pura cada una con incubación de 2 h a TA en agitación y en la última las muestras se colocaron en moldes de polimerización y se mantuvieron a 60 °C por 48 h. Con los bloques obtenidos se realizaron cortes finos en el ultramicrotomo Reichert Jung (Austria), que se colectaron en rejillas de cobre de 100 hoyos y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo saturados. Finalmente se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (MET), JEM 1400 (JEOL, LTD, Japan).

#### **6.18 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Los quistes purificados se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % por 2 h, se lavaron con PBS, se post-fijaron con OsO<sub>4</sub> al 1 % en PBS a 4 °C y a TA por 1 h respectivamente. Las muestras se lavaron nuevamente y se deshidrataron a concentraciones crecientes de etanol desde 50 hasta 100 % por 15 min en cada concentración. El etanol al 100 % se repitió tres veces a TA y en agitación. Se realizó el secado al punto crítico con CO<sub>2</sub> en un equipo Samdry- 780 A (Tousimis Research, Rockville, MD). Después fueron pulverizadas con oro en un Denton Vacuum Desk II (Denton Vacuum, Morestown, NJ). Para determinar la organización de intravacuolar de los parásitos, la pared quística y la membrana plasmática de las células infectadas se eliminó por desprendimiento mecánico (Muñiz-Hernández et al., 2011). Las muestras fueron analizadas en el equipo SEM JSM-6510-LV (Jeol LTD, Japón).

#### **6.19 Expresión diferencial de proteínas durante el proceso de diferenciación**

Con la finalidad de determinar el cambio en la expresión de proteínas durante el proceso de diferenciación de estadios del parásito, se procesaron extractos totales de taquizoítos y de quistes inducidos *in vitro* a diferentes tiempos (10 y 15

días), los cuales se analizaron en geles bidimensionales y western blot respectivo contra SAG1 y BAG1 que son proteínas específicas de taquizoíto y bradizoíto respectivamente.

Se purificaron quistes inducidos con el fármaco AMF, se infectaron células HEp-2 con taquizoítos pre-tratados con 50 µg/ml AMF por 4 h a 37 °C y se mantuvieron para su proliferación y diferenciación en MEM 8 % FBS por 10 y 15 días. Después de cada tiempo las estructuras tipo quísticas fueron fácilmente identificadas, se purificaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico y con una micro pipeta fueron transferidos a un tubo eppendorf con MEM.

Para el análisis de isoelectroenfoque las muestras de estructuras quísticas fueron lisadas en el buffer de lisis (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % Chaps, 60 mM DTT, ampholites buffer pH 3-10 L at 2 % (GE Healthcare Bio-Sciences, AB, Uppsala, Sweden)). Posteriormente las proteínas fueron precipitadas con acetona toda la noche a -20 °C. La muestra fue centrifugada a 16,000 g por 15 min a 4 °C.

Después de repetidos pasos de precipitación-solubilización, en el paso final la muestra se precipitó de nuevo con una mezcla de metanol-cloroformo. Las proteínas fueron disueltas en el buffer de lisis y se cuantificaron por el método de Bradford. Para realizar el isoelectroenfoque se aplicaron 120 µg de proteína bajo las siguientes condiciones reductoras:

- Urea 7 M
- Thiourea 2 M
- Chaps 4 %
- DTT 60 mM
- Buffer pH 3-10 (lineal para tiras de 7 cm) 2 %

El volumen final se ajustó a 125 µl con solución de rehidratación (urea 7 M, thiourea 2 M, chaps 4 %, azul de bromofenol)

La muestra se colocó en medio del carril de la placa y sobre la muestras se puso la tira de modo que el gel quedó en contacto con la muestra y sin burbujas. Se agregó 1 ml de aceite mineral, se niveló la placa, se tapó y se hidrató a TA por 14 h. Una vez transcurrido este tiempo, se colocó a cada puente 10 µl de agua nanopura y se colocó en cada electrodo de la placa para isoelectroenfoque, se

colocó la tira con el gel hacia abajo en la placa de corrimiento, se agregó 1 ml de aceite mineral, se tapó y se corrió bajo las siguientes condiciones:

- Step 01, 250 V, Ramp: L, Time: 00:20
- Step 02, 4000 V, Ramp: L; Time: 02:00
- Step 03, 4000 V, Ramp: R, Vhour: 10000

Al término del isoelectroenfoque la tira se colocó en una probeta de 10 ml con 5 ml de buffer de equilibrio (urea 6 M, Tris pH 8.8 50 mM, glicerol 30 %, SDS 2 %, azul de bromofenol) y DTT 1 % y se agitó por 15 min. Se cambió la tira a una probeta de 10 ml con 5 ml de buffer de equilibrio más iodoacetamida (IAA) 2.5 % y se agitó durante 15 min, se lavó con 1 ml de agua MilliQ.

Para la segunda dimensión, se colocó la tira en un gel de PAGE al 12 % de poliacrilamida, se cubrió con agarosa, se colocó antioxidantes 0.03 % en el buffer de corrimiento que estuvo en contacto con el gel y se corrió a 80 V por 4-5 h. El gel se tiñó con azul de commassie (Ver apéndice 12.4) y se obtuvieron los PM y pl de los spots que modificaron su expresión en los geles de los extractos de quistes obtenidos de 10 y 15 días comparados con el perfil del extracto de taquizoítos mediante el uso de software ImageMaster 2D Platinum 6.0. Una vez obtenidos estos parámetros (PM y pl), estos se utilizaron para buscar la probable identidad de las proteínas en la base de datos de Toxodb.com.

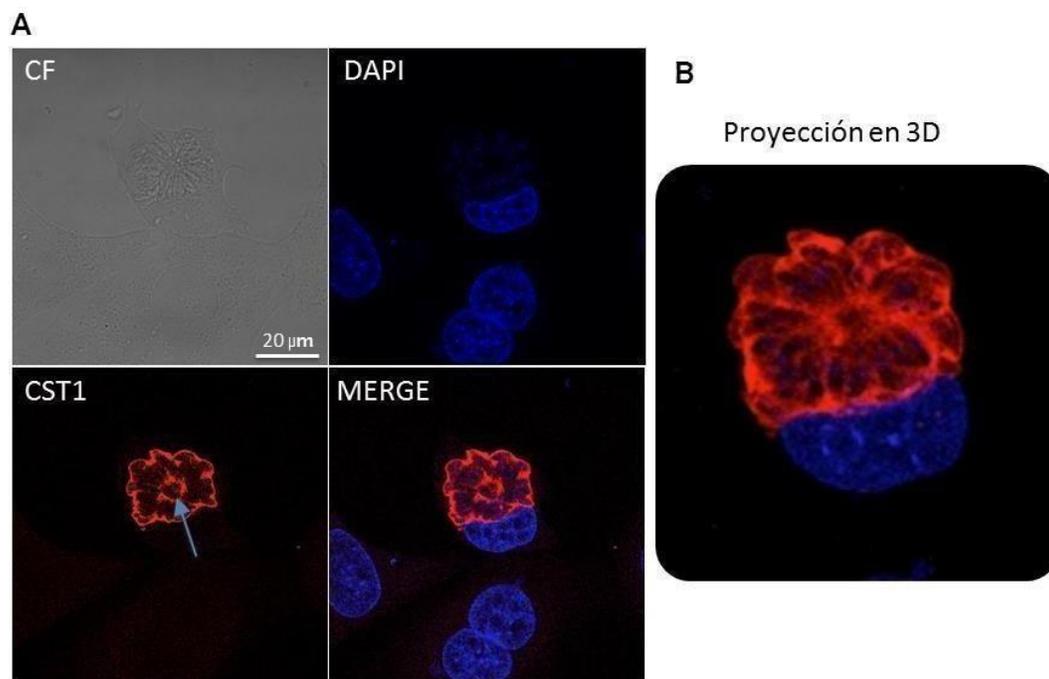
## VII.- Resultados

### 7.1 La exposición de taquizoítos de la cepa RH al ácido micofenólico indujo la conversión de taquizoítos a bradizoítos.

En la tesis de maestría, se estudió el efecto del AMF en células HEp-2 infectadas con taquizoítos de *T. gondii* de alta virulencia de la cepa RH (genotipo I). El tratamiento indujo la expresión en los parásitos intracelulares de la glicoproteína de pared celular CST1 asociada a la membrana de la vacuola parasitófora. Debido a la posibilidad de que el AMF estuviera afectando tanto a la IMPDH de la célula hospedera como a la del parásito, se decidió modificar la estrategia, exponiendo sólo a los taquizoítos extracelulares al AMF, lavarlos y posteriormente llevar a cabo la invasión de las células HEp-2 en ausencia del fármaco. La conversión de taquizoíto a bradizoíto mediante la detección de CST1 a diferentes tiempos, durante la proliferación intracelular de los parásitos. Estas condiciones efectivamente lograron inducir la diferenciación de los parásitos intracelulares con la expresión de la CST1 asociada a la membrana de la VP (Figura 11) sugiriendo que el fármaco inhibió a la TgIMPDH y esto activó de alguna forma el proceso de diferenciación de los parásitos. En este sentido, al inicio del doctorado, se optimizaron las condiciones para la inducción de la cistogénesis por exposición al AMF así como el marcaje de manera reproducible de la glicoproteína de quiste CST1 detectada con la lectina de *D. biflorus* ya sea marcada con TRITC o con FITC. Este fenómeno no se observó cuando se incubaron los parásitos solo en presencia de PBS o con el vehículo del fármaco (DMSO) (K. N. Castro, 2013). Al exponer solo a los parásitos al inhibidor AMF, no se afectó la viabilidad, morfología y capacidad proliferativa de las células hospederas.

Los patrones de distribución de la CST1 en los quistes inducidos *in vitro* por exposición al AMF, consistieron en un marcaje asociado a la membrana de la VP así como, a una estructura conocida como cuerpo residual, el cual se ha propuesto como resultado de un proceso de secreción de los parásitos intravacuolares. Este cuerpo residual está en el centro de la roseta de proliferación (Muñiz-Hernández et al., 2011) (Figura 11A, flecha de color azul).

La figura 11B representa la imagen del apilamiento de todos los cortes ópticos obtenidos en el microscopio confocal. En células que contienen taquizoítos en proliferación, habitualmente la VP se asocia al núcleo de la célula hospedera desde la primera hora de invasión (Muñiz Hernández, 2009). Como se puede ver en la figura 11B la asociación de la VP positiva a la CST1 no modificó su asociación con el núcleo de la célula hospedera y tampoco alteró aparentemente a este tiempo, el arreglo de roseta de los parásitos en proliferación. Bajo estas condiciones las VP's generadas mostraron un 45% de positividad a la expresión de la CST1.

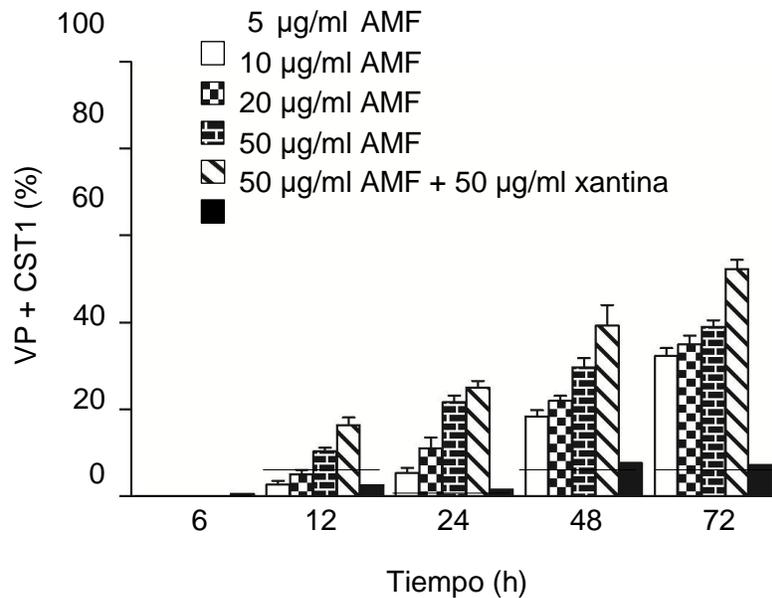


**Figura 11. La exposición de taquizoítos extracelulares al ácido microfenólico 50 μg/ml indujo la expresión de CST1 durante su proliferación en células HEp-2.** A) Contraste de fase (CF), Rojo: CST1 marcado con Lectina *D. biflorus*-TRITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Merge indica la presentación de DAPI y de CST1 en la misma imagen, la flecha de color azul indica el cuerpo residual, B) Representa la proyección en 3D de la imagen. Estas imágenes son representativas a 8 experimentos independientes. Las imágenes corresponden a 48 h de incubación.

El ácido micofenólico es un potente inmunosupresor que bloquea la síntesis *de novo* de purinas al inhibir a la IMPDH, por lo tanto disminuye la capacidad

proliferativa del parásito, su actividad es dosis dependiente (Figura 12).

El AMF se ha utilizado comúnmente como un método de selección en las estrategias de modificaciones genéticas de las cepas de *Toxoplasma* (Donald et al.) Sin embargo, no hay informes de que el tratamiento con este fármaco induzca la diferenciación del parásito, hasta el momento. La posible explicación es que, durante la selección de las cepas modificadas, el medio de cultivo comúnmente se suplementa con xantina, un sustrato de la enzima HXGPRT involucrada en la ruta salvaje para la biosíntesis de GMP (monofosfato de guanosina), una molécula necesaria para la división celular. Su presencia evitaría que los parásitos entren en estrés metabólico incluso en presencia de AMF (Rommereim et al., 2013). El tratamiento con AMF en ausencia de xantina, inhibiría las dos rutas de biosíntesis de purinas, causando así el estrés necesario para desencadenar la diferenciación del parásito como se observó en nuestros resultados. Con la finalidad de demostrar por qué otros investigadores no se han percatado de que el AMF dispara el proceso de enquistamiento del parásito, realizamos este experimento basándonos en lo ya reportado, donde se utiliza este fármaco con el objetivo de generar cepas genéticamente modificadas, en la cual se añade al medio de cultivo xantina (50 µg/ml). Los resultados mostraron que se produjo aproximadamente el 7 % de VP's después de las 72 h de proliferación después de haber inducido el proceso de diferenciación, en contraste con una frecuencia superior al 50 % de la VP's en las muestras que fueron incubadas el mismo tiempo después del tratamiento con el AMF pero en ausencia de xantina en el medio de cultivo (Figura 12). Estos resultados indican que la xantina probablemente sirvió como sustrato para la ruta metabólica alterna en la biosíntesis de purinas, protegiendo así al parásito de entrar en un proceso de estrés y por lo tanto en el fenómeno de diferenciación. Esta baja frecuencia fue similar a la observada en los parásitos control incubados solo con MEM o DMSO, este porcentaje indica el número de VP's diferenciadas de manera espontánea. Estos resultados sugieren que la inhibición de la enzima TgIMPDPH por el tratamiento con AMF fue probablemente en evento molecular implicado en la diferenciación del parásito.



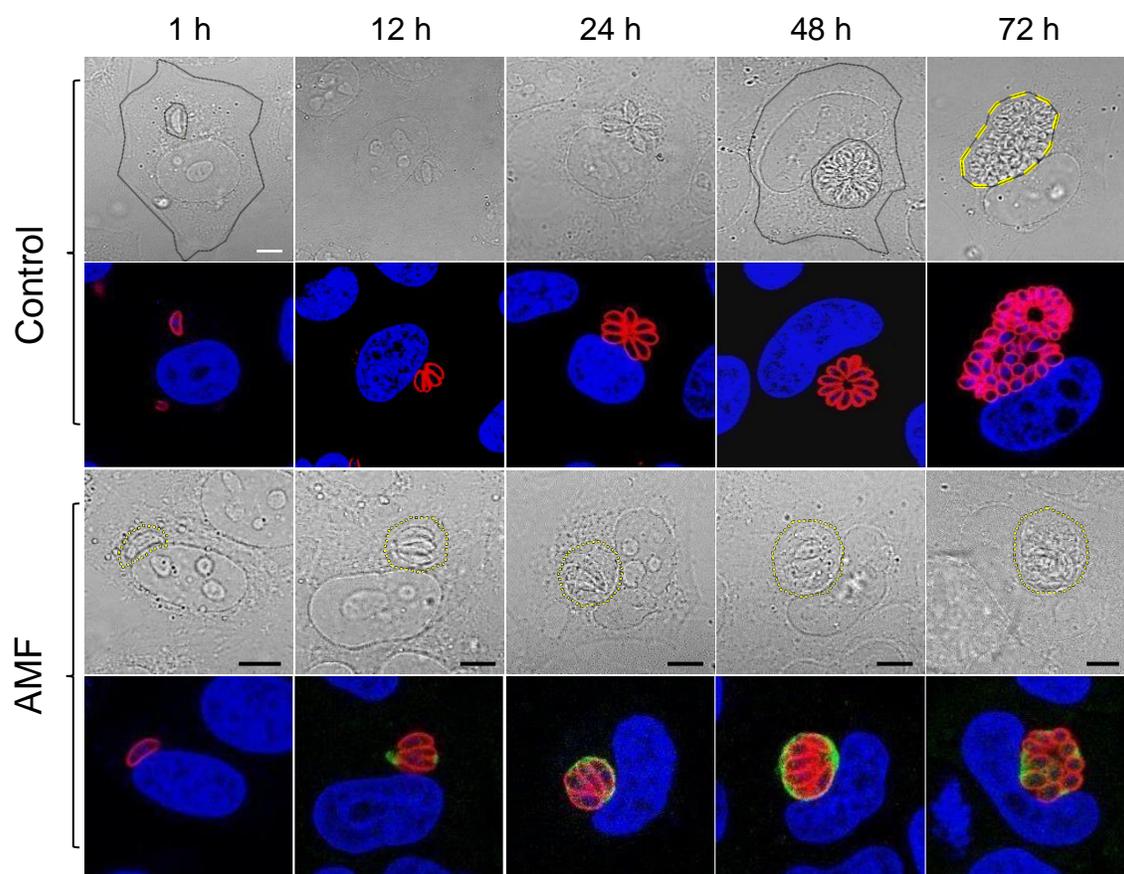
**Figura 12. Porcentaje de VP positivas a CST1 a diferentes tiempos de proliferación y concentraciones de AMF.** Se infectaron células HEp-2 con taquizoítos pre-tratados con el AMF y se incubaron a diferentes tiempos de proliferación en medio MEM suplementando con 8 % de SFB, en un ensayo independiente se adicionó en el medio de cultivo xantina 50 µg/ml durante todo el tiempo de incubación. n = 3.

## 7.2 Cambios en la distribución de los parásitos durante el proceso de diferenciación

Uno de las primeras señales que indicaron que el tratamiento con el AMF sobre los parásitos inducía el proceso de diferenciación hacia el estadio de bradizoíto y formación de una estructura tipo quiste, fue el cambio en la organización de los parásitos dentro de la VP. Con la finalidad de determinar paso a paso estos cambios, se realizó un marcaje de la proteína GAP45 (la cual está presente en el Complejo Membranal Interno (CMI), cuya detección nos mostraría la ubicación específica de cada parásito y así poder analizar la organización de los mismos.

Los resultados mostraron que desde la primera hora de proliferación de los taquizoítos, los cuales serían nuestros controles, la VP se asocia al núcleo de la célula hospedera, a las 12 h se puede observar a los taquizoítos organizados en forma de racimo de bananas y para las 24 h ya se encuentran en forma de rosetas anclados por la parte posterior al cuerpo residual, misma que se mantiene a las 48 h. Para las 72 h ya no se presenta una organización definida

ya que el parásito ha tenido tantos ciclos de reproducción que el espacio intravacuolar es muy delimitado (Figura 13, control). Durante el proceso de diferenciación del taquizoíto se puede observar por contraste de fase que la célula hospedera desde las 24 h de proliferación del parásito, empieza a tomar una forma redondeada, comienza a perder su forma fibroblastoide y a separarse de las células vecinas. Por otra parte, cuando se analizó la distribución de los parásitos tratados con AMF, se observó que a 1 y 12 h la distribución de estos y el marcaje de GAP45 eran igual con respecto al control y desde las 12 h se detecta la expresión de la glicoproteína CST1 en el cuerpo residual. A las 24 y 48 h de proliferación después de haber realizado el tratamiento con el AMF los parásitos exhiben una modificación en la organización intravacuolar con la ausencia de rosetas, se observan en forma de racimos y con una asincronía en la proliferación. Sin embargo algo que no se ve modificado aún después del tratamiento es la relación de la VP con el núcleo del hospedero, incluso hasta las 72 h (Figura 13, AMF).

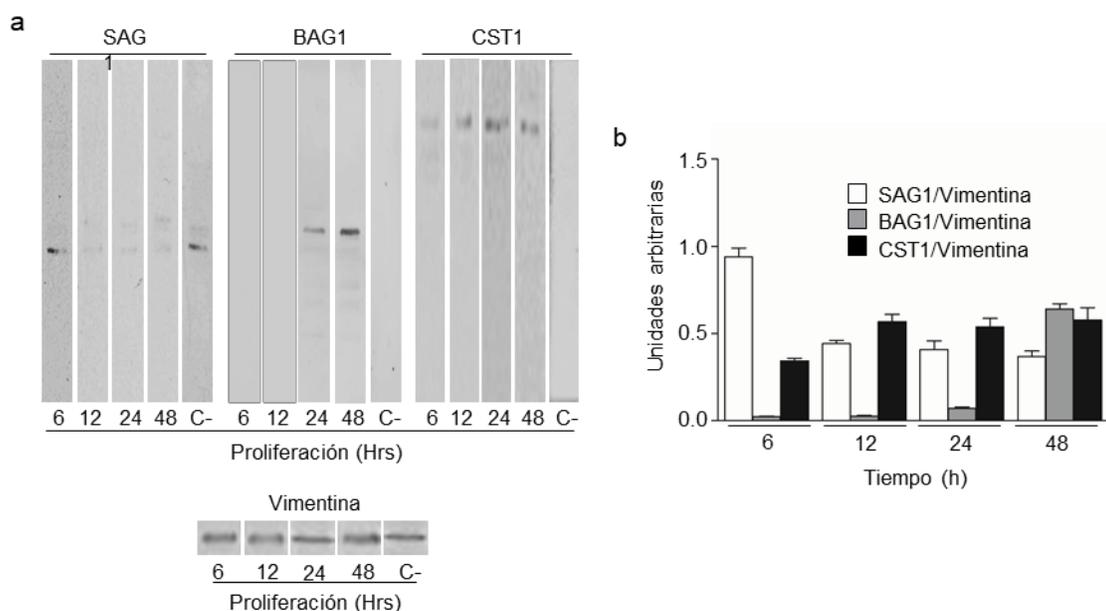


**Figura 13. Distribución de los taquizoítos durante su proliferación y diferenciación en células HEp-2 marcando la proteína GAP45.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: GAP45, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. En línea de color blanco interrumpida se delimita la célula infectada y en amarillo la membrana de la VP. n= 3. Escala = 5  $\mu$ m.

### 7.3 Expresión diferencial de moléculas durante la diferenciación inducida con AMF

Con la finalidad de determinar los cambios en la expresión de proteínas durante el proceso de diferenciación del parásito se analizó la expresión de las moléculas SAG1 específica del taquizoíto, BAG1 del bradizoíto y de la glicoproteína CST1 específica de la pared del quiste tisular durante el proceso de diferenciación de estadios inducido por el tratamiento con AMF mediante Western blot. Como se puede observar en la figura 14, la proteína SAG1 fue claramente detectada a las 6 h, pero fue disminuyendo su expresión con respecto al tiempo. En contraste, CST1 fue detectada desde las 12 h de proliferación después de haber inducido el proceso de enquistamiento, mientras

que la proteína BAG1 inició su expresión después de las 24 h. Interesantemente a las 24 h de proliferación después del tratamiento con el fármaco se observó una co-expresión de SAG1, BAG1 y CST1, lo cual sugiere la existencia de un estadio intermedio durante el proceso de diferenciación del parásito. Por otro lado, en los controles negativos en donde no se realizó el tratamiento con el AMF no se detectó expresión de BAG1 ni de CST1. Como control de carga se utilizó vimentina, la cual también sirvió para normalizar los datos obtenidos en el análisis densitométrico (Figura 14b).



**Figura 14. Detección de SAG1, BAG1 y CST1 durante el proceso de diferenciación del parásito.** **a.** Western blots de extractos totales de células HEp-2 invadidas con taquizoítos extracelulares pre-tratados con 50 µg/ml AMF y mantenidos en proliferación a diferentes tiempos. El control negativo donde no se expusieron los parásitos al AMF está representado con C-. La expresión de vimentina se utilizó como control de carga. **b.** Análisis densitométrico de la expresión de SAG1, BAG1 y CST1 determinados a partir del western blot; los valores están representados en unidades arbitrarias.

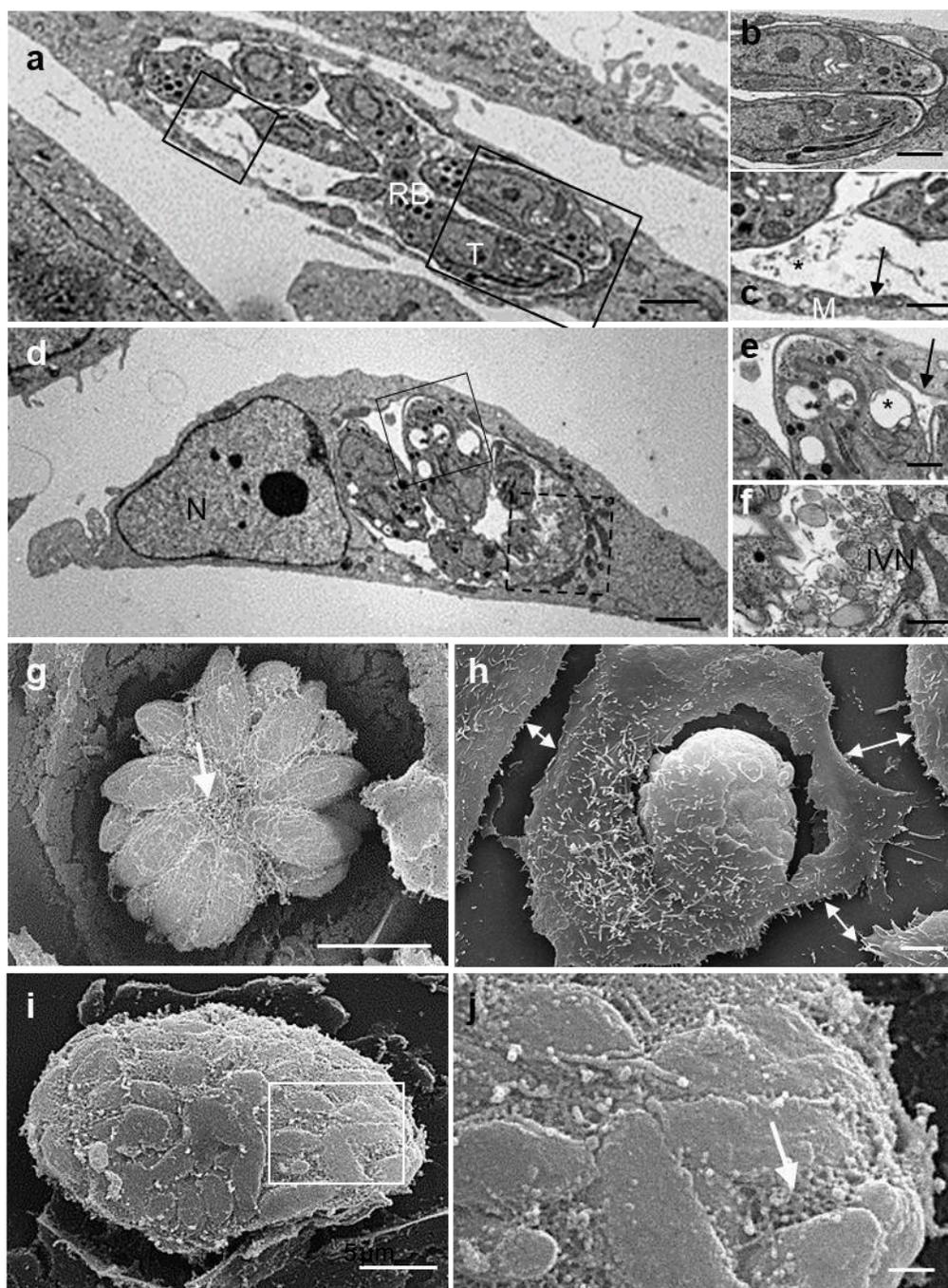
#### 7.4 Modificaciones morfológicas en la célula hospedera y en la VP durante el proceso de diferenciación del parásito inducido por AMF

Con la finalidad de determinar los cambios en la célula hospedera así como en

los parásitos y en la VP durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos como resultado del tratamiento con el AMF, se analizaron las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Como controles se procesaron células infectadas con taquizoítos no tratados, los parásitos intracelulares presentan las características morfológicas típicas, su organización en roseta unido por la estructura denominada cuerpo residual, la asociación de las mitocondrias del hospedero a la membrana de la VP, así como la presencia de la red vesículo tubular distribuida en todo el espacio intravacuolar y alrededor de los taquizoítos (Figura 15a-c). En contraste cuando se invaden células con parásitos previamente tratados con AMF y se mantienen en proliferación por 48 h a 37 °C en MEM suplementado con 8 % SFB, se observa primeramente una separación de la célula infectada con parásitos en proceso de conversión a bradizoítos, de las células vecinas. Estas células empezaron a adquirir una forma más redondeada, perdiendo su forma fibroblastoide característica. Durante estas modificaciones la VP siempre permanece asociada al núcleo y a las mitocondrias del hospedero. En cuanto a los parásitos dentro de la VP, pierden la organización en forma de roseta, además muestran numerosas vesículas citosolicas similares a los gránulos de amilopectina presentes en el estadio de bradizoíto (Dzierszinski et al., 2004). Interesantemente en el espacio intravacuolar la red vesículo tubular aparece condensada y polarizada en una zona de la VP, y asociada a numerosas vacuolas y túbulos finos, quedando unas pocas estructuras en el resto del espacio intravacuolar.

Cuando se analizaron las células infectadas con taquizoítos previamente tratados con el fármaco mediante microscopia electrónica de barrido mostraron retracción progresiva de la célula invadida con la presencia de una estructura esferoideal de aproximadamente 20-30  $\mu\text{m}$ , la cual tenía una apariencia similar a la de un quiste tisular. Con la finalidad de observar el interior de estas estructuras se desprendió la membrana apical (técnica de Tanaka), evidenciando que en las células control infectadas con taquizoítos e incubadas durante 48 h para su proliferación, los parásitos presentaban una organización en roseta rodeados por la red vesículo tubular, como se había reportado anteriormente (Muñiz- Hernández et al., 2011). En células invadidas con

parásitos previamente expuestos al fármaco AMF y mantenidas en proliferación durante 48 horas, los parásitos se encontraban estrechamente unidos formando una estructura ovoide compacta. La típica red vesículo tubular no fue detectada en su lugar se encontró un material fibroso granular y denso distribuido a lo largo del conglomerado de parásitos.

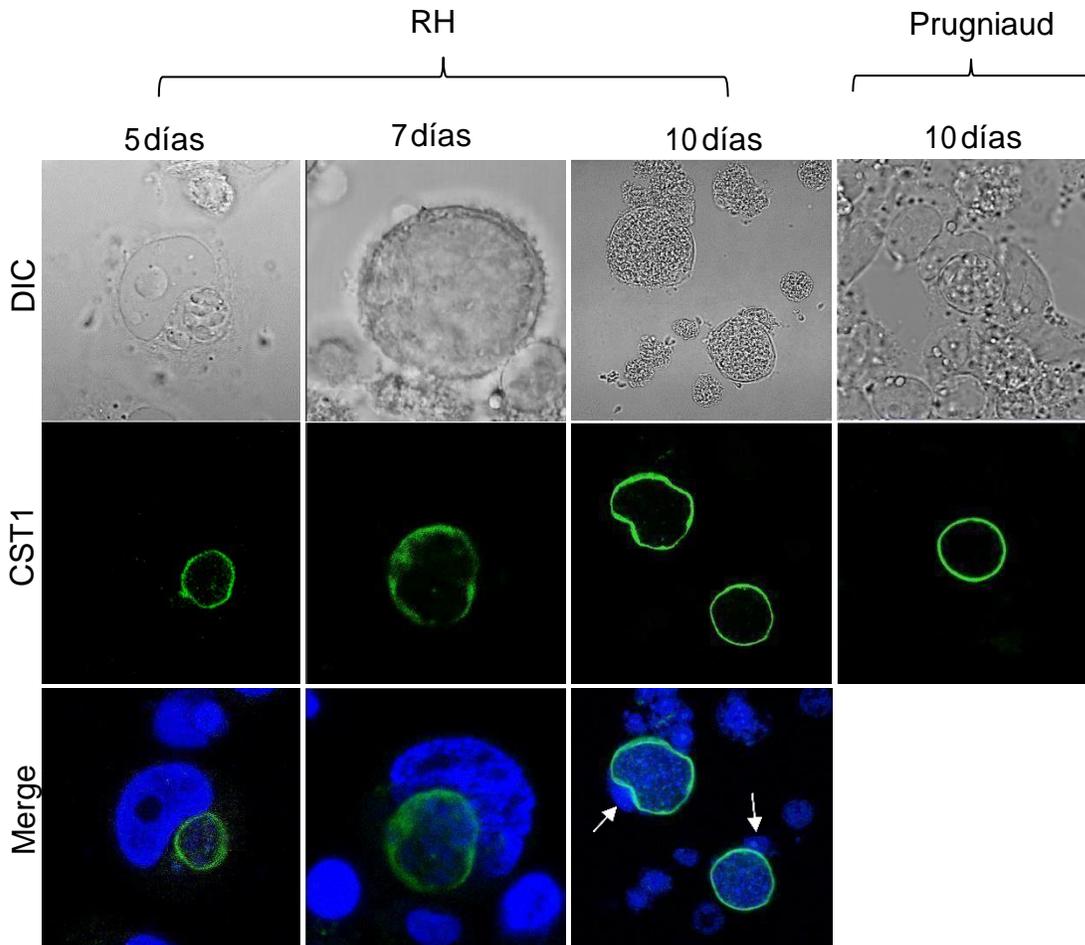


**Figura 15. Ultra estructura de células durante la proliferación del taquizoíta y el proceso de diferenciación del parásito inducido por el AMF.** Los incisos a-f corresponden a micrografías de TEM de baja y alta amplificación. a-c. Células HEp2 invadidas con taquizoítos y mantenidas por 48 h en proliferación. d-f. Células invadidas con taquizoítos tratados previo a la invasión y mantenidas por 48 h en proliferación. N, núcleo; M, mitocondria; IVN, red vesículo tubular. Escala en a y d = 2  $\mu$ m; en b, c, e y f = 1  $\mu$ m. (K. N. Castro, 2013). El inciso **g** corresponde a micrografías de SEM de células invadidas con taquizoítos y en los incisos **h-j** se observan células HEp2 invadidas con taquizoítos tratados con el fármaco de manera

extracelular con 50 µg/ml MPA, todas procesadas después de 48 h de proliferación. La membrana apical y la de la VP fueron eliminadas como se indica en materiales y métodos con la finalidad de ver el interior de la VP. Los cuadros indican las zonas amplificadas. Las flechas indican la red intravacuolar. Escala en g-i = 5 µm y en j = 1 µm.

Con la finalidad de extender la caracterización morfológica de las estructuras tipo quísticas, las células invadidas con parásitos tratados con AMF se mantuvieron en condiciones de cultivo por 5, 7 y 10 días a 37 °C en MEM con 8 % SFB. A estos días de maduración, no se detectaron células hospederas intactas, en su mayoría se encontraron restos celulares y eventualmente estructuras similares a quistes incrustadas en este material. Las estructuras parecidas a quistes positivas a CST1, presentaron una forma esférica (Figura 16) en comparación con las VP's positivas para CST1 de parásitos en proliferación por solo 48 horas. A los 10 días la mayoría de estas estructuras tipo quísticas se encontraban libres en el medio extracelular y se encontraban asentadas en el fondo de la caja Petri (Figura 16 DIC). Era frecuente encontrar restos de núcleos de las células lisadas aun anclados a estos pre-quistes, sin embargo la mayoría de los organelos citosólicos estaban ausentes (Figura 16, 10 días, flechas). La lisis de las células hospederas podría ser por diferentes motivos, por ejemplo por la exteriorización de los taquizoítos que no se diferenciaron, por envejecimiento del cultivo celular después de 10 días de crecimiento o por la alteración fisiológica de la célula hospedera debido a la formación del quiste.

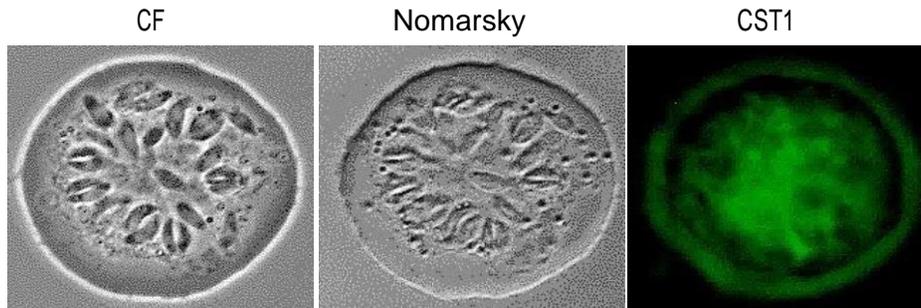
Como un control de que las estructuras pre-quísticas que nosotros estábamos obteniendo mediante el tratamiento con el fármaco AMF, se indujeron quistes de la cepa Prugniaud, tipo II, la cual está clasificada con una cepa formadora de quiste, mediante su mantenimiento en cultivo con pH alcalino. Como resultado se puede observar en la figura 16 (Prugniaud, 10 días) que las estructuras obtenidas con ambas técnicas se asemejan, lo que sugiere que las estructuras esferoidales observadas fueron estructuras quísticas en maduración.



**Figura 16. Morfología de estructuras tipo quísticas a los 5, 7 y 10 días de proliferación después de haber invadido las células con taquizoítos pre-tratados con AMF.** DIC y micrografías de confocal de estructuras tipo quísticas inducidas mediante el tratamiento de taquizoítos de la cepa RH con 50  $\mu\text{g/ml}$  de AMF y su comparación con quistes obtenidos mediante el tratamiento de taquizoítos de la cepa Prugniaud con pH alcalino de 8.2. CST1 fue detectada mediante la tinción con la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC, el núcleo fue teñido con DAPI. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

Las estructuras esféricas a los 10 días se depositaban en el fondo de la caja Petri, después de este tiempo se purificaron con la ayuda de una micropipeta y un estéreo-microscopio para ser analizados mediante microscopia de campo claro y epifluorescencia. Como se observa en la figura 17, estas estructuras son completamente esféricas de unos 25  $\mu\text{m}$  de diámetro conteniendo numerosos parásitos además de ser positivas a la tinción de CST1, la cual es específica de la pared del quiste tisular, lo cual demuestra que las estructuras que estamos

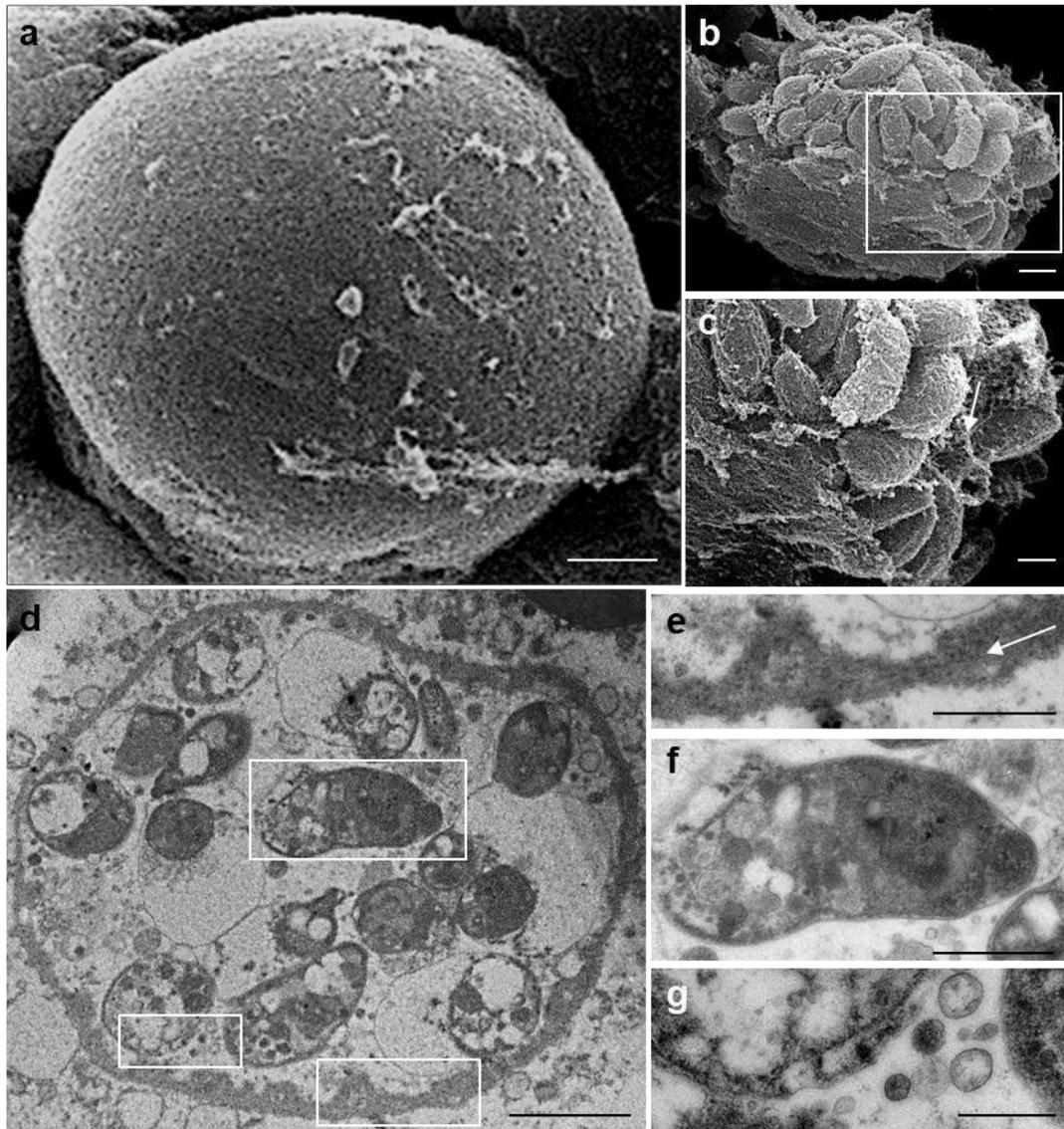
obteniendo *in vitro* son quistes de la cepa RH, dado que estas características son similares a la de los quistes obtenidos de cepas como la ME49 en el modelo murino.



**Figura 17. Morfología de una pre-quiste obtenido mediante el tratamiento de taquizoítos extracelulares con AMF.** Imágenes de contraste de fase, Nomarsky y epifluorescencia de un quiste aislado a los 10 días de maduración. CST1 teñida con la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC. Escala = 5  $\mu\text{m}$ .

Estas mismas estructuras se procesaron para microscopía electrónica con la finalidad de analizar con más detalle la ultra-estructura de las mismas. El análisis por SEM mostró estructuras esféricas de aproximadamente 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro, teniendo una superficie homogénea con pocos materiales remanentes adheridas a ella (Figura 18a). Cuando la capa apical de los pre-quistes se separó, se observaron numerosos parásitos empaquetados y rodeados por una matriz fibrosa. Estos parásitos se organizaron de esta manera con la finalidad de tener el mayor empaquetamiento posible y así poder estar el mayor número de parásitos en un área menor (Figura 18b). El contenido intraquístico consistió en una matriz granular homogénea carente de la red vesículo tubular (Figura 18c). Cuando estas estructuras fueron procesadas para ultramicrotoma y observadas en el microscopio electrónico de transmisión, era evidente la presencia de una pared gruesa que rodeaba a todos los parásitos de manera similar a la pared de los quistes cerebrales (Figura 18d, e flecha). Estos pre-quistes inducidos con el AMF contenían parásitos con estructuras citosólicas similares a los cuerpos de amilopectina, lo que sugiere su estadio de bradizoíto (Figura 18f). En el espacio intraquístico y cerca de los parásitos se encontraron varias vesículas pequeñas,

probablemente sean componentes que el mismo parásito está secretando (Figura 18g). No se detectaron mitocondrias o cualquier otro organelo de la célula hospedera asociados a la estructura pre-quística.



**Figura 18. Morfología de un quiste de 10 días de maduración, obtenido después del tratamiento de los taquizoítos extracelulares con AMF. a.** Micrografía de SEM de un quiste intacto aislado. **b-c.** Micrografías de SEM de un quiste de 10 días al cual se le eliminó la cara apical con la finalidad de exponer a los parásitos. **d-g.** Micrografías de TEM de secciones de un quiste aislado de 10 días de maduración obtenido *in vitro*. n = 3. Escala en a, b and d = 2  $\mu$ m; c, e y f = 1  $\mu$ m y g = 500 nm.

## 7.5 Análisis de la expresión diferencial de proteínas durante el proceso de enquistamiento del parásito

Para identificar las proteínas que el parásito expresa durante el proceso de la formación *in vitro* de la estructura pre-quística, se realizó un análisis por 2D- PAGE y Wb de extractos totales de taquizoítos y de estructuras pre-quísticas a los 10 y 15 días de proliferación después de la exposición con AMF. En el estadio de taquizoíto, se observó la presencia de un amplio patrón de proteínas, la mayoría de ellas por debajo de los 100 kDa (Figura 19, 2D-PAGE). El resultado de Wb contra la proteína SAG1 en dicho gel de 2D, evidenció la presencia de tres “spots” con el peso molecular esperado, pero con diferente punto isoeléctrico (Figura 19, WB) como se había reportado (Zhou et al., 2005). Con respecto a los geles de 2D de extractos de quistes inducidos *in vitro* en diferentes momentos, mostró que aunque existe un patrón similar de proteínas, hubo algunas proteínas de bajo peso molecular que disminuyen su expresión durante la formación de quistes, mientras que otros comenzaron a aparecer como resultado de la diferenciación del parásito (Figura 20, 2D-PAGE). La presencia de la proteína citosólica del bradizoíto, BAG1 se demostró en el Wb de los geles 2D de las muestras de quistes de 10 y 15 días, como un solo spot en el peso y punto isoeléctrico esperado y con un aumento en su intensidad al día 15 después de la inducción por AMF (Figura 20, WB).

Como parte del análisis realizado de los dos geles de las condiciones de 10 y 15 días de formación del quiste, se compararon las variaciones de intensidad del mismo punto en los 10 o 15 días frente a los taquizoítos no tratados, para determinar si su expresión se incrementó o disminuyó. Seleccionamos 18 proteínas que cambian su expresión, 4 del gel de 10 días (las cuales se marcaron del número del 1 al 4) y 14 del gel de 15 días (las que se marcaron del número 5 al 18). Basándonos en las propiedades de punto isoeléctrico y peso molecular experimentales de los puntos seleccionados, buscamos candidatos en la base de datos de Toxodb.org guiándonos en los valores de ambas propiedades y comparándolos con los valores teóricos.

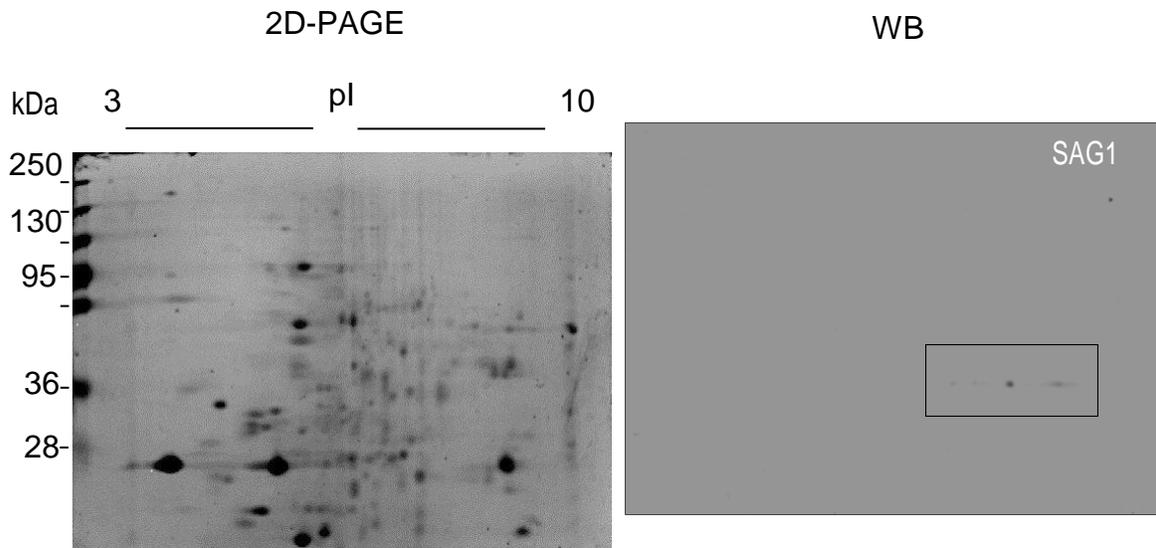
Las proteínas candidatas encontradas (de las cuales su PM y pl está indicado en la tabla 2), que disminuyen su expresión de acuerdo a la maduración de las

estructuras quísticas son las siguientes: 1) la proteína de gránulos densos GRA1, la cual está presente en la VP de taquizoítos, aunque se ha observado una tinción positiva de la misma en la pared del quiste tisular, disminuyendo su expresión comparando con la VP (Ferguson, 2004) 2) una proteína hipotética (TGGT1\_209420), 3) para este spot que reduce su expresión, encontramos tres probables candidatos por su punto isoeléctrico y su peso molecular; la proteína de la subfamilia de la enzima conjugada a ubiquitina; la proteína SRS221 relacionada con una secuencia relacionada a SAG o una ATP sintasa putativa; la expresión de estas proteínas no se han estudiado durante el proceso de enquistamiento hasta el momento, 4) Este punto reduce su expresión y los posibles candidatos son; cuatro proteínas hipotéticas a) TGGT1\_216375, que se alinea con una proteína transmembranal putativa de otras cepas de *Toxoplasma*, pero no muestra dominios conservados; otra proteína hipotética b) TGGT1\_202930 que se alinean con otras proteínas hipotéticas de apicomplexans; c) una proteína arabinogalactan putativa, d) una proteína que contiene dominio de dedo de zinc, tipo C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>. 5) proteína hipotética TGGT1\_272590, que aunque se alinee con otras proteínas hipotéticas, solo exhibió un dominio conservado de función desconocida que se encuentra en bacterias y eucariotas; 6) proteína transmembranal, la cual exhibe una proteína tipo antígeno 1 en la membrana apical; 7) este spot puede contener tres proteínas: a) transportador, principal facilitador de la familia de proteínas, b) una proteína hipotética TGGT1\_220330, que exhibió un dominio de proteínas hipotéticas conservadas (PHA03169) y un dominio CysU que participa en el transporte de iones inorgánicos y el metabolismo, y c) una proteína hipotética TGGT1\_262630, que no exhibió los dominios conservados y se alineó sólo con otras proteínas hipotéticas; 8) tres proteínas candidatas: a) dedo de zinc, tipo C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> (RING finger) y otras dos proteínas hipotéticas b) TGGT1\_262440 y c) TGGT1\_267040, que no exhiben ni los dominios conservados ni se alinean con otras proteínas hipotéticas.

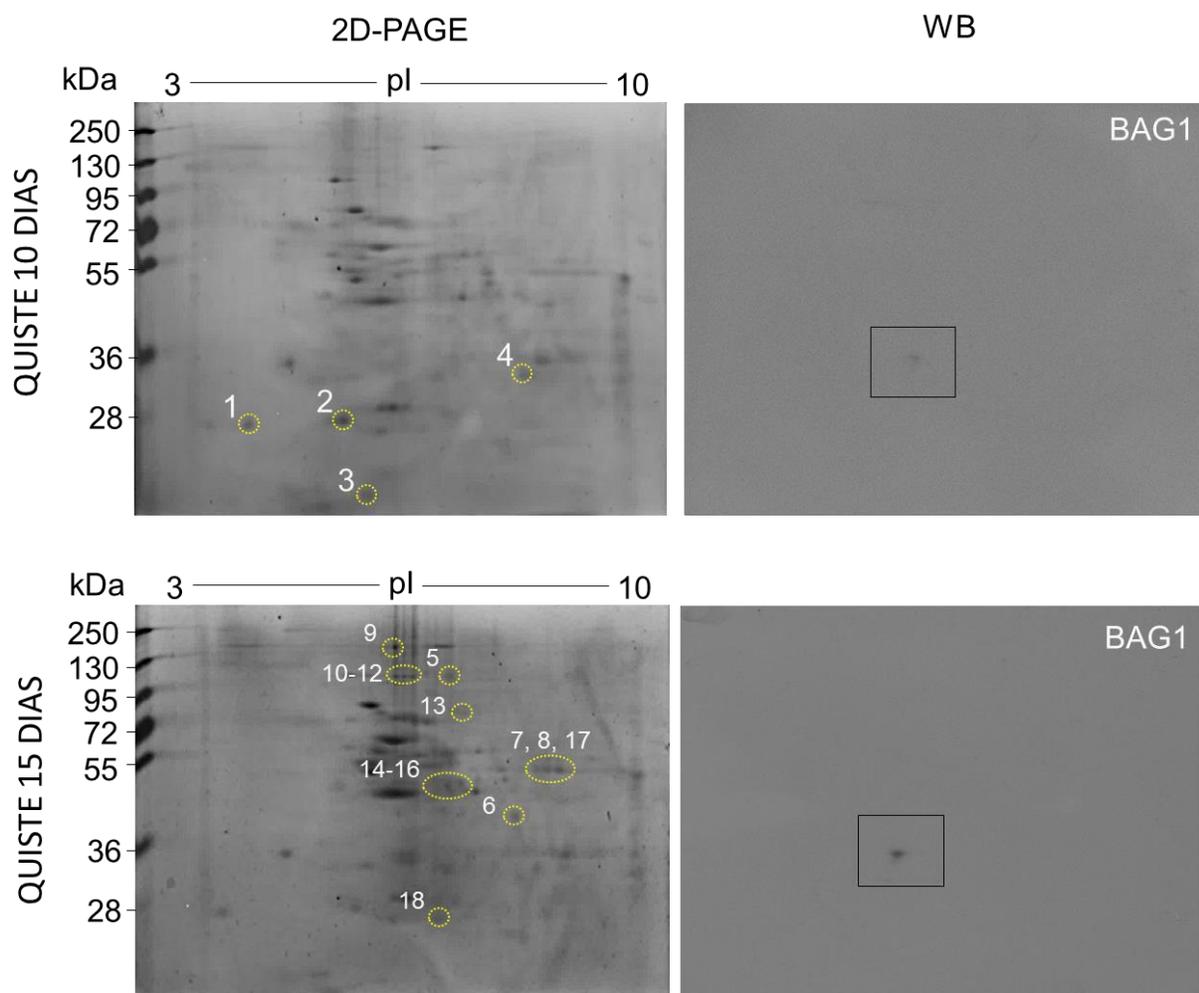
Las proteínas candidatas (las cuales su PM y pl se indican en la Tabla 3), que empiezan y/o incrementan su expresión de acuerdo a la maduración de los quistes son: 1) un spot de alrededor de 6.03 pl y 172 kDa, corresponde a dos

probables candidatos, a) una fosfatasa de la familia de factores que interaccionan con NLI y b) una proteína que contiene un dominio WD que tiene repetidos G-beta; ambas proteínas no han sido estudiadas durante el proceso de enquistamiento hasta el momento; 2) transidrogenasa; 3) enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano 4) pueden ser dos proteínas hipotéticas, a) TGGT1\_239752 la cual tiene un dominio conservado de galactosiltransferasa y b) TGGT1\_234220 proteína que a pesar de que carece de dominios conservados, se alinea con una proteína putativa relacionada con fosfatasas de serina/treonina de otras cepas de *T. gondii* y otros miembros apicomplexans; los spots del 6 al 9 (Tabla 1-2), no se detectaron en los extractos de taquizoítos, probablemente porque estas son proteínas específicas del estadio de bradizoíto o por que se encontraban en una muy baja concentración, como 5) proteínas hipotéticas, a) TGGT1\_234980 la cual no tiene dominios conservados y se alinea con una proteína hipotética transmembranal de otras cepas de *T. gondii* y b) proteína hipotética TGGT1\_294210 (spot 7) la cual se alinea con otras proteínas hipotéticas de apicomplexans y exhibe un dominio spidroin\_MaSp; 6) este spot puede ser las siguientes cuatro proteínas hipotéticas a) TGGT1\_246710 (spot 8) que no tiene dominios conservados y se alinea con una proteína hipotética transmembranal presente en otras cepas de *T. gondii*, b) proteína hipotética TGGT1\_233290; c) TGGT1\_217940 y d) TGGT1\_209560 sin dominios conservados que se alinearon con proteínas hipotéticas principalmente de otras cepas de *T. gondii* u otros apicomplexans; 7) este spot indico dos posibles proteínas, a) una proteína de la familia SNF7 y b) metalo-beta-lactamasa que para DNA; 8) este spot indica tres posibles candidatos, a) una proteína que contiene dominios tioredoxin; b) miristoil CoA:N-miristoiltransferasa y c) una proteína hipotética TGGT1\_244600, la cual no tiene dominios conservados pero se alinea con otras proteínas hipotéticas de otras cepas de *T. gondii*; 9) una proteína que contiene dominios PAN; 10) este spot tiene dos candidatos, a) hidrolasa, proteína de la familia NUDIX, esta familia de proteínas están involucradas en eventos biológicos, como la replicación del DNA, la diferenciación celular, choque térmico, stress metabólico y apoptosis y b) proteína que transfiere glicolípidos GLTP, la cual es una proteína citósolica que cataliza la transferencia intermembrana de glicolípido

Será indispensable el análisis de espectrometría de masas en este tipo de muestras a fin de corroborar esta información.



**Figura 19. Análisis 2D de la expresión de proteínas de extractos totales de tachizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma*.** Panel de la izquierda corresponde al gel de doble dimensión teñido con plata del patrón proteico de tachizoítos y el de la derecha corresponde a un Wb contra la proteína SAG1. n = 3.



**Figura 20. Análisis 2D de la expresión diferencial de proteínas de extractos totales de estructuras pre-quisticas inducidas con el tratamiento de AMF.** Panel de la izquierda corresponde al gel de doble dimensión teñido con plata del patrón proteico quistes de 10 y 15 días de maduración y el de la derecha corresponde a un Wb de un gel de 2D contra la proteína BAG1. Las proteínas que incrementan o disminuyen su expresión con respecto al patrón de proteínas de taquizoítos se delimitan con un ovalo negro puntillado y numerados. n = 3.

No. Spot	Genes probables	Nombre de Proteína	Experimental pI/PM	Teórico pI/PM	Expresión
1	TGGT1_270250	GRA1	3.87/26	3.9/20.15	Disminuye
2	TGGT1_209420	Hypothetical protein	5.36/26	5.36/26.85	Disminuye
3	a) TGGT1_304770	Ubiquitin-conjugating enzyme subfamily protein	5.75/18	5.7/17.622	Disminuye
	b) TGGT1_411250	SAG-related sequence protein SRS22I		5.76/19.122	Disminuye
	c) TGGT1_226000	Putative ATP synthase		5.8/19.457	Disminuye
4	a) TGGT1_216375	Hypothetical protein	8.31/33	8.34/32.238	Disminuye
	b) TGGT1_202930	Hypothetical protein		8.34/32.735	Disminuye
	c) TGGT1_265020	Putative arabinogalactan protein		8.33/33.270	Disminuye
	d) TGGT1_248330	Zinc finger, C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> type (RING finger) domain-containing protein		8.31/33.795	Disminuye
5	TGGT1_272590	Hypothetical protein	6.94/110	6.94/111.07	Disminuye
6	TGGT1_235130	Transmembrane protein	8.38/55	8.38/55.099	Disminuye
7	a) TGGT1_233540	Transporter, major facilitator family protein	8.52/56	8.53/57.913	Disminuye
	b) TGGT1_220330	Hypothetical protein		8.52/59.121	Disminuye
	c) TGGT1_262630	Hypothetical protein		8.52/53.776	Disminuye
8	a) TGGT1_236640	Zinc finger, C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> type (RING finger) domain-containing protein	8.7/55	8.7/55.618	Disminuye
	b) TGGT1_262440	Hypothetical protein		8.67/54.714	Disminuye
	c) TGGT1_267040	Hypothetical protein		8.65/55.007	Disminuye

**Tabla 2. Proteínas que disminuyen su expresión después de haber inducido el enquistamiento con AMF.**

Proteínas candidatas que fueron obtenidas de la base de datos de toxodb.org usando su pI y PM experimental, dato obtenido de los spots seleccionados del análisis de los geles de 2D que disminuían su expresión en las muestras de quistes de 10 y 15 días.

No. Spot	Genes Probables	Nombre de Proteína	Experimental pI/PM	Teórico pI/PM	Expresión
9	a) TGGT1_228330	NLI interacting factor family phosphatase	6.03/172	5.74/173.076	Incrementa
	b) TGGT1_245752	WD domain, G-beta repeat-containing protein		6.34/173.41	Incrementa
10	TGGT1_318650	Transhydrogenase	6.04/110	6.07/108.304	Incrementa
11	TGGT1_316520	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	6.17/110	6.19/109.775	Incrementa
12	a) TGGT1_239752	Hypothetical protein	6.31/110	6.33/102.145	Incrementa
	b) TGGT1_234220	Hypothetical protein		6.37/116.042	Incrementa
13	a) TGGT1_234980	Hypothetical protein	7.39/80	7.38/81.24	Incrementa
	b) TGGT1_294210	Hypothetical protein		7.28/81.626	Incrementa
14	a) TGGT1_246710	Hypothetical protein	6.91/50	6.9/50.061	Incrementa
	b) TGGT1_233290	Hypothetical protein		6.94/50.696	Incrementa
	c) TGGT1_217940	Hypothetical protein		6.92/50.033	Incrementa
	d) TGGT1_209560	Hypothetical protein		6.97/51.37	Incrementa
15	a) TGGT1_248310	SNF7 family protein	7.12/49	7.32/48.998	Incrementa
	b) TGGT1_289670	DNA repair metallo-beta-lactamase		8.54/49.022	Incrementa
16	a) TGGT1_255480	Thioredoxin domain-containing protein	7.37/50	7.34/50.718	Incrementa
	b) TGGT1_209160	Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase		7.33/52.377	Incrementa
	c) TGGT1_244600	Hypothetical protein		7.37/51.558	Incrementa
17	TGGT1_209180	PAN domain-containing protein	7.99/42	8/47.871	Incrementa
	a) TGGT1_214780	Hydrolase, NUDIX family protein	6.69/25	6.52/25.174	Incrementa
18	b) TGGT1_223110	Glycolipid transfer protein GLTP		6.52/25.339	Incrementa

**Tabla 3. Proteínas que incrementan su expresión después de haber inducido el enquistamiento con AMF.**

Proteínas candidatas que fueron obtenidas de la base de datos de toxodb.org usando su pI y PM experimental, dato obtenido de los spots seleccionados del análisis de los geles de 2D que incrementan su expresión en las muestras de quistes de 10 y 15 días.

## **7.6 Modificación de la membrana de la VP durante la proliferación de taquizoítos y el proceso de diferenciación del parásito**

### **7.6.1 Cambios durante la proliferación de taquizoítos**

Desde la primera hora de proliferación del parásito, la VP se sitúa en la zona adyacente al núcleo de la célula hospedera y no se modifica durante el tiempo de proliferación ni durante el proceso de enquistamiento del parásito. Uno de los eventos que ocurre después del proceso de invasión de los taquizoítos es la secreción de proteínas GRA por parte de los organelos secretores denominados como gránulos densos. Algunas proteínas se quedan en el espacio intravacuolar de forma soluble, otras forman parte de la red vesículo tubular mientras que otras se asocian a la membrana de la VP. Una vez secretadas las proteínas de los granulos densos, GRA1, GRA16 y GRA24 pueden ser detectadas en el espacio intravacuolar, GRA2, GRA4, GRA6, GRA9 y GRA12 se asocian preferentemente con la red vesículo tubular, GRA3, GRA5, GRA7, GRA8, GRA14, GRA19, GRA20, GRA21, GRA23 y GRA10, GRA15, GRA22, GRA24 y GRA25 se asocian a la membrana de la VP, mientras que la GRA15, GRA16 y GRA 24 también se dirigen al núcleo de la célula hospedero (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). Una proteína que forma parte de la membrana de la VP es la proteína GRA3, la cual se utilizó como un marcador específico de esa estructura. En el laboratorio ya se tenía un estudio previo en cuanto al análisis de los cambios de la VP durante la proliferación del taquizoíto, pero este estudio se hizo utilizando como marcador a la proteína GRA5 la cual también está presente en dicha membrana, mostrando que la membrana de la VP emite numerosas elongaciones que principalmente van dirigidas hacia el núcleo de la célula hospedero (Muñiz Hernández, 2009), sin embargo este anticuerpo se nos agotó por lo que se utilizó el dirigido contra GRA3.

Los resultados obtenidos con el marcaje de la proteína GRA3 corroboran lo ya estudiado anteriormente en relación a la proliferación del taquizoíto. A las 12 h de proliferación se pudieron observar las prolongaciones de membrana, mismas que se mantuvieron e incrementaron con respecto al tiempo de proliferación del

parásito, incluso al tiempo de 72 h de proliferación del parásito se puede observar una célula infectada con dos núcleos los cuales están completamente rodeados por estas elongaciones (Figura 21, MEM).

### 7.6.2 Cambios durante la diferenciación del taquizoíto

Cuando se evaluaron los cambios de las prolongaciones de membrana de la VP durante el proceso de cigotogénesis inducido por AMF utilizando el marcador de GRA3, se observó que a partir de 12 h de proliferación la expresión de CST1 asociada a la membrana de la VP, en contraste, las prolongaciones de la membrana de la VP que rodeaban al núcleo de la célula hospedera se perdieron, no observándose dichas estructuras. En ninguno de los tiempos posteriores de proliferación se detectaron estas prolongaciones membranales, probablemente para favorecer la biogénesis de la pared quística, ya que esta es la que sirve como template para la nueva estructura. Es interesante ver que en las mismas imágenes (Figura 21, 24 h y 72 h, AMF) se presentan dos VP una positiva a CST1 la cual no tiene las prolongaciones de membrana y otra negativa que todavía conserva estas elongaciones dirigidas principalmente hacia el núcleo del hospedera, lo cual indica que la VP que todavía presenta las prolongaciones de membrana se encuentra en una etapa de diferenciación muchos más temprana que la que ya no presenta las prolongaciones.

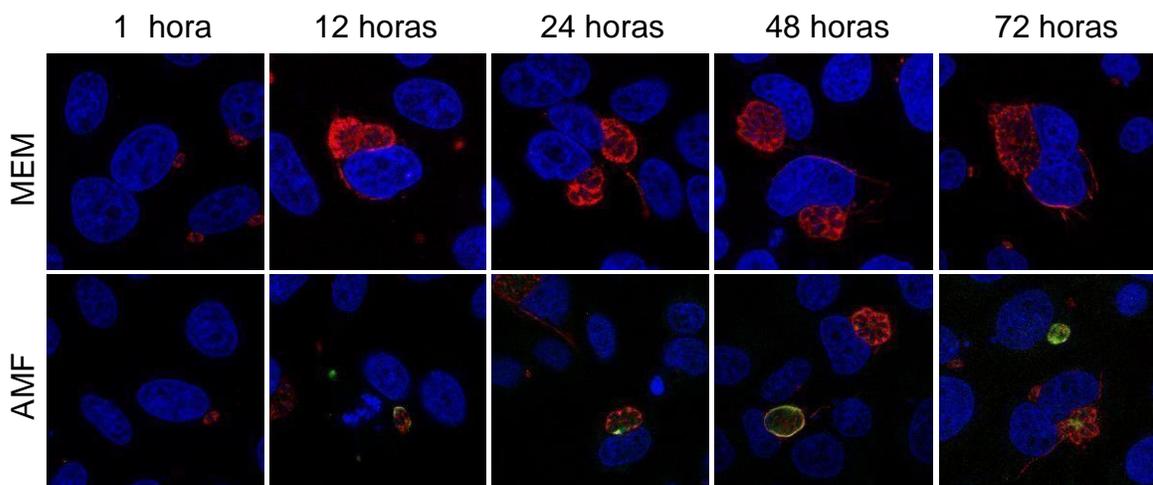


Figura 21. Modificaciones en la membrana de la VP durante la proliferación de los taquizoítos y el proceso de diferenciación en células HEp-2 después del tratamiento con

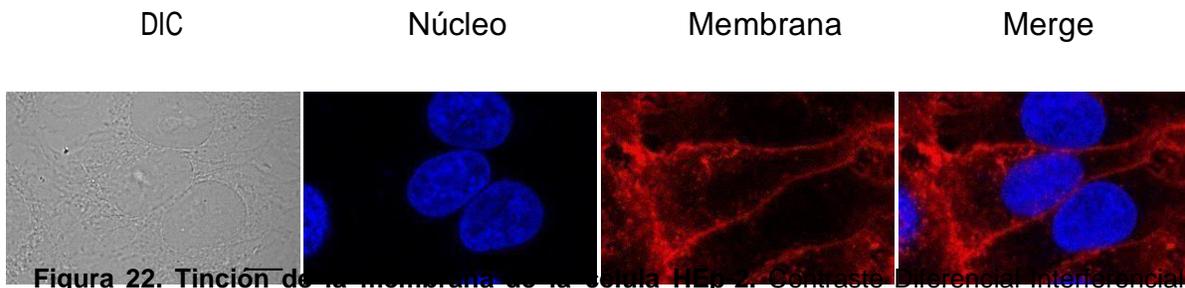
**AMF.** MEM: muestras control, AMF: muestras en donde se trataron a los parásitos con el fármaco.  
 Rojo: Membrana de la VP marcado utilizando un anticuerpo contra la proteína GRA3, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC Azul: Núcleos marcados con DAPI. n = 3. Escala = 5 µm.

## 7.7 Modificaciones de la membrana de la célula hospedero durante la proliferación y diferenciación de *Toxoplasma*

### 7.7.1 Durante la proliferación de taquizoítos:

Con la finalidad de determinar cuál es el destino de la membrana de la célula hospedera durante la conversión de taquizoíto a bradizoíto y formación de quistes tisulares *in vitro*, se realizó un marcaje de la membrana plasmática de la célula hospedera infectada con la aglutinina de germen de trigo, la cual se une a residuos de N-acetilglucosamina y se observó su distribución por microscopía confocal.

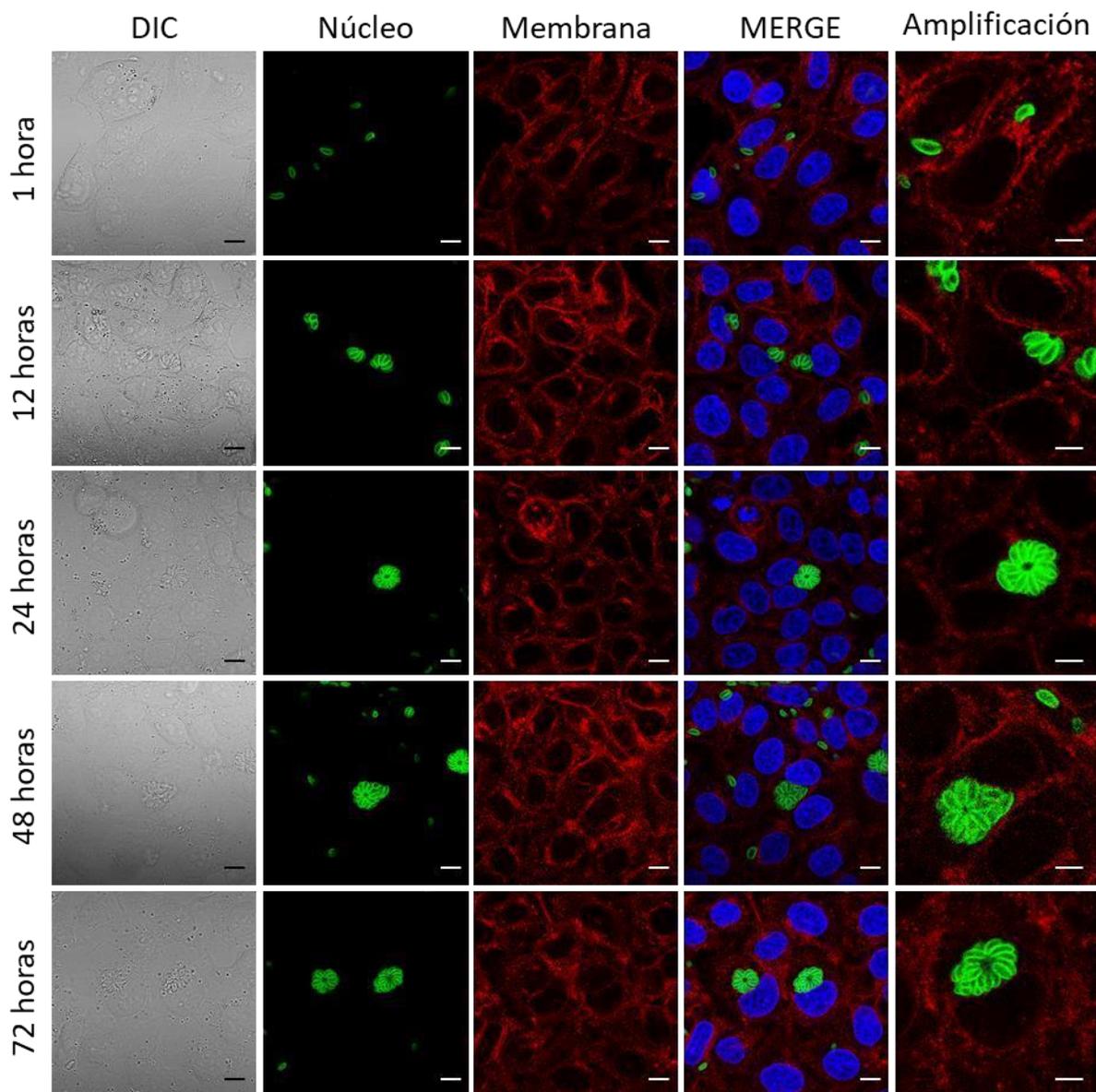
Primero se estandarizó el marcaje de la membrana plasmática de células HEP2 control, sin infectar. Como se puede observar en la figura 22 se delimita continuamente toda la periferia de la célula.



**Figura 22. Tinción de la membrana de la célula HEP-2.** Contraste Diferencial Interferencial (DIC), Rojo: membrana marcada con una aglutinina de germen de trigo, Azul: núcleo marcado con DAPI. n = 3. Escala = 10 µm.

Con el objetivo de analizar los cambios que surgen como consecuencia de la invasión y proliferación de taquizoítos en células HEP-2, se realizó la tinción contra la membrana plasmática y se marcaron a los parásitos con un anticuerpo dirigido contra la proteína GAP45 para determinar exactamente su ubicación al interior de las células hospederas. Después de haber realizado el proceso de invasión se puede observar que hasta las 24 horas de proliferación del taquizoíto existe la presencia de la monocapa de células hospederas, delimitándose la periferia de cada una de ellas, e incluso las fronteras del núcleo (Figura 23,

flechas blancas) ya que el marcador une selectivamente a la N-acetilglucosamina presente en todas las membranas. A partir de las 48 h y hasta las 72 de proliferación del taquizoíto se observa una tinción puntillada en la membrana del hospedero y en las células vecinas, mostrando un marcaje en el citosol de la misma, lo cual podría estar indicando que la membrana de la célula hospedera empieza a fraccionarse por la proliferación del taquizoíto tan avanzada (Figura 23).



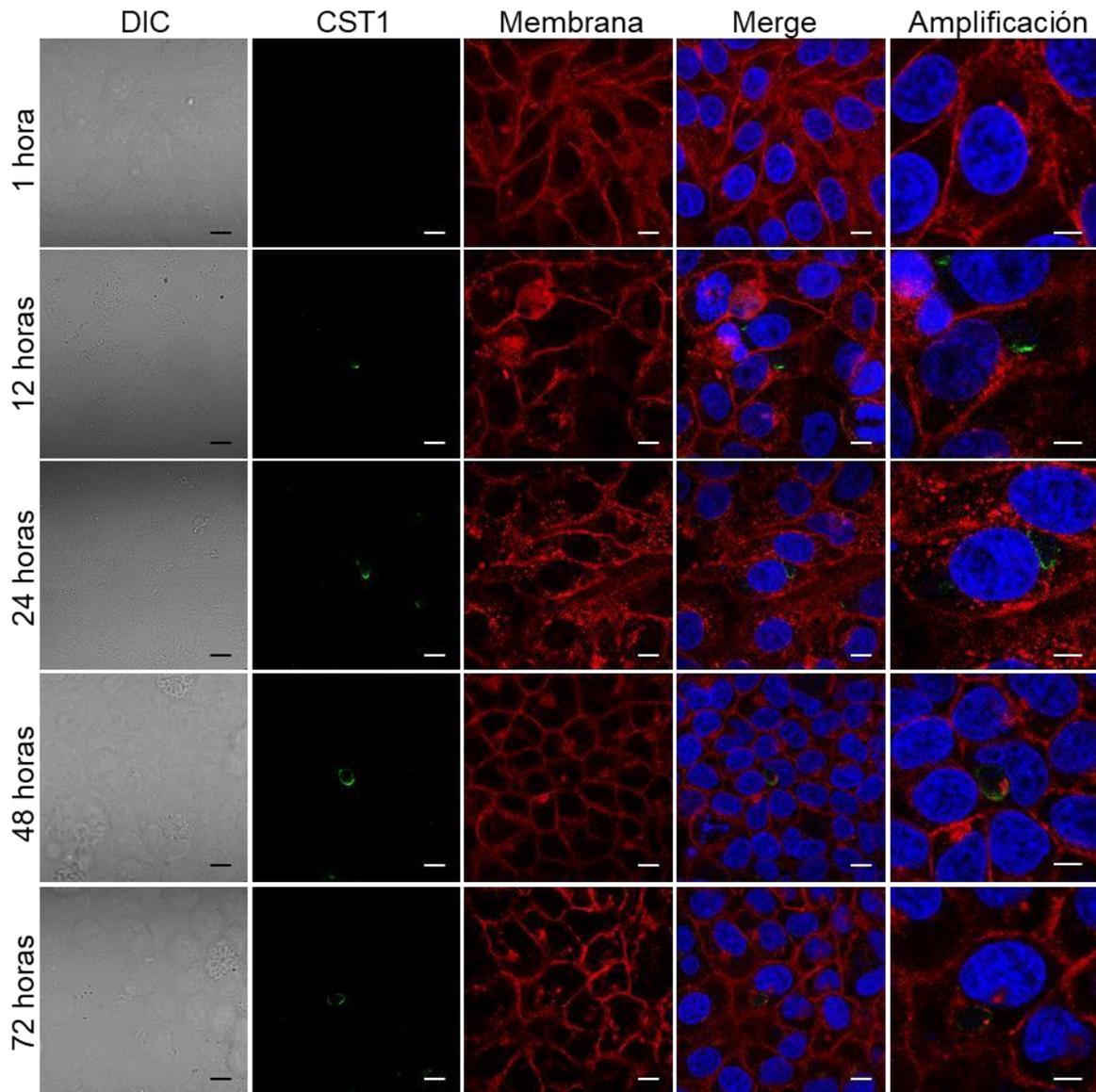
**Figura 23. Modificaciones en la membrana plasmática de la célula hospedera HEp-2 durante la proliferación de taquizoítos.** Contraste Diferencial Interferencial (DIC), Rojo: membrana marcada con una aglutinina de germen de trigo, Verde: GAP45 de taquizoítos marcados, Azul: núcleo marcado con DAPI. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m. Amplificación, escala 5  $\mu$ m.

### 7.7.2 Durante la conversión taquizoíto a bradizoíto y formación de quiste tisular:

Con la finalidad de determinar los cambios de la membrana plasmática del hospedero durante la conversión de taquizoíto a bradizoíto y en la formación de

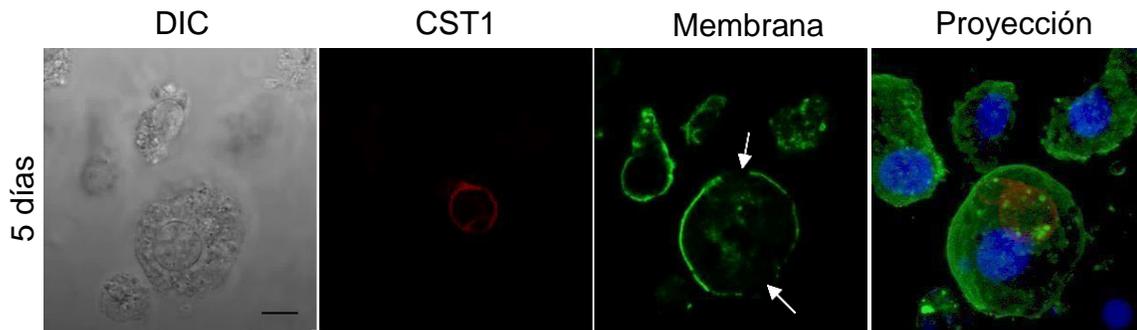
quiste tisular, se infectaron células HEp-2 con taquizoítos pre-tratados con AMF. Desde la hora invasión y hasta las 12 de proliferación y de haber inducido el enquistamiento con AMF se observa la monocapa integra del epitelio, a las 24 h de proliferación del parásito se observó una delimitación de la periferia de la célula hospedera, se detectó una clara expresión de CST1 asociada a la membrana de la VP. Sin embargo la tinción de la membrana plasmática se observó interrumpida y se detecta un puntillado rojo a nivel citoplásmico. A las 48 h de proliferación, se delimita la membrana del hospedero pero se observa una acumulación de la tinción roja en las zonas cercanas a la membrana de la VP en proceso de diferenciación, la cual se mantiene hasta las 72 h (Figura 24, flechas blancas), esta tinción cercana a la membrana de la VP en proceso de diferenciación podría indicar que parte de estas moléculas se asocian para formar parte de la pared quística en formación, dado que la membrana de la VP es la que sirve como templete para la biogénesis de la pared quística (Figura 24).





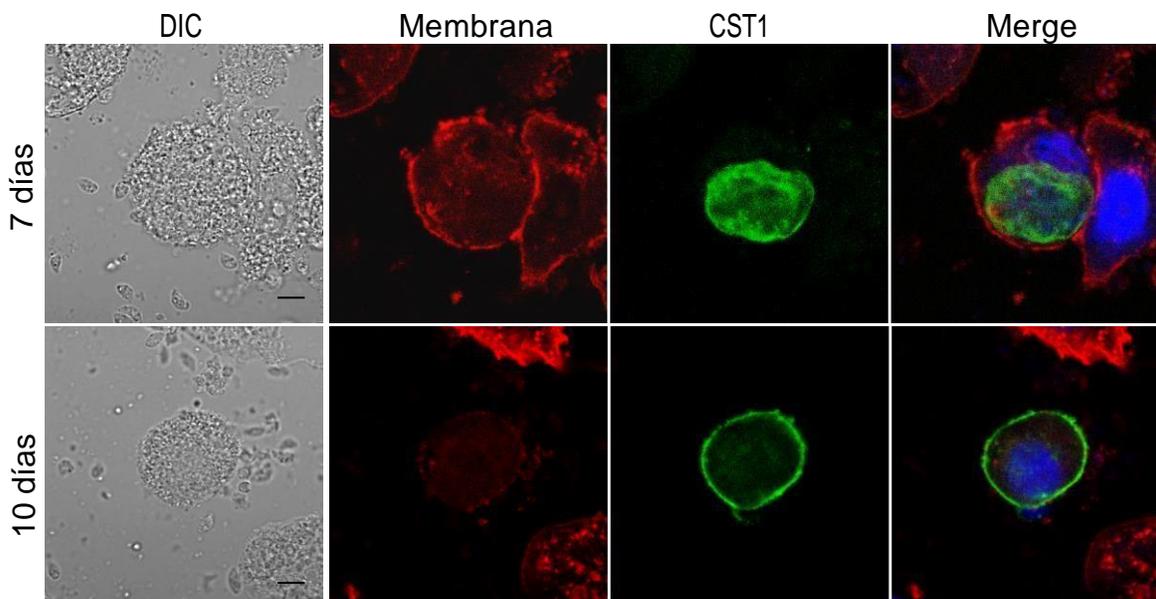
**Figura 24. Distribución de la membrana de la célula hospedera durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEP-2 después del tratamiento con AMF.** Contraste Diferencial Interferencial (DIC), Rojo: membrana marcada con la aglutinina de germen de trigo, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: núcleo marcados con DAPI. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m. Amplificación, escala = 5  $\mu$ m.

Los cultivos se incubaron por más tiempo después del tratamiento con la finalidad de obtener quistes más maduros y determinar cuál es el destino de la membrana del hospedero. A los 5 días después de proliferación se puede observar que la célula ya perdió su forma característica, es completamente esférica conteniendo una estructura positiva a la marca de CST1. En relación a la marca de la membrana se observa que ésta no es continua ya que tiene unas secciones en donde no hay fluorescencia (flechas blancas) (Figura 25).



**Figura 25. Distribución de la membrana de la célula hospedera a los 5 días del proceso de diferenciación de los parásitos en células HEP-2 después del tratamiento con AMF.** Contraste Diferencial Interferencial (DIC), verde: membrana marcada con la aglutinina de germen de trigo, Rojo: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: núcleo marcados con DAPI. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m.

A los 7 días de proliferación se puede observar que en el cultivo hay mucho detritus celular por la edad del mismo, sin embargo se observa la existencia de células esféricas que contenían quistes más grandes los cuales abarcan casi la mayoría del espacio citoplasmático, manteniendo la misma tinción de membrana que la vista a los 5 días presentando unos sitios en los cuales no hay marca. La tinción de membrana se disminuye notablemente a los 10 días de maduración del quiste, lo cual indica que probablemente hay una degradación de la misma, interesantemente lo único que se observa asociado al quiste es el núcleo o remanentes del núcleo de la célula hospedera (Figura 26).



**Figura 26.** Distribución de la membrana de la célula hospedera a los 5 días del proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 después del tratamiento con AMF. Contraste Diferencial Interferencial (DIC), Rojo: membrana marcada con la aglutinina de germen de trigo, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: núcleo marcados con DAPI. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m.

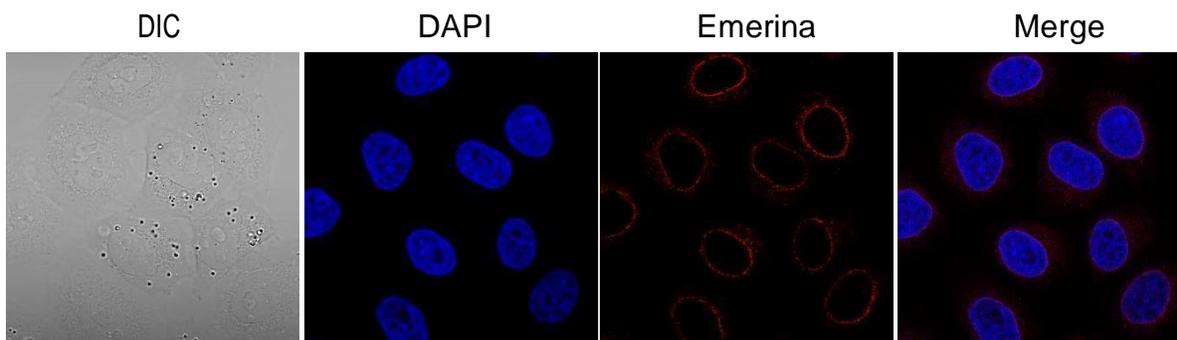
## 7.8 Modificaciones del núcleo de la célula hospedero durante la proliferación del taquizoíto y el proceso de enquistamiento

Una característica interesante que se presenta cuando ocurre el proceso de invasión por parte de taquizoítos, es la asociación de la VP con el núcleo de la célula hospedera lo cual ocurre en los primeros minutos después de la invasión y se mantiene a lo largo de la proliferación. Con el fin de determinar si se presentaban modificaciones en la morfología del núcleo del hospedero y de su asociación con la VP durante la proliferación del taquizoíto y durante el proceso de diferenciación, se marcaron las proteínas emerina y lámina beta y se analizó su distribución en un curso temporal después de la proliferación de taquizoítos y en la conversión de taquizoíto a bradizoíto.

### 7.8.1 modificaciones en emerina

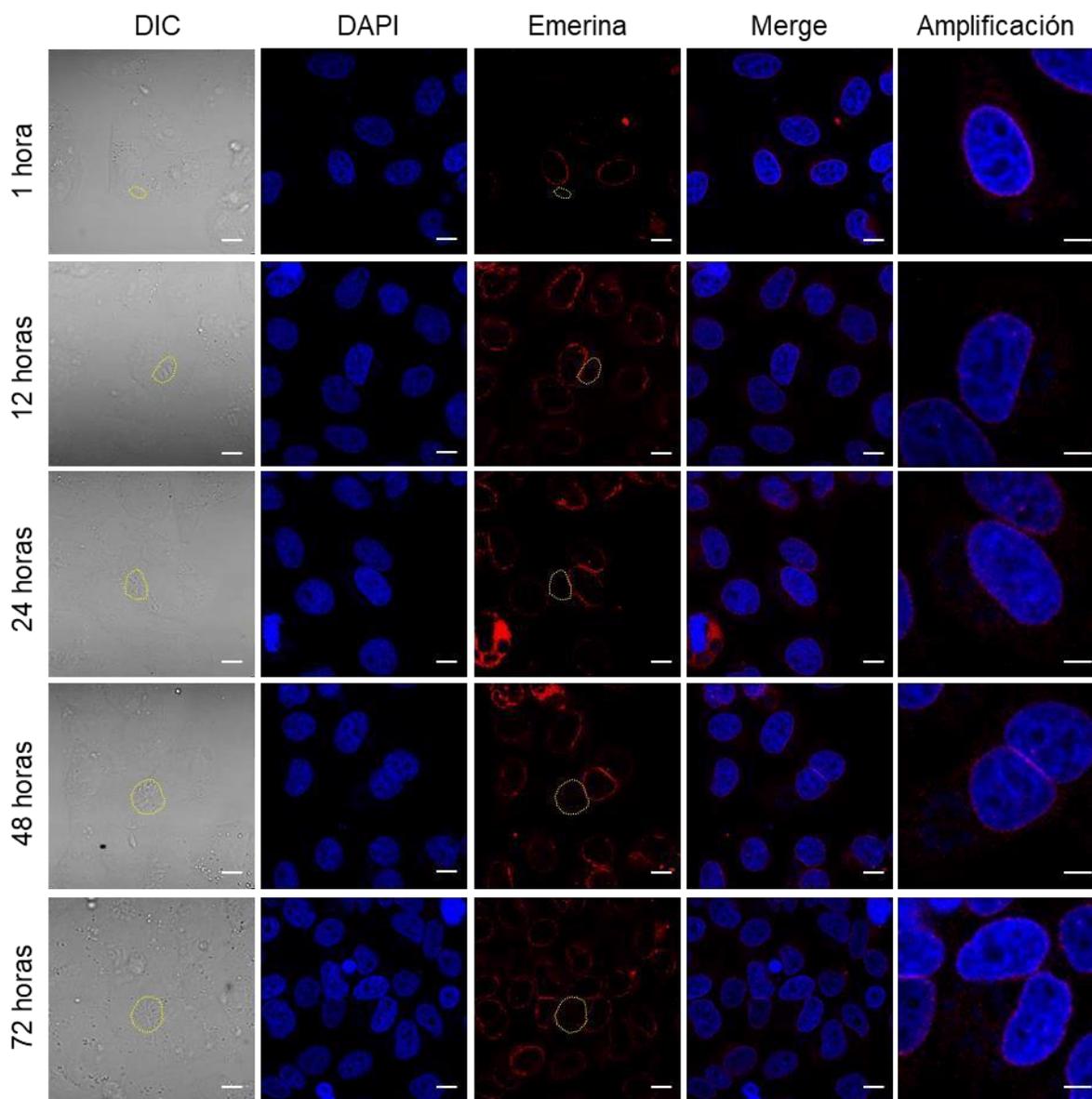
La emerina es una proteína transmembranal, localizada en la membrana interna de la envoltura nuclear. Una de sus principales funciones es proporcionarle estabilidad a la envoltura nuclear, y por lo tanto es esencial para determinar la

estructura de dicho organelo (Shimojima et al., 2017). Al analizar la tinción de la marca en las células HEp-2 no infectadas, se observa la tinción distribuida delimitando al núcleo de la célula hospedera. La apariencia del marcaje en el núcleo se observó como estructuras ovoides regulares (Figura 27).



**Figura 27. Análisis del núcleo de la célula HEp-2 marcando emerina.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: emerina, Azul: Núcleo marcado con DAPI. n = 2. Escala = 10  $\mu$ m.

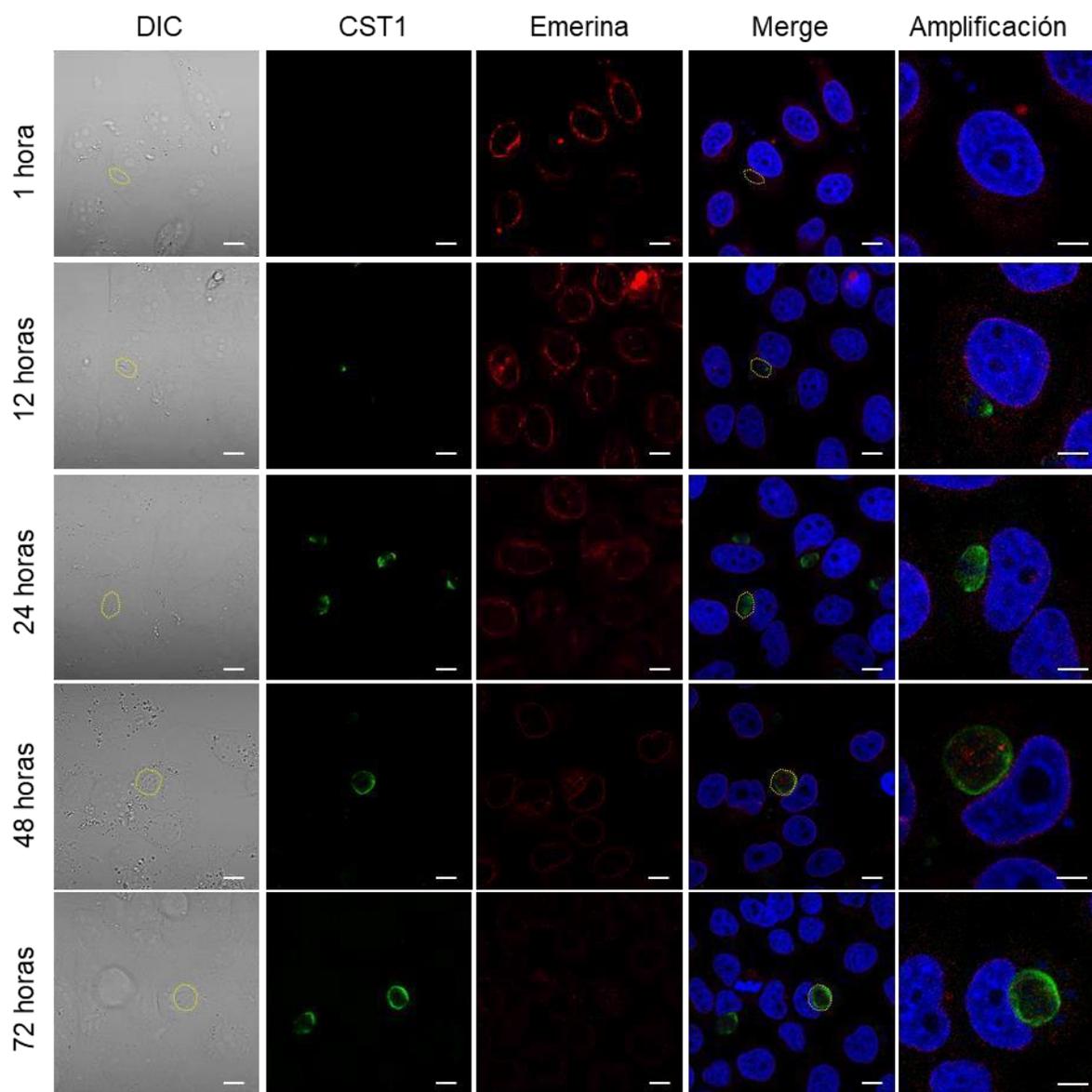
En células HEp-2 infectadas por taquizoítos se observó que a 1, 12 y 24 horas de proliferación de los taquizoítos, se presentó una distribución cortical homogénea de la proteína emerina en los núcleos sin una aparente diferencia con respecto a los controles no infectados. En contraste, desde las 48 h de proliferación se detectó un cambio en la forma de los núcleos los cuales adquirieron una apariencia más esférica con bordes regulares. A las 72 h de proliferación del parásito, se observó la aparición de bordes irregulares en la membrana nuclear y la marca de emerina adquirió un cierto patrón puntillado discontinuo (Figura 28).



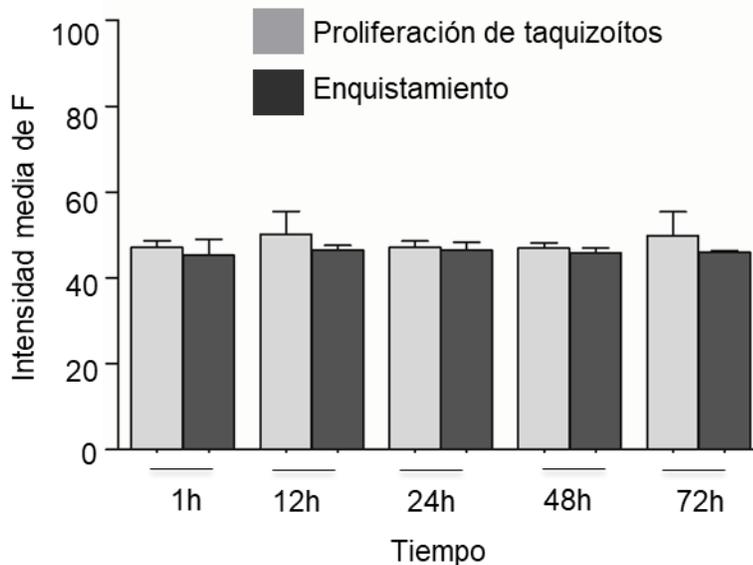
**Figura 28. Modificaciones del núcleo marcando emerina durante la proliferación de taquizoítos en células HEP-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: emerina, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las líneas punteadas amarillas indican la periferia de la VP's. Escala = 10  $\mu$ m. Amplificación, Escala = 5  $\mu$ m.

En células HEP-2 invadidas con taquizoítos pre-tratados con el fármaco AMF (Figura 29), en proceso de diferenciación para la conversión de taquizoíto a bradizoíto, se observó que desde la primera hora de proliferación después del tratamiento, algunas células empezaron a presentar además de la marca de

emerina distribuida homogéneamente en el borde nuclear, se observó un puntillado en el citoplasma de la célula hospedera y particularmente en donde se localiza la VP. A las 12 h de proliferación se observa que el núcleo adquiere una forma más esférica y la marca de emerina se detecta interrumpida en el borde del organelo. A las 24 h ya se observa la marca de CST1 en toda la membrana de la VP en proceso de diferenciación, mientras que la marca de emerina ya no es uniforme en el borde del núcleo además este presenta una concavidad en donde se asienta la VP. A las 48 h esta concavidad o protuberancia se mantiene en donde se localiza la VP ya completamente esférica y positiva a la marca de CST1, la marca de emerina en el núcleo del hospedero se observa fragmentada y también se detecta en el espacio intravacuolar. A las 72 h se sigue observando que los núcleos mantienen la protuberancia en donde se deposita la VP, presentando un nucléolo bien definido los bordes del mismo se observan regulares, mientras que la marca de la proteína emerina no presenta cambios significativos durante la proliferación del parásito (Figura 29 y 30).

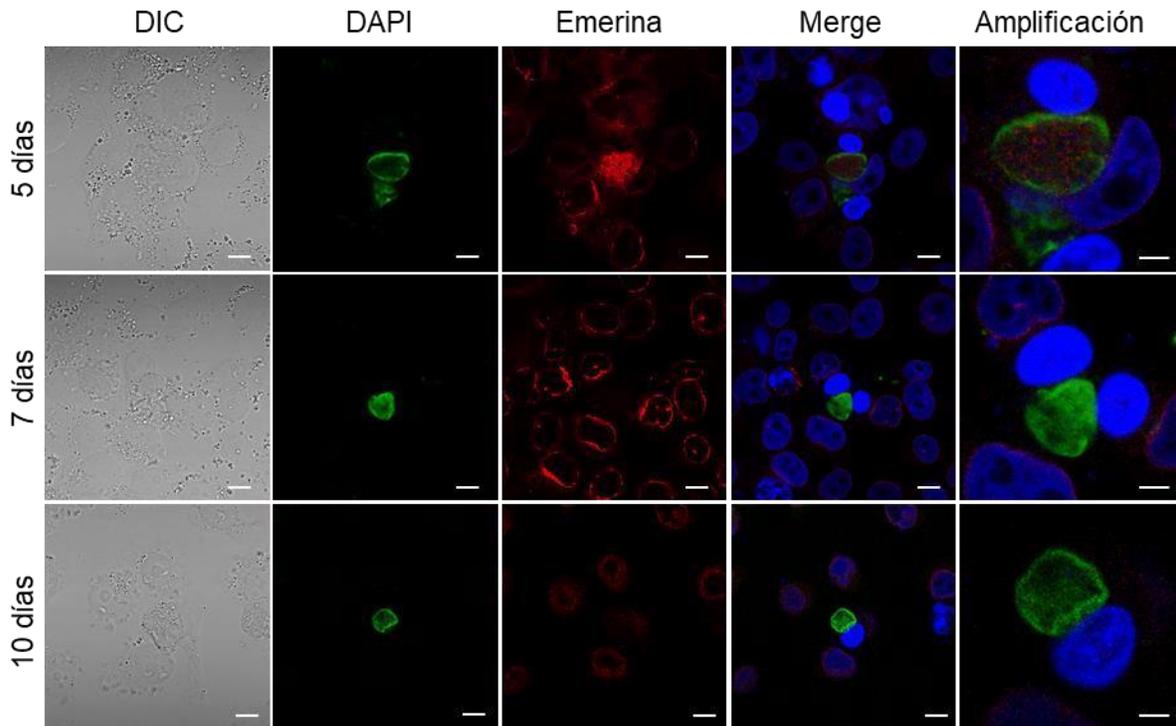


**Figura 29. Análisis de las modificaciones del núcleo marcando emerina durante el proceso de diferenciación de taquizoítos a bradizoítos en células HEP-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: emerina, Verde: CST1 marcada con la lectina de *Dolichos biflorus*-FITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las líneas punteadas amarillas indican la periferia de la VP's. Escala = 10  $\mu\text{m}$ . Amplificación, escala = 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 30. Determinación cualitativa de la expresión de emerina durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii*.** Se infectaron células HEp-2 con taquizoítos de la cepa RH previamente tratados durante 4 horas con 50 µg/ml de AMF incubados por 1, 12, 24, 48 y 72 h. El control consistió en células HEp-2 invadidas con taquizoítos no tratados con AMF. Se cuantificó el número de píxeles de las células positivas a CST1 en comparación con los píxeles de células invadidas no inducidas a cistogénesis.

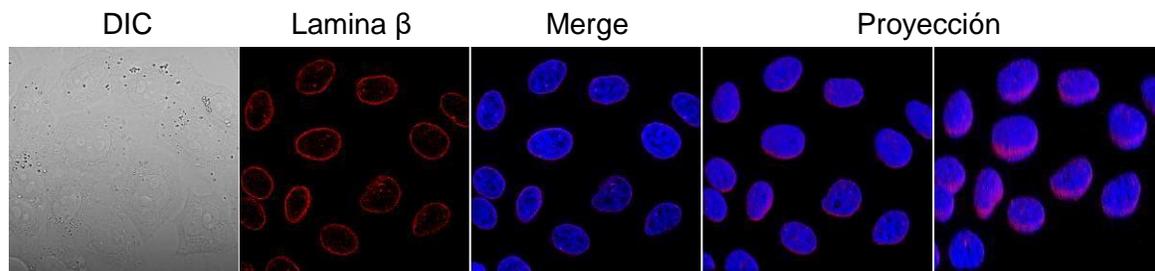
Se extendió el análisis de las modificaciones de núcleo durante el proceso de diferenciación del taquizoíto marcando la proteína emerina por 5, 7 y 10 días. A los 5 días de proliferación se puede detectar que la marca de emerina disminuye notablemente comparada con la de las células vecinas, además el núcleo pierde su forma típica ovoide, tiene bordes regulares y no se observan nucléolos definidos, estas mismas características se observan a los 7 y 10 días de proliferación del parásito después de haber inducido el proceso de diferenciación (Figura 31). A los 10 días se pierde la marca de emerina, esta pérdida de la marca de emerina puede tener una relación con que el núcleo cambie de morfología ya que se está perdiendo una proteína involucrada en la estructura del organelo.



**Figura 31. Análisis de las modificaciones del núcleo marcando emerina a los 5, 7 y 10 días del proceso de diferenciación de taquizoítos en células HEP-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: emerina, Verde: CST1 marcado con la lectina de *Dolichos biflorus*-FITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las líneas punteadas amarillas indican la periferia de la VP's. Escala = 10  $\mu$ m. Amplificación, escala = 5  $\mu$ m.

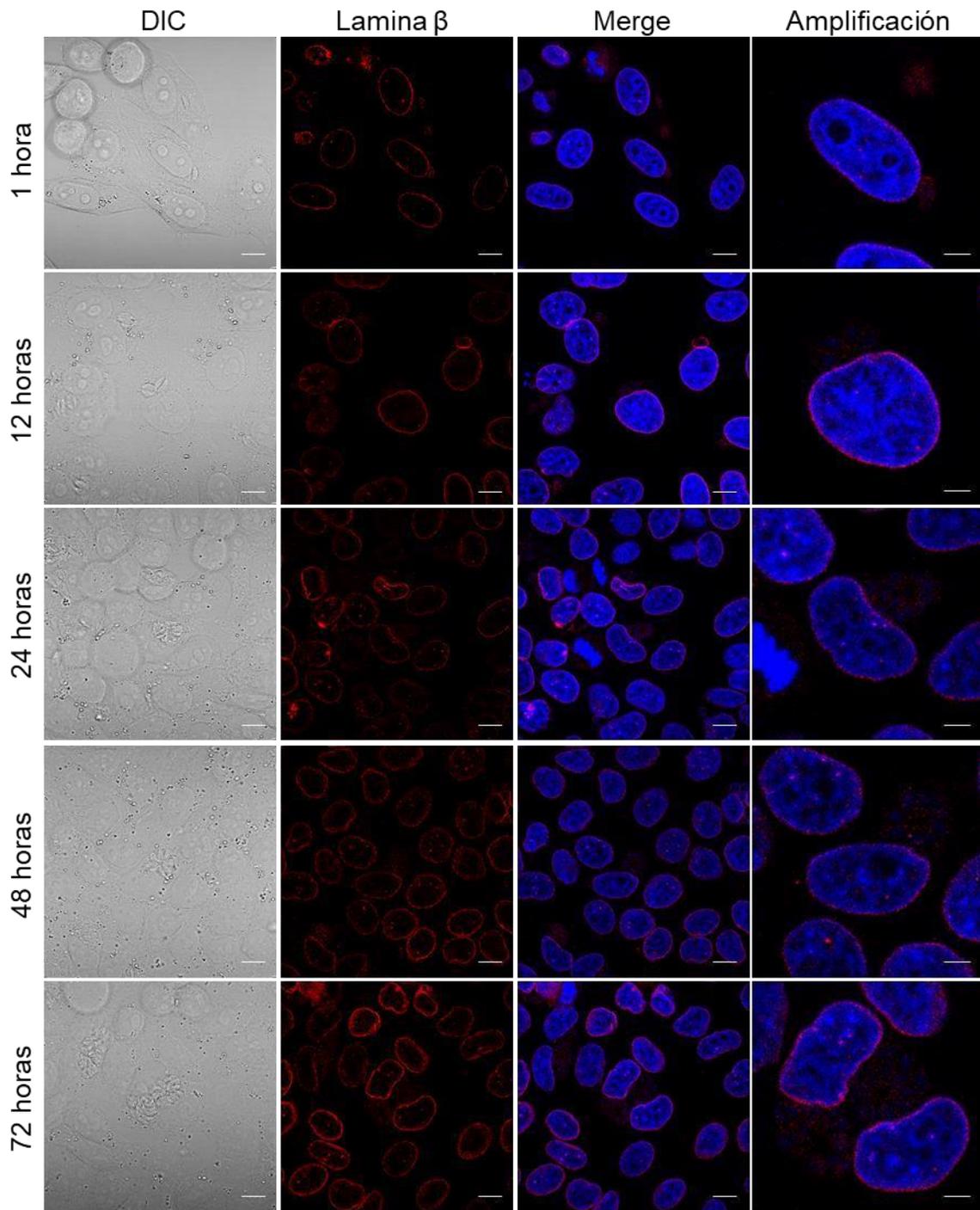
### 7.8.2 Análisis de las modificaciones de lamina $\beta$

Con la finalidad de determinar si existe algún tipo de modificaciones en la forma del núcleo durante el proceso de proliferación del taquizoíto se realizó un curso temporal marcando a la lamina  $\beta$ , ya que esta participa en la estructura y forma del núcleo, además de separar el nucleoplasma del citoplasma. Primero se estudió el marcaje en nuestra célula molde HEP-2 no infectadas, en las cuales se puede observar que este marcaje delimita toda la periferia del núcleo, mostrando la forma ovoide que presenta, mientras que en las proyecciones se puede observar que la marca de lamina beta forma un anillo en la cara media del núcleo definiendo la forma del mismo (Figura 32).



**Figura 32. Análisis del núcleo de la célula HEp-2 marcando la lamina  $\beta$ .** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: lamina beta, Azul: Núcleo marcado con DAPI. n = 2. Escala = 10  $\mu$ m.

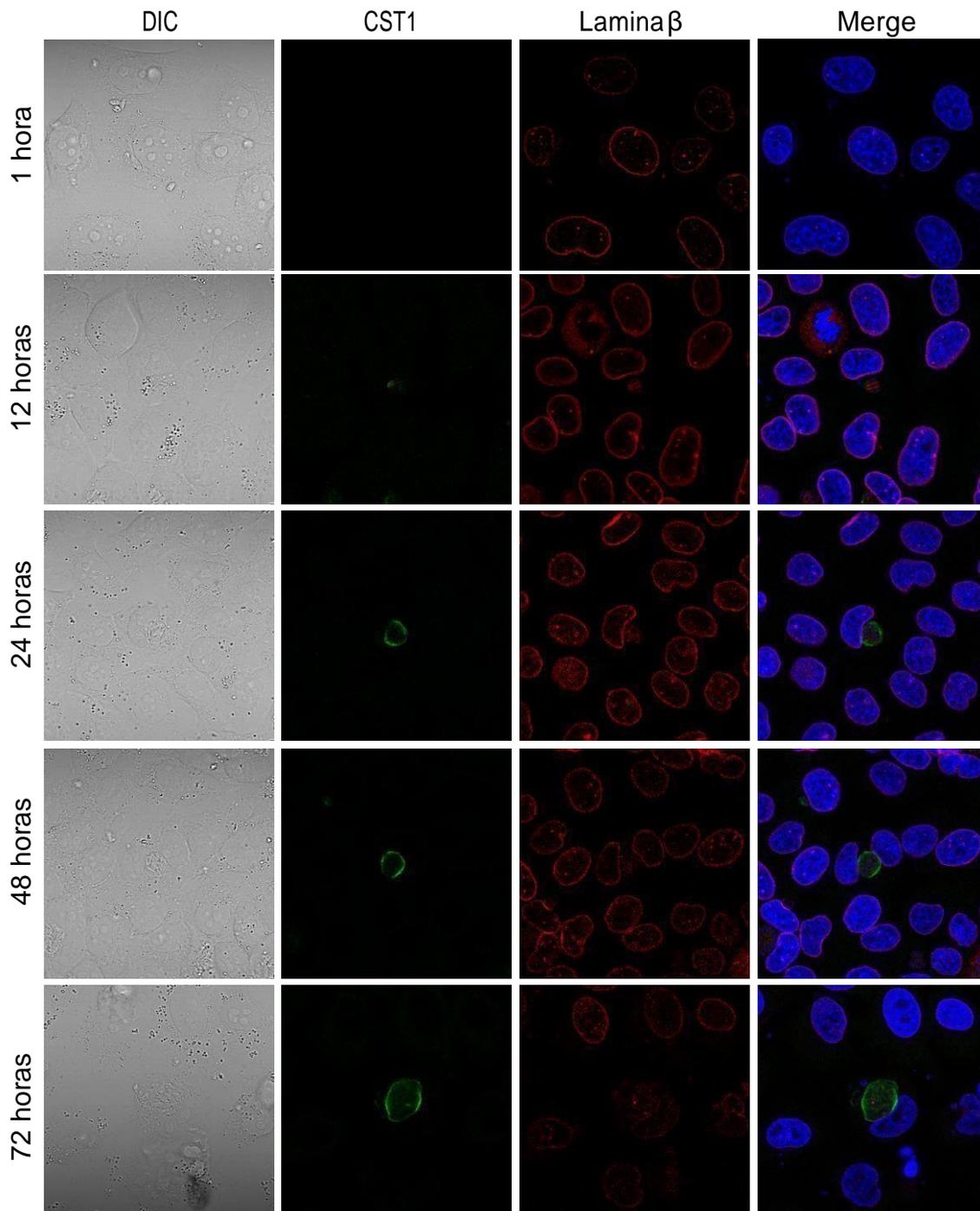
Al analizar los cambios que ocurren en la morfología del núcleo durante la proliferación de taquizoítos, observamos que a la hora de proliferación como ya se había estudiado, la VP está en la zona adyacente a este organelo, teniendo una forma ovoide la cual mantiene hasta las 12 h de proliferación del taquizoíto, por otra parte también se puede observar la marca de lamina beta delimitando la periferia del núcleo del parásito. A las 24 h es muy común observar como en el núcleo de la célula invadida se genera una concavidad dando una apariencia como de abrazar de alguna forma la VP, además se puede observar un puntillero de la marca de lamina beta en el citosol de la célula hospedero. A las 48 h de proliferación del taquizoíto se puede observar como la marca de lamina beta del núcleo del hospedero no es una línea continua delimitando la forma del mismo sino que se ve interrumpida. A las 72 h la forma del núcleo se ve modificada ya no presenta la forma típica, se ve que tiene una pérdida de la circularidad, con bordes irregulares, pero sin perder nunca la cercanía con la VP (Figura 33).



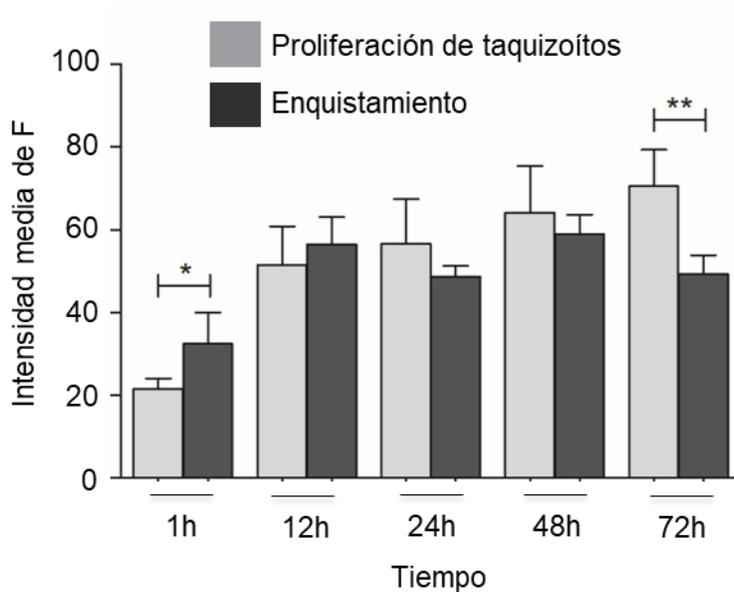
**Figura 33. Análisis de las modificaciones del núcleo marcando lamina  $\beta$  durante la proliferación de los taquizoítos en células HEP-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: lamina beta, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las flechas indican las regiones de concavidad que presenta el núcleo. n = 2. Escala = 10  $\mu$ m.

Con el objetivo de determinar los cambios en la distribución y morfología del núcleo del hospedero durante la conversión de taquizoítos a bradizoítos de la

cepa RH de *Toxoplasma*, se infectaron células HEp-2 con taquizoítos pre- tratados con el AMF. A la hora de proliferación después del tratamiento se puede observar que la VP ya está situada junto al núcleo, en cuanto a la morfología del mismo se observa casi esférico y céntrico abarcando gran parte del citoplasma de la célula. A las 12 h comienza a tener una morfología un poco más ovoide y se empieza a formar la concavidad en donde se deposita la VP en proceso de diferenciación a un estructura pre-quística, misma que se va incrementando o haciendo más notoria con respecto al tiempo de proliferación. Desde las 24 h la marca de lamina beta comienza a perder su continuidad en todo el contorno del núcleo, incrementándose a las 48 h. A las 72 h esta marca de lamina beta se ve disminuida notablemente en la periferia de este organelo y se observan muchos remanentes de la marca tanto en el espacio intranuclear del hospedero como en la zonas intravacuolar. A pesar de estas modificaciones en la forma del núcleo del hospedero y en el proceso de enquistamiento, la estructura pre-quística nunca modificó su localización en las cercanías del núcleo del hospedero (Figura 34 y 35).



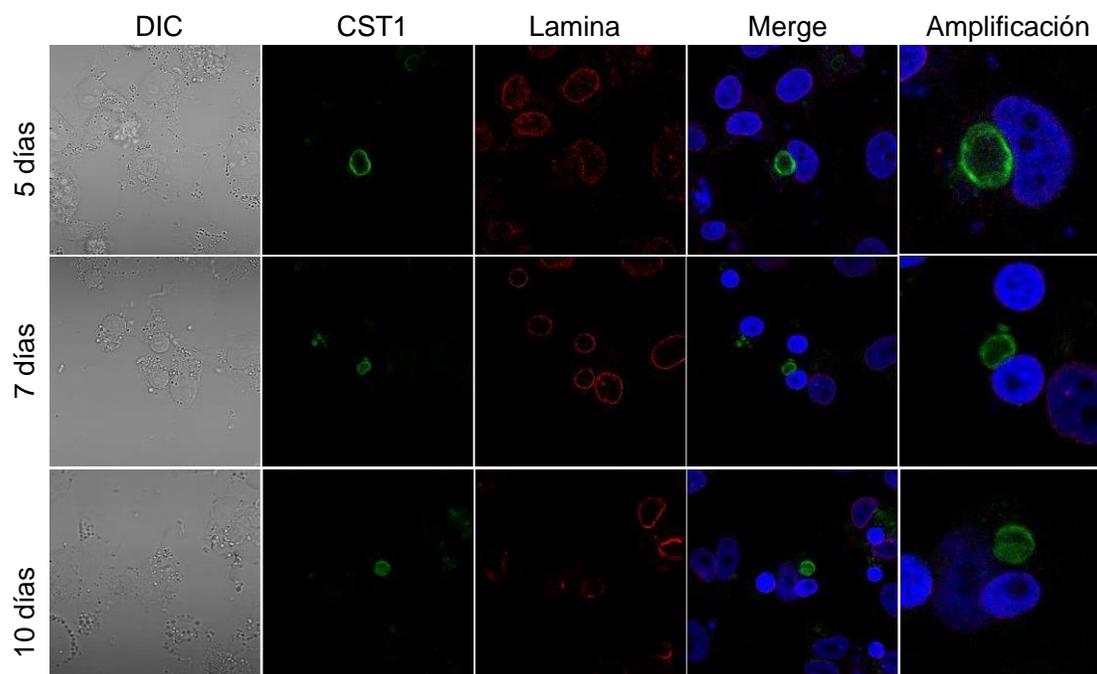
**Figura 34. Análisis de las modificaciones del núcleo marcando lamina  $\beta$  durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos en células HEp-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: lamina beta, Verde: CST1 marcada con la lectina de *Dolichos biflorus*-FITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las flechas indican las regiones de concavidad que presenta el núcleo. n = 2. Escala = 10  $\mu$ m.



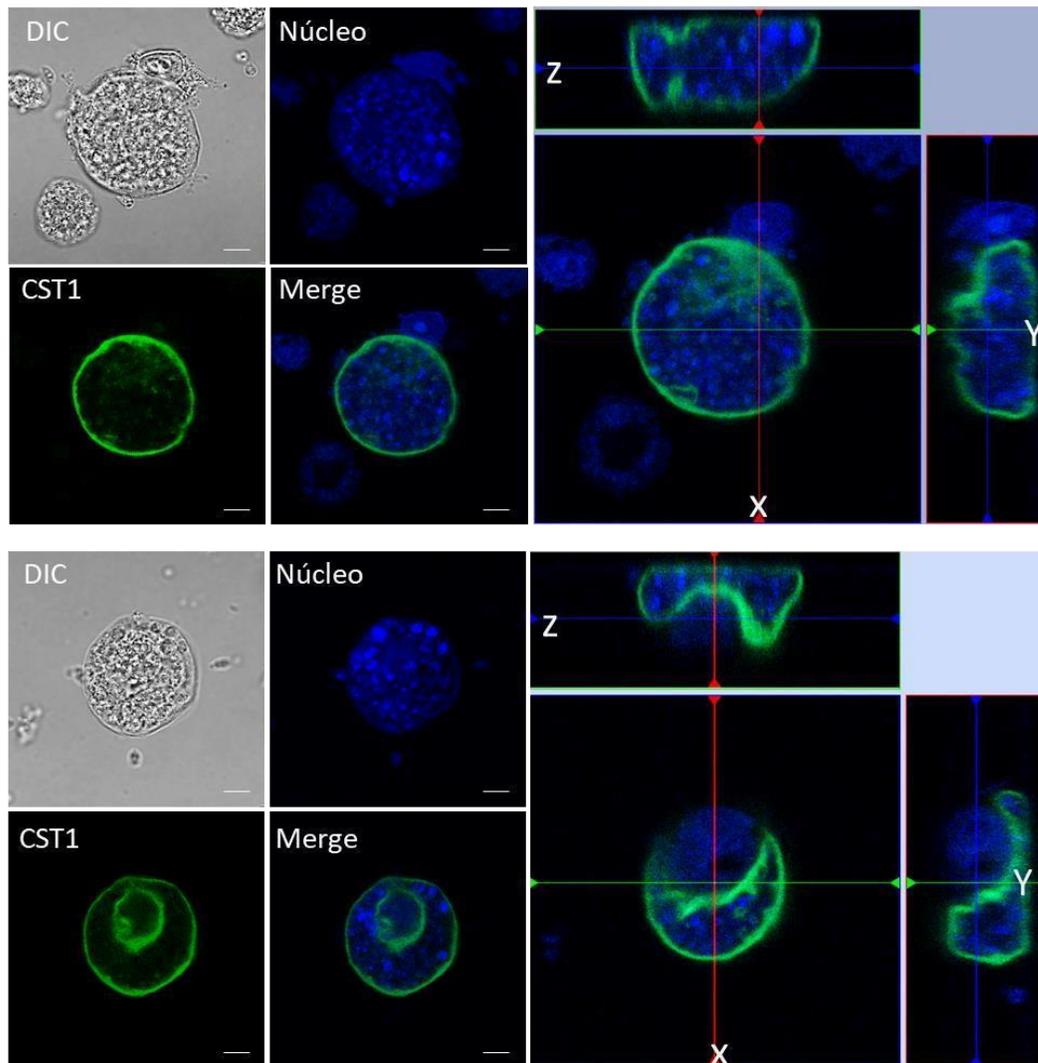
**Figura 35. Determinación cualitativa de la expresión de lamina  $\beta$  durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii*.** Se infectaron células HEp-2 con taquizoítos de la cepa RH previamente tratados durante 4 horas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de AMF incubados por 1, 12, 24, 48 y 72 h. El control consistió en células HEp-2 invadidas con taquizoítos no tratados con AMF. \*  $p < 0.0402$  y \*\*  $p < 0.0086$ . Se cuantificó el número de pixeles de las células positivas a CST1 en comparación con los pixeles de células invadidas no inducidas a cistogénesis.

Después de analizar las modificaciones en los tiempos cortos de la formación del quiste *in vitro* se decidió extender los estudios a tiempos más prolongados de 5, 7 y 10 días para ver la relación del quiste con la nueva estructura en formación. Desde los 5 días podemos observar como en las muestras ya empezamos a tener detritus celular esto por la edad de los cultivos. Con respecto a la asociación del núcleo con el pre-quiste esta se sigue manteniendo y el núcleo preserva todavía la morfología ovoide con la concavidad en donde se deposita la VP en diferenciación. Es hasta los 7 días donde la célula ya modificó por completo su morfología incluyendo la del núcleo ya que este está completamente esférico y más ancho, ya que lo normal es que este alargado y aplanado. Esta forma se mantiene incluso a los 10 días de proliferación del parásito después de haber inducido el enquistamiento (Figura 36). Esta forma que adquiere el núcleo del hospedero es más sencilla de observar y analizar en las fotografías y proyecciones que se obtuvieron en el microscopio confocal de

los diferentes ejes o caras de la estructura, además de ver con claridad la concavidad que se genera, la cual podría ser como un nicho en donde se deposita la estructura pre-quística (Figura 37).



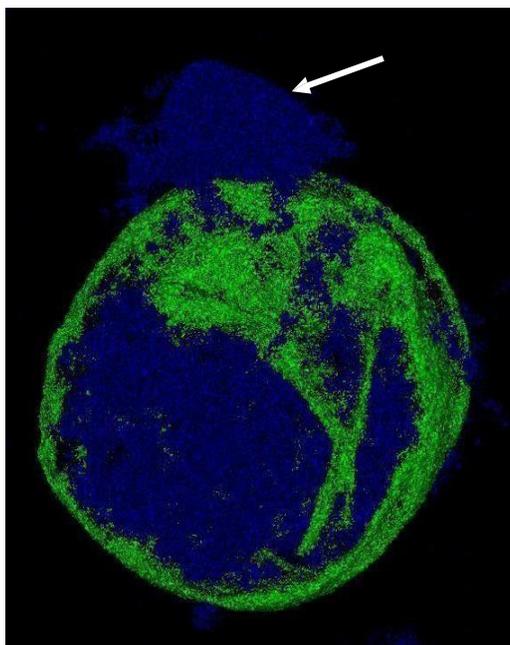
**Figura 36. Análisis de las modificaciones del núcleo durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos en células HEP-2 a los 5, 7 y 10 días marcando lamina  $\beta$ .** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: lamina beta, Verde: CST1 marcada con la lectina de *Dolichos biflorus*- FITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las flechas indican las regiones de concavidad que presenta el núcleo. n = 2. Escala = 10  $\mu$ m.



**Figura 37. Análisis de la relación entre el núcleo del hospedero y la estructura quística de 10 días de maduración.** Panel de la izquierda representa fotografías de cortes de quistes de 10 días de maduración producidos *in vitro* en células HEp-2 y en el panel de la derecha podemos observar diferentes rotaciones de la imagen de la izquierda con la finalidad de analizar cómo está la disposición entre el núcleo y el quiste. Contraste Diferencial interferencial (DIC), Verde: CST1 marcada con la lectina de *Dolichos biflorus*-FITC, Azul: Núcleos marcados con DAPI. Las flechas indican las regiones de concavidad que presenta el núcleo. n = 10. Escala = 5  $\mu$ m.

Aprovechando otros algoritmos que tiene el microscopio confocal LSM-700 de Zeiss, se obtuvieron reconstrucciones 3D para tener un poco más claro la relación tan cercana del núcleo del hospedero con el quiste producido *in vitro*. En la figura 38 podemos observar un quiste de 10 días de maduración teñido con la lectina DBA acoplada a FITC, y se puede ver que lo único que permanece

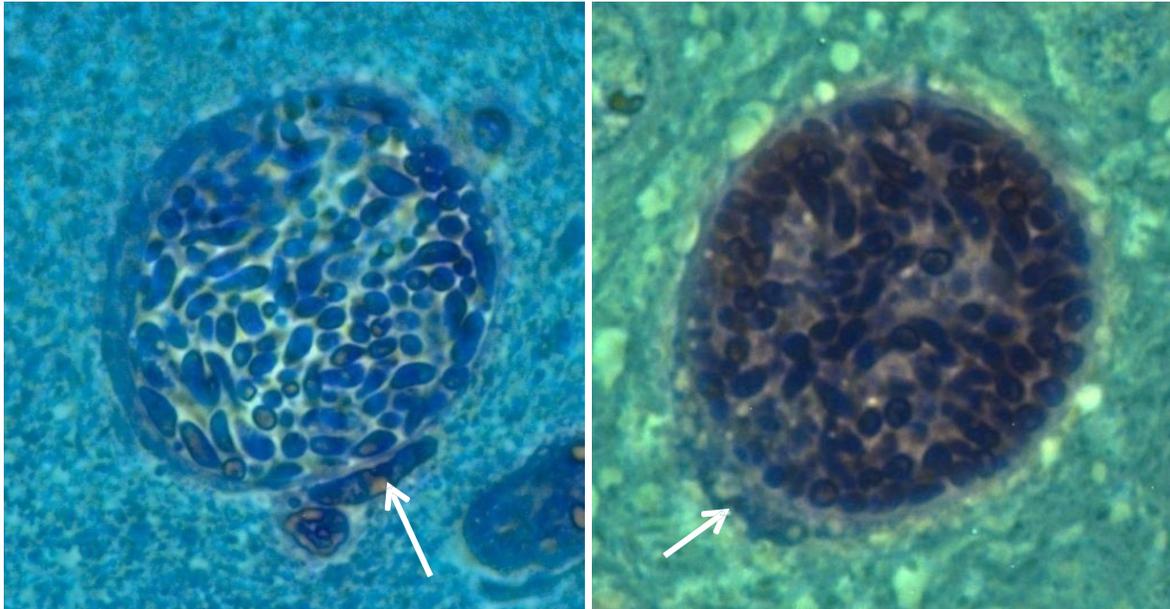
asociado o unido a él, es el remanente de núcleo de la célula hospedera (flecha blanca), indicando que este organelo es el último que mantiene una relación con el quiste en formación, a la fecha se desconoce el motivo por el cual se presenta este fenómeno.



**Figura 38. Proyección en 3D de la relación entre el núcleo del hospedero y la estructura quística de 10 días de maduración.** Micrografía obtenida con la modalidad de *Surface* del microscopio confocal LSM-700. Verde: CST1 marcada con la lectina de *DBA-FITC*, Azul: Núcleos marcados con *DAPI*. Las flechas indican las regiones de concavidad que presenta el núcleo.  $n = 10$ . Escala = 5  $\mu\text{m}$ .

Con la finalidad de corroborar si esta relación del núcleo con la estructura pre-quística que estábamos obteniendo *in vitro* se daba también en el modelo de toxoplasmosis murina, con la cepa ME49, se procesaron muestras de diferentes regiones de cerebros de ratones de la cepa C57BL6 infectados por vía oral con quistes de la cepa ME49. Después de 2 meses de infección se obtuvieron los cerebros, se embebieron en resina para obtener corte semi-finos. En la figura 39 se puede observar la presencia de dos quistes obtenidos *in vivo* de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, completamente llenos de bradizoítos, y a pesar del tiempo de maduración que es de dos meses sigue presentando una estructura asociada a la pared del quiste tisular (figura 39, flechas blancas), que posiblemente sea el núcleo remanente de la célula hospedera, así como se

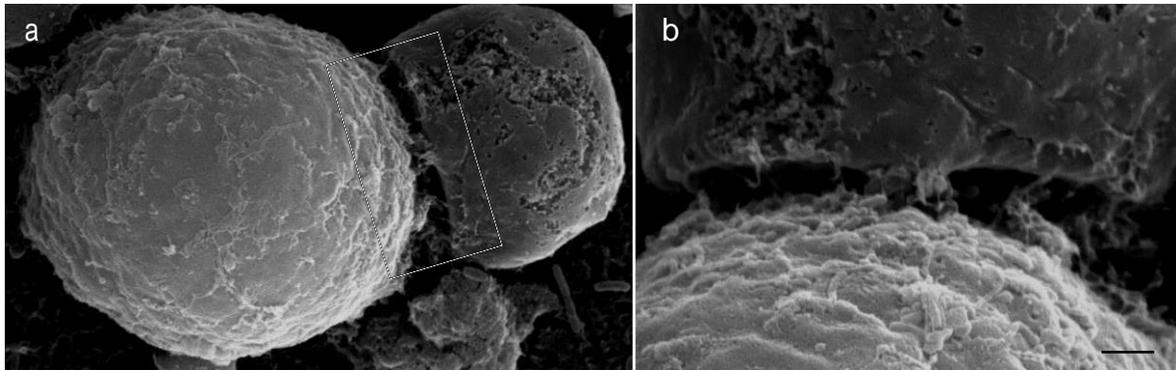
observó en las estructuras quísticas obtenidos en el modelo *in vitro*.



**Figura 39. Cortes semi-finos de tejido de cerebro infectado con quistes de la cepa ME49.**

Imágenes de microscopía óptica de quistes de 2 meses embebidos en tejido cerebral teñidas con hematoxilina-eosina. Las flechas blancas indican el probable remanente de núcleo de la célula hospedera en donde se formó el quiste. n = 3. Escala = 5  $\mu$ m.

Por otra parte, cuando se procesaron quistes inducidos *in vitro* mediante el tratamiento con el AMF para microscopía electrónica de barrido, se observó continuamente que los quistes estaban pegados a un cuerpo ovoide de tamaño menor que el del quiste, pudiendo ser el remanente del núcleo del hospedero, el cual puede ser el mismo que el observado en los cortes semi-finos. Esta unión puede estar dada por unas prolongaciones que se observaron entre ambos cuerpos (Figura 40).



**Figura 40. Ultra-estructura de quistes inducidos *in vitro* con AMF.** Micrografías de SEM de quistes purificados después de 10 días de proliferación, inducidos bajo el tratamiento con AMF. Escala en a = 5  $\mu\text{m}$  y en b = 1  $\mu\text{m}$ .

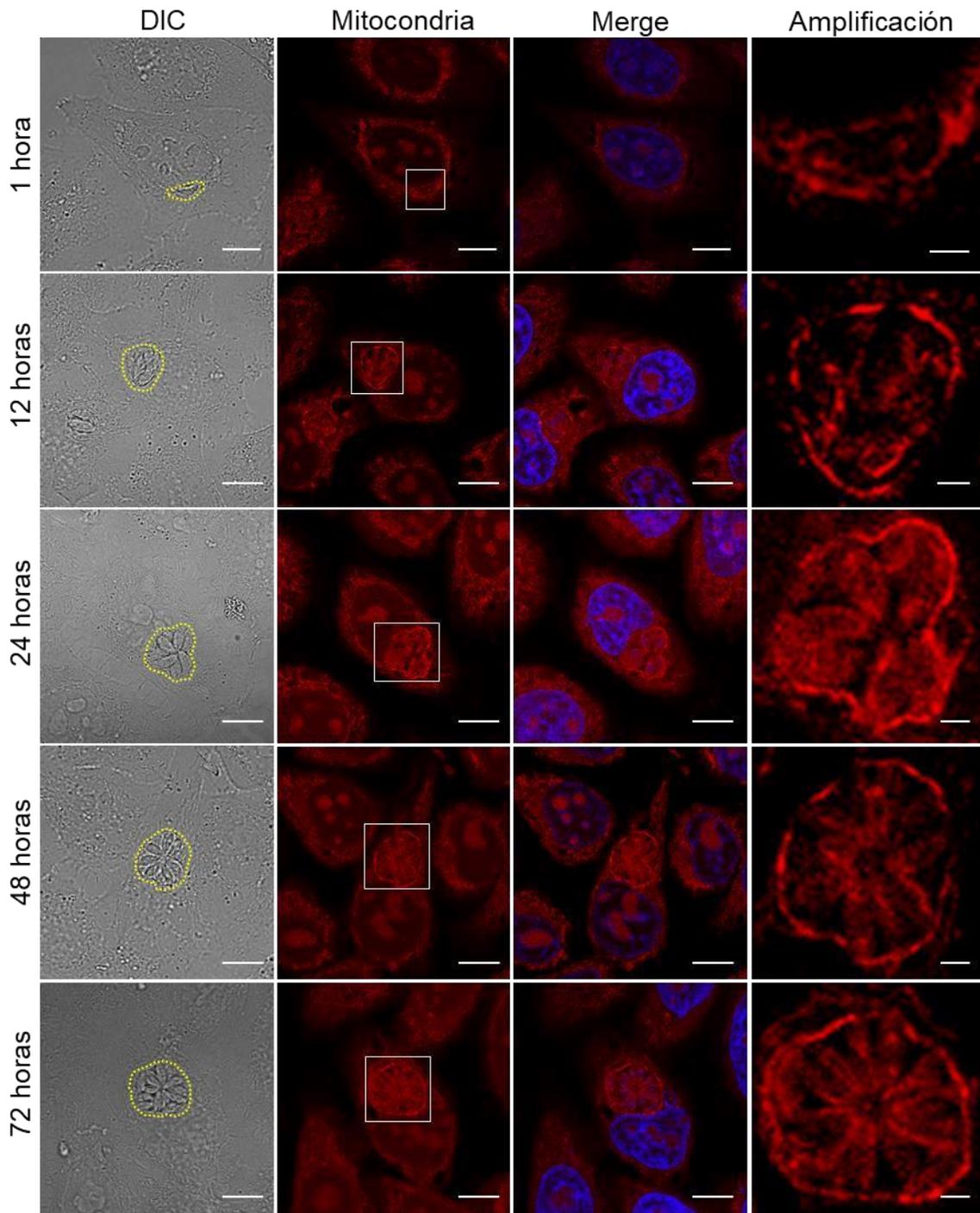
### 7.9 Cambios en la distribución de las mitocondrias de la célula hospedero durante la proliferación del taquizoíto y el proceso de enquistamiento

Con el objetivo de determinar los cambios en la organización de las mitocondrias del hospedero durante el proceso de enquistamiento del parásito se realizó un marcaje de las mismas con mitotracker-580, el cual tiñe selectivamente a las mitocondrias, concentrándose en la matriz mitocondrial (Tran, Allen, & Smith, 1991). Primero analizamos su organización normal en células HEP-2 no infectadas. Las mitocondrias se encontraron en todo el citoplasma de la célula, con una distribución uniforme (Figura 41).



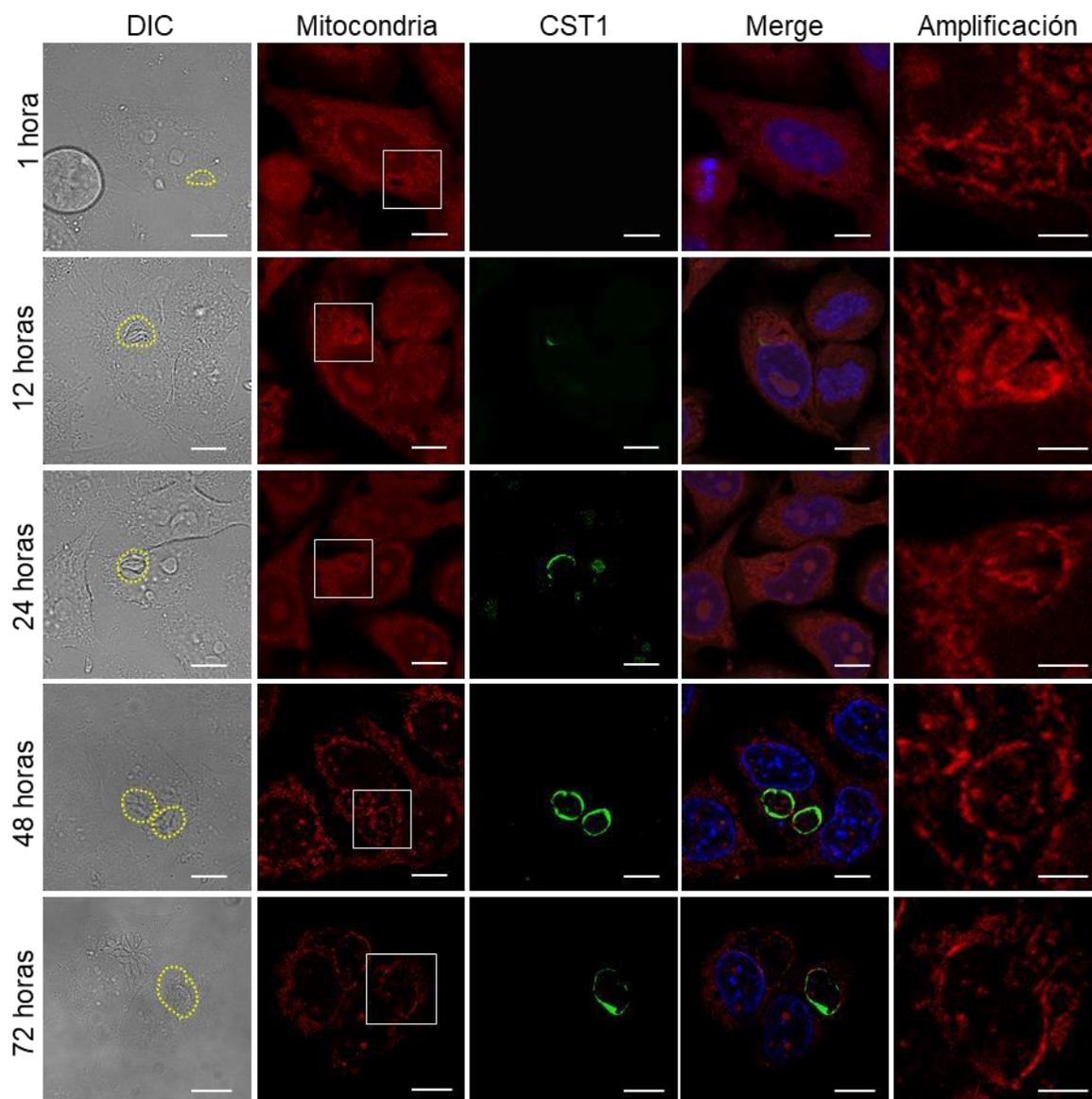
**Figura 41. Distribución de las mitocondrias en la célula HEP-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: Mitocondrias marcadas con Mitotracker Red, Azul: Núcleo marcado con DAPI. n = 5. Escala = 5  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de determinar los cambios que ocurren en la distribución de las mitocondrias durante la proliferación del taquizoíto se realizó un curso temporal para analizar las modificaciones en su organización. En estudios previos se ha reportado que la VP se rodea por mitocondrias del hospedero (Sinai & Joiner, 2001), esta asociación de las mitocondrias del hospedero esta mediada por la proteína ROP2 del parásito, la cual es secretada por las roptrías y después se asocia a la membrana de la VP. La presencia de esta en la membrana de la VP podría servir como un ancla molecular para las mitocondrias (Laliberte & Carruthers, 2008; Sinai & Joiner, 2001). Cuando analizamos lo que ocurría con la distribución de las mitocondrias durante la proliferación del taquizoíto observamos que a 1 h de proliferación se observó como las mitocondrias del hospedero rodean por completo la membrana de la VP, fenómeno que se mantiene hasta las 72 h de proliferación del taquizoíto (Figura 42).

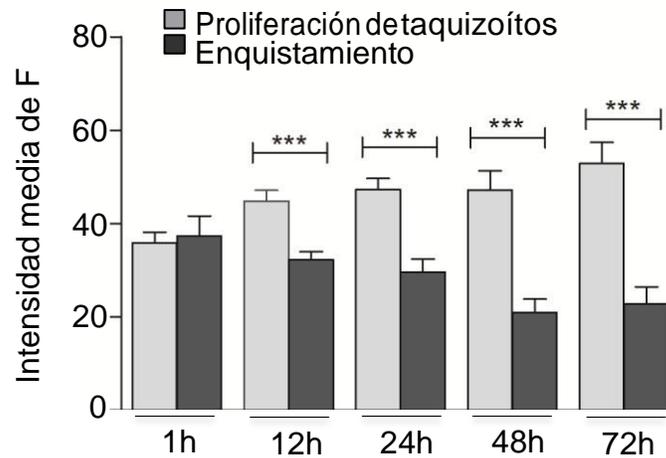


**Figura 42. Distribución de las mitocondrias durante la proliferación de los taquizoítos en células HEP-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: Mitocondrias marcadas con Mitotracker-580 Red, Azul: Núcleos marcados con DAPI. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP, y el cuadro blanco delimita la región amplificada.  $n = 3$ . Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

Al analizar los cambios en la organización de las mitocondrias durante el proceso de enquistamiento del parasito, se observó que estos organelos se van asociando a la membrana de la VP desde la hora notándose más a las 12 h y manteniéndose hasta las 72 horas de proliferación después de la inducción del enquistamiento. A las 24 y 48 h se puede detectar que la VP está completamente decorada por las mitocondrias del hospedero, interesantemente en la imagen de las 72 h se puede observar que hay dos células invadidas una con un VP normal y otra positiva a la tinción de CST1 y comparando la organización de las mitocondrias se puede detectar que estas disminuyen notablemente en el citosol de la célula que contiene a la VP en proceso de diferenciación, ubicándose en las zonas adyacentes a la estructura pre-quística (Figura 43 y 44)

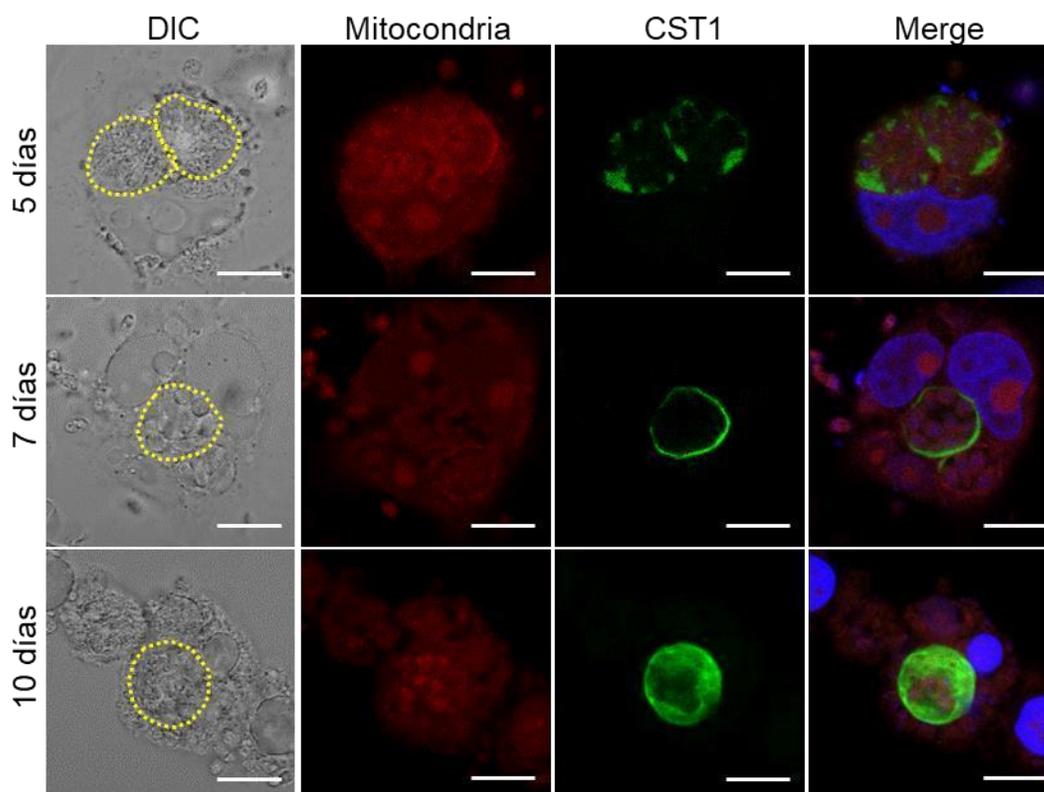


**Figura 43. Distribución de las mitocondrias durante el proceso de diferenciación de los taquizoítos en células HEP-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: Mitocondrias marcadas con Mitotracker-580 Red, Verde: CST1 marcada con la lectina de *Dolichos Biflorus*, Azul: Núcleos marcados con DAPI. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP, y el cuadro blanco delimita la región amplificada. n = 3. Escala = 10  $\mu\text{m}$ . Amplificación escala = 1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 44. Determinación cualitativa de la expresión de mitocondrias durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii*.** Se infectaron células HEP-2 con taquizoítos de la cepa RH previamente tratados durante 4 horas con 50 µg/ml de AMF incubados por 1, 12, 24, 48 y 72 h. El control consistió en células HEP-2 invadidas con taquizoítos no tratados con AMF. \*\*\*  $p < 0.0004$ . Se cuantificó el número de píxeles de las células positivas a CST1 en comparación con los píxeles de células invadidas no inducidas a cistogénesis.  $n = 3$ .

A los 5 y 7 días de incubación la estructura pre-quística asociada al núcleo del hospedero se encuentra rodeada de mitocondrias de la célula hospedera, sobre la membrana de la estructura que contiene los parásitos puede observarse un aumento de la marca fluorescente. Realizando un análisis del interior de los pre-quistes en los diferentes cortes ópticos, mostró que la fluorescencia también se podía detectar en el interior de los pre-quistes. A los 10 días la marca fluorescente de las mitocondrias alrededor de estructura positiva a la glicoproteína CST1 se ve disminuida, detectándose la marca contra las mitocondrias en el interior de los parásitos, sugiriendo que la mitocondria única de los mismos es funcional (Figura 45).



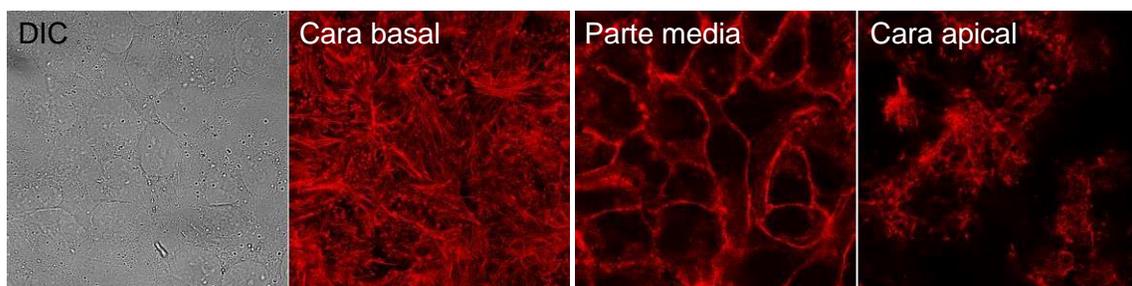
**Figura 45. Distribución de las mitocondrias durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEP-2 después del tratamiento con AMF.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: Mitocondrias marcadas con Mitotracker Red, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC Azul: Núcleos marcados con DAPI. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m.

Cuando se inicia el proceso de diferenciación del parásito uno de los cambios más evidentes observados por microscopía óptica y por electrónica de transmisión es la forma que toma la célula hospedera, y dado que el citoesqueleto es el encargado de proporcionarle la morfología y estabilidad decidimos analizar los cambios que ocurren por efecto de la formación del quiste.

### 7.10 Cambios en la distribución de filamentos de actina durante la proliferación intracelular y diferenciación de taquizoítos RH de *T. gondii* en células HEp-2

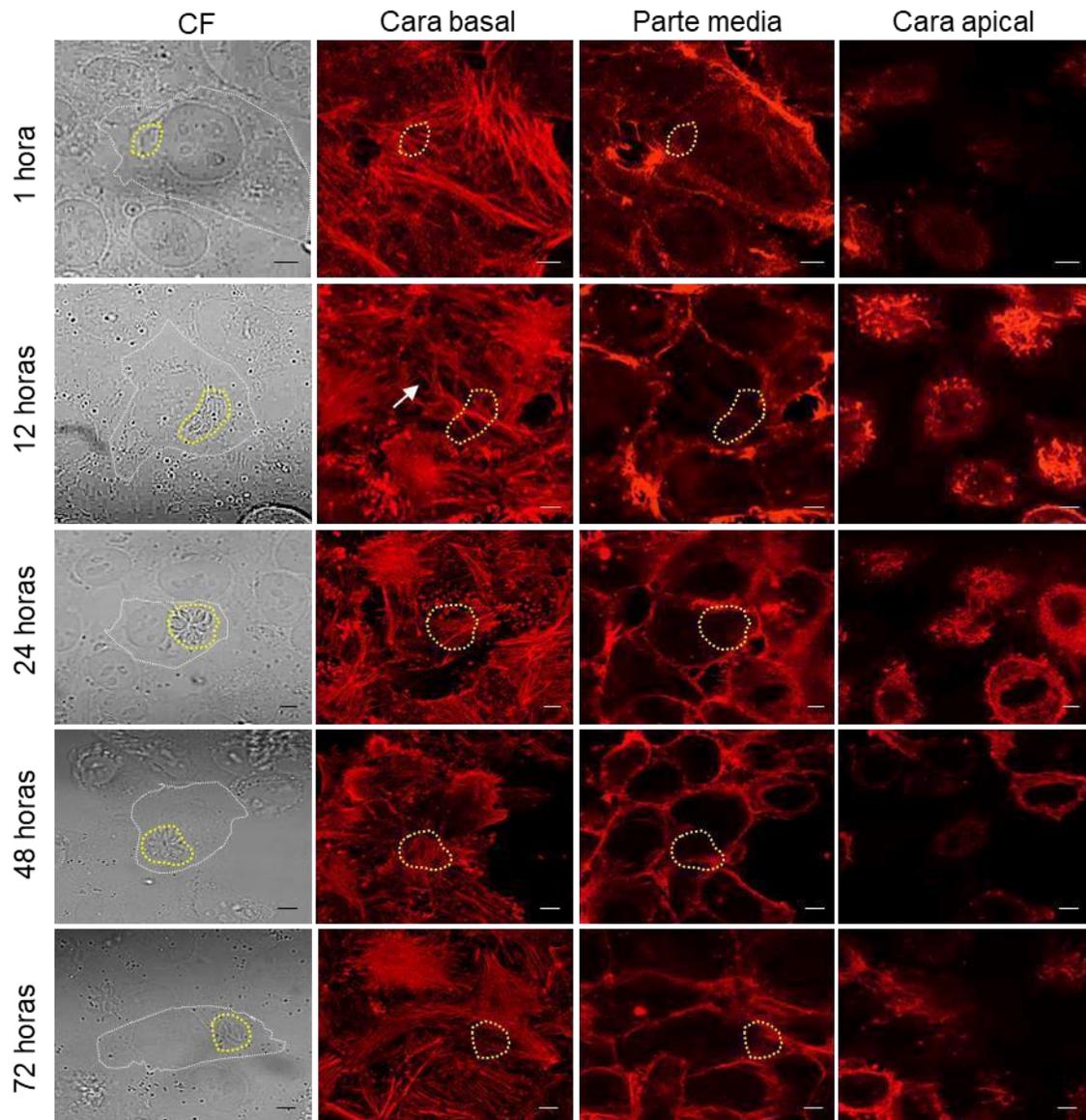
Con el fin de determinar si los filamentos de actina de la célula hospedera eran modificados como resultado de la cistogénesis inducida por AMF, se optimizaron las condiciones de marcaje y se conoció su distribución en células HEp-2 no invadidas. En experimentos previos realizados en el laboratorio se había reportado que la proliferación de taquizoítos en HEp-2, inducía una redistribución de los filamentos de actina citosólicos de la célula hospedera hacia las zonas de unión intercelular (Muñiz, *et al.*, 2004). Nosotros completamos en una primera fase estos datos realizando un curso temporal de proliferación de taquizoítos, invadiendo células HEp-2, y determinando su proliferación a: 1, 12, 24, 48 y 72

h. En estas condiciones, las células fueron teñidas para filamentos de actina. En la figura 46, se muestra la distribución de los filamentos de actina de células HEp-2 controles no invadidas. Como se ve en la cara basal se localizan los haces de filamentos que conforman las fibras de estrés características de las zonas de adhesión al sustrato, en la parte media se detecta la tinción de actina F en la parte cortical de la células que corresponde a las regiones de uniones intercelulares y finalmente en la parte apical se detecta la presencia de los filopodios.



**Figura 46. Distribución de los filamentos de actina F en las células HEp-2 a 48 h de proliferación.** Distribución de los filamentos de actina; Contraste Diferencial interferencial (DIC), rojo; Actina F marcada con Falacidina en las tres caras de la célula; basolateral, media y apical. n= 3. Escala = 10  $\mu$ m.

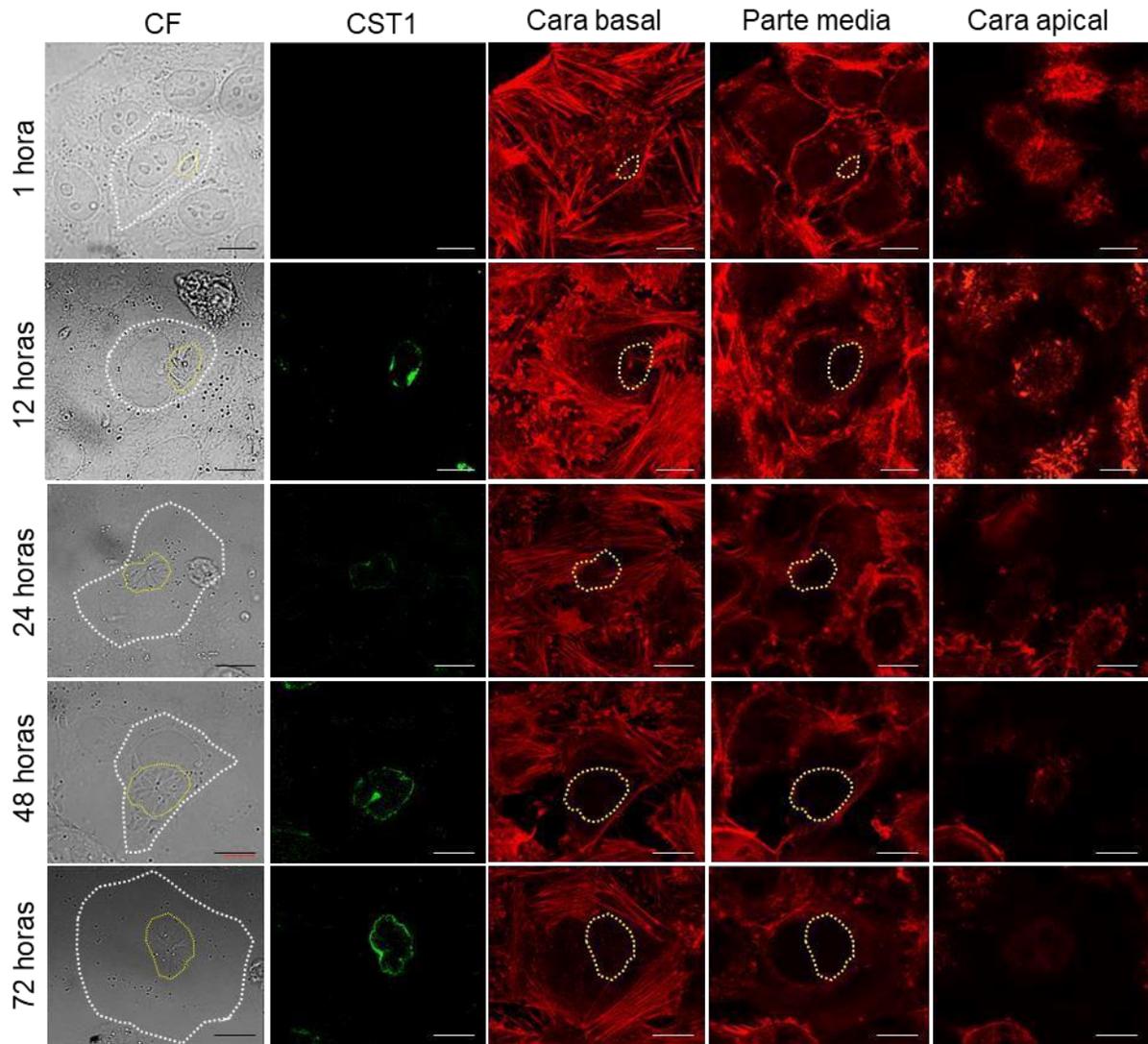
Cuando se estudió la distribución de actina F en células HEp-2 invadidas con taquizoítos y teñidas a diferentes tiempos de proliferación (Figura 47), se observó que los filamentos de actina de la célula invadida desaparecieron del citoplasma (ver imágenes de la parte media, flecha blanca) desde las 12 h, así como una pérdida de la definición del contorno celular lo cual representa una alteración posible de las uniones intercelulares toda vez que este tipo de uniones están estabilizadas por filamentos de actina así como por filamentos intermedios (Rubsam et al., 2017). Al mismo tiempo, se detectó la aparición de cúmulos discontinuos de actina sobre los límites celulares tanto de la célula invadida como de las células vecinas no invadidas, lo cual pudiera sugerir que durante la proliferación de los taquizoítos se liberan factores que afectan el citoesqueleto de las células vecinas. En la cara basal, se detectó solo en la célula invadida, una pérdida de las fibras de estrés y de las placas focales de adhesión a las 72 h de proliferación, esto podría sugerir que a ese tiempo se empieza a generar una posible alteración de la adhesión de la célula invadida al substrato. Esta disminución se determinó cuantificando la fluorescencia con el programa Image J con el cual obtuvimos que la actina F de las células infectadas disminuya hasta en un 15 % con respecto a una célula infectada de solo 1 h (Figura 49).



**Figura 47. Distribución de los filamentos de actina en las células HEp-2 por efecto de la proliferación de taquizoítos de *T. gondii*.** Contraste de fase (CF); rojo, Filamentos de actina marcados con falacidina-TRITC, marcando tres partes de la célula, la cara basolateral, apical y la parte media. En línea punteada de color amarillo se delimitan las membranas de las VP y en blanco la membrana de la célula hospedera. n = 3, Escala = 5  $\mu$ m.

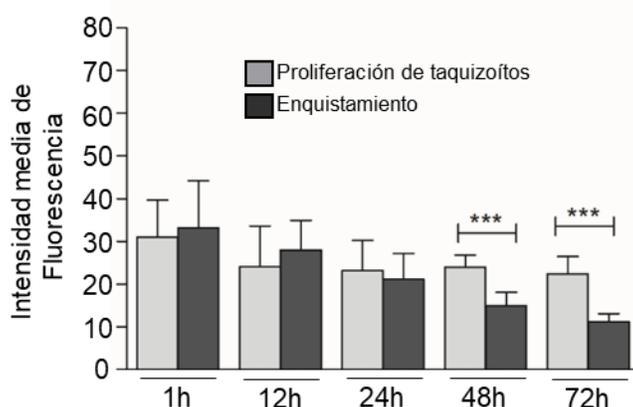
Con el fin de determinar si los filamentos de actina de la célula hospedera eran modificados como resultado de la citogénesis inducida por AMF, se realizó un curso temporal en el que se infectaron células con taquizoítos pre-tratados con AMF 50  $\mu$ g/ml y el citoesqueleto de actina F se marcó con falacidina-TRITC.

A una hora de proliferación, se detectaron fibras de estrés cortas formadas por filamentos de actina en la región basal de la célula hospedera así como la presencia de un patrón puntillado de actina F; en la parte media y apical de la célula invadida no se detectó algún cambio evidente a este tiempo de proliferación. A este tiempo no se detectó la expresión de la CST1. A las 12 h de proliferación después del tratamiento con AMF, se observó el inicio de la expresión de CST1 sobre la membrana de una VP. En las células con parásitos tratados con AMF, se detectaron pocos haces de filamentos de actina en la cara basal así como en la parte media de la célula, particularmente en la zona en donde se encontraba la VP positiva a CST1, en su lugar se detectó un fino puntillado; mientras que las células con VP's negativas a CST1 mostraron una acumulación de actina F en la periferia de cada célula, la célula que tenía la VP positiva a CST1 presentó una disminución de la marca de actina F en la periferia celular observable en la parte media de la célula. A las 24 h de proliferación de los taquizoítos tratados con AMF, se observó la pérdida de los haces contráctiles en la cara basolateral solo en la célula positiva a CST1 quedando solo una marca fluorescente difusa en el citoplasma, a nivel medio, se detectó una disminución de la marca de actina F en diversas zonas corticales de la membrana en contraste con las células vecinas que si presentaron la acumulación cortical de actina F. Se empezó a observar una separación de la célula HEp-2 positiva a CST1 de las células vecinas, así como una morfología más esférica muy parecida a un quiste tisular. A las 48 h de proliferación se detectó tanto a nivel basal, medio y apical una disminución de filamentos de actina. A las 72 h de proliferación del parásito, se observó una alteración evidente de los filamentos de actina en los tres niveles de la célula: basal, medio y apical. La célula positiva a CST1 presentó grandes zonas sin filamentos de actina tanto aparentemente no hay fibras de estrés, cinturones corticales en las zonas de adhesión intercelular así como la ausencia de filopodios. Esta cambios en el citoesqueleto de actina F podría involucrar parte de las modificaciones que darán lugar a que la célula que contiene la VP positiva a CST1 pierda su forma fibroblastoide y presente una forma esférica con la finalidad de favorecer la formación de la nueva estructura quística (Figura 48).



**Figura 48. Distribución de los filamentos de actina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEP-2 después del tratamiento con AMF.** Contraste de fase (CF), Rojo: filamentos de actina marcados con Falacidina, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP y en blanco la membrana de la célula hospedera. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m.

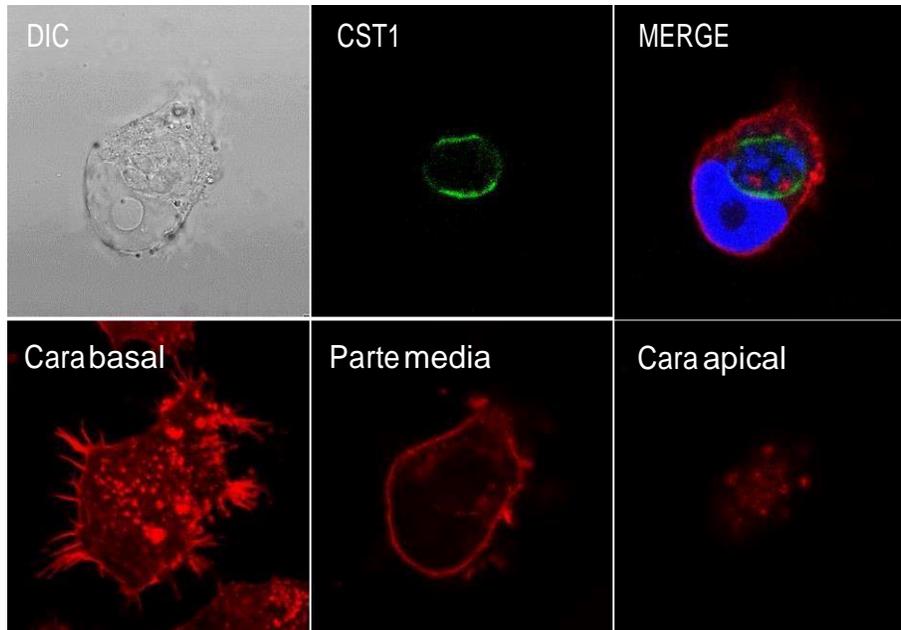
En la figura 49 se muestra la disminución de la expresión de actina F durante el proceso de cistogénesis inducida por el AMF. Estos datos se obtuvieron analizando el número de pixeles existentes en las regiones donde estaba ubicada la célula positiva a CST1 en comparación con células control invadidas pero no tratadas con AMF. A partir de las 48 h de proliferación, se encontró una diferencia significativa con respecto a la expresión de actina F en las células control.



**Figura 49. Determinación cualitativa de la expresión de Actina F durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii*.** Se infectaron células HEp-2 con taquizoítos de la cepa RH previamente tratados durante 4 horas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de AMF incubados por 1, 12, 24, 48 y 72 h. El control consistió en células HEp-2 invadidas con taquizoítos no tratados con AMF. \*\*\*  $p = < 0.0001$ . Se cuantificó el número de pixeles de las células positivas a CST1 en comparación con los pixeles de células invadidas no inducidas a cistogénesis.  $n = 3$ .

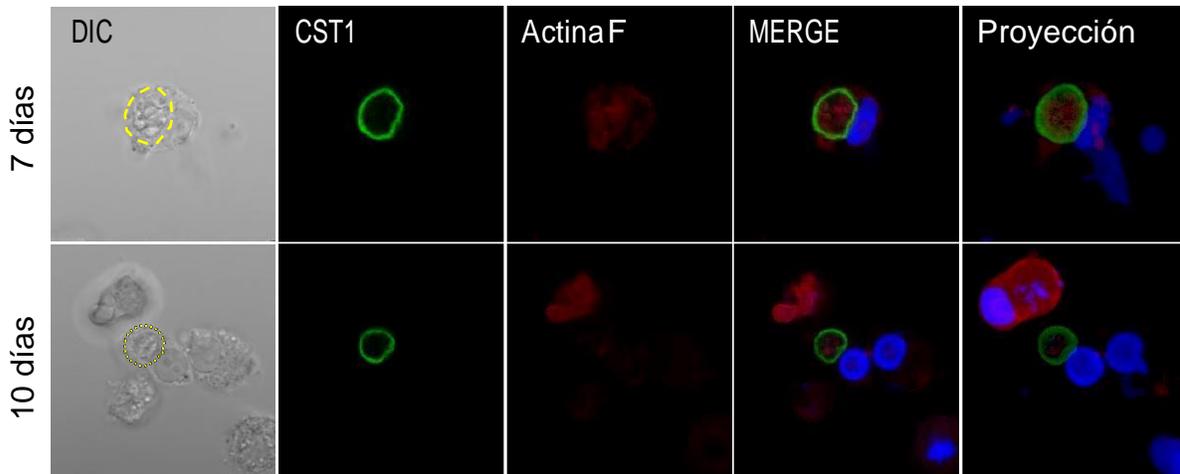
Dado que los estudios que teníamos de la formación del quiste eran hasta las 72 h de proliferación del parásito después de haber inducido su proceso de diferenciación y a este tiempo todavía no observábamos una estructura parecida a la de un quiste tisular decidimos prolongar nuestros tiempos de incubación hasta 10 días y analizar qué es lo que pasa con la organización de los filamentos de actina de la célula hospedero durante este proceso. A los 5 días se puede observar que la célula hospedera perdió su forma fibroblastoide, está completamente separada de las células vecinas pero todavía no pierde por completo las fibras de estrés en las zonas distales que le permiten mantener todavía el contacto con el sustrato, pero en el citoplasma de la célula ya no se

observa la presencia de filamentos, solo existen agregados de actina F, mientras que en la parte apical de la célula se pierden las microvellosidades (Figura 50).



**Figura 50. Distribución de los filamentos de actina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 a los 5 días después del tratamiento con AMF.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: filamentos de actina marcados con Falacidina, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC. n = 3. Escala = 5  $\mu$ m.

A los 7 días de incubación encontramos estructuras pre-quísticas siempre asociadas al núcleo de la célula hospedera, pero esta perdió por completo su forma característica de célula epitelial adquiriendo una forma esférica con la pérdida de los filamentos de actina en la cara basal, solo se observan unos agregados de actina alrededor de la estructura pre-quística, los cuales disminuyen de manera notable a los días de incubación (Figura 51).

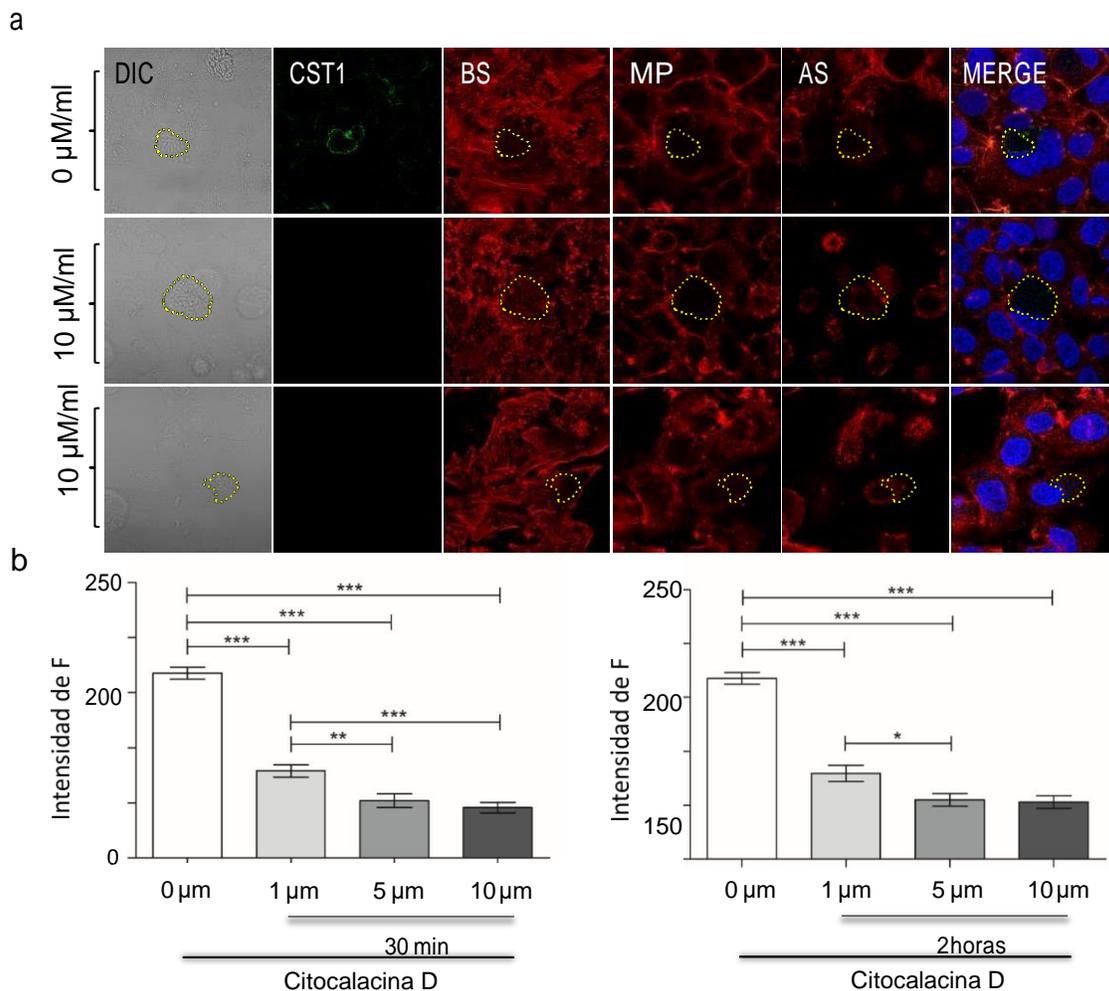


**Figura 51. Distribución de los filamentos de actina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEp-2 a los 7 y 10 días después del tratamiento con AMF.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: filamentos de actina marcados con Falacidina, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC. En línea interrumpida amarilla se delimita la membrana de la estructura pre-quística. n = 3. Escala = 5  $\mu$ m.

### 7.11 Efecto de la despolimerización de los filamentos de actina en el proceso de cistogénesis

Con el fin de determinar si los filamentos de actina de la célula hospedera eran necesarios para el proceso de cistogénesis, se incubaron células HEp-2 con 1, 5 y 10  $\mu$ g de citocalacina D (CD) por 30 min y 2 h, se retiró la CD y se infectaron con taquizoítos previamente tratados con AMF y se incubaron por 72 h, y las células invadidas se tiñeron con falacidina. Los resultados mostraron en primera instancia que no obstante la invasión se llevó a cabo de manera eficiente, la proliferación se bloqueó por el pre-tratamiento con la CD a las diferentes concentraciones usadas incluso al tiempo más prolongado de incubación de 72 h encontrándose VP con un solo parásito aún después de 72 de incubación, por otro lado también se alteró la forma celular y más importante, no se detectó la expresión de CST1 sobre la membrana de la VP ni se observaron estructuras esferoidales como las descritas en figuras anteriores. Estos resultados indicaron que los filamentos de actina son esenciales por un lado para la proliferación del parásito y por otro para diferenciarse al estadio de bradizoíto con expresión de CST1 que conforma la estructura quística (Figura 52).

Los filamentos de actina desaparecieron del citoplasma. Este ensayo corroboró que el tratamiento con CD bloqueó el proceso de cistogénesis inducido por el AMF.

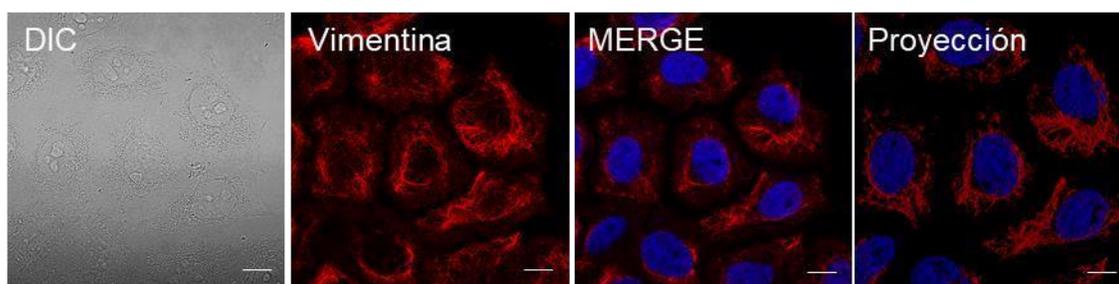


**Figura 52. Efecto de la despolimerización de los filamentos de actina en el proceso de cistogénesis. A.** El control positivo (0  $\mu\text{g/ml}$ ) corresponde a células HEp-2 infectadas con parásitos tratados con AMF. Contraste Diferencial interferencial (DIC); CST1, marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC; Filamentos de actina, marcados con falacidina-TRITC y en el MERGE: actina F, DAPI para núcleo y CST1. Con línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP.  $n = 3$ . Escala = 10  $\mu\text{m}$ . **b.** Cuantificación de intensidad de fluorescencia, prueba estadística utilizada t student \*\*\*  $p = < 0.0001$ , \*\*  $p = 0.0042$  y \*  $p = 0.0184$ .

### 7.12 Cambios en la distribución de los filamentos intermedios por efecto de la proliferación de taquizoítos y su proceso de diferenciación

Los filamentos intermedios son componentes del citoesqueleto que protegen a las células de fuerzas tensoriales ya sea externas o producto de la motilidad, cambio de forma, etc. Estos componentes del citoesqueleto no participan directamente en motilidad.

Con el fin de conocer la distribución de los filamentos intermedios durante el proceso de cystogénesis, inicialmente se analizó la distribución normal de estos filamentos en células epiteliales HEP-2 no invadidas mediante un inmuno- marcaje utilizando un anticuerpo anti-vimentina y anticuerpos secundario acoplado a TRITC. Los filamentos intermedios (FI) en células HEP-2 no infectadas, se encontraron formando una red homogénea que rodeaba al núcleo y se extendía por todo el citoplasma hacia la periferia celular (Figura 53).



**Figura 53. Distribución de FI de vimentina en células HEP-2.** Contraste Diferencial Interferencial (DIC); rojo, FI de vimentina marcados con un anticuerpo anti-vimentina y revelado con una anticuerpo secundario acoplado a TRITC; azul, núcleo marcado con DAPI y en el Merge; FI y núcleo. n= 4. Escala = 10  $\mu$ m.

En las células infectadas con taquizoítos de la cepa RH y en proliferación hasta por 72 horas se encontraron FI de vimentina distribuidos en el citoplasma, asociados a la membrana plasmática, rodeando al núcleo y a la VP (Figura 54, control). Interesantemente el marcaje alrededor del núcleo se incrementó hasta en un 50 % en células infectada con los taquizoítos a las 72 h de proliferación en comparación con la detectada a 1 h. La asociación de los filamentos intermedios como resultado de la invasión con taquizoítos de *T. gondii* ya había sido

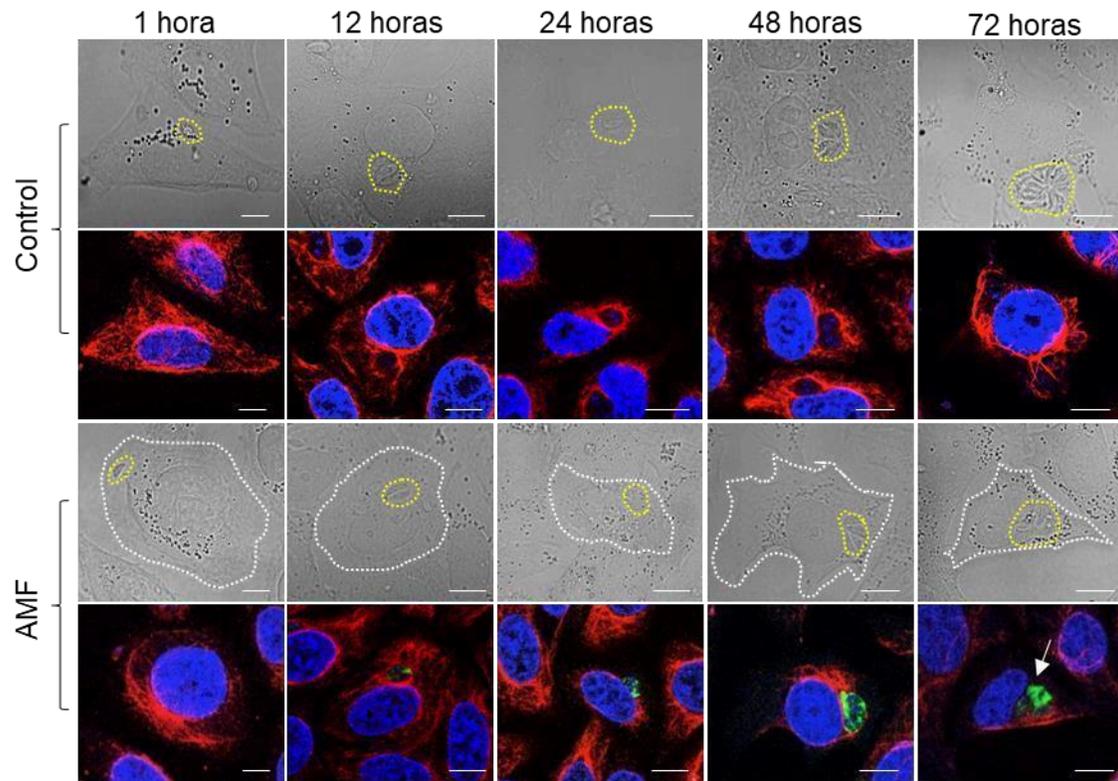
reportada previamente (Halonen & Weidner, 1994).

Para determinar si existen cambios en la distribución de los FI de vimentina durante la formación de la estructura pre-quística se realizó un curso temporal en el que se infectaron células HEp-2 con taquizoítos pre-tratados con AMF 50 µg/ml a TA, y se mantuvieron a diferentes tiempos. A 1 hora después del tratamiento con el AMF sobre el parásito, no hubo expresión de la CST1, sin embargo se detectó una marca de FI de vimentina asociada a la membrana de la VP (Figura 54) similar a la descrita anteriormente para el control de células HEp-2 invadidas con taquizoítos. La distribución en el resto del citoplasma de la célula hospedera no presentó modificaciones en su distribución. A las 12 h de proliferación se detectaron VP's positivas a CST1 con agregados fluorescentes (en verde) ubicados en los parásitos intravacuolares correspondientes a la glicoproteína CST1. En el citoplasma se siguieron detectando filamentos distribuidos por toda la célula. La marca fluorescente alrededor de las VP's no fue diferente a la observada en el control de células HEp-2 invadidas con taquizoítos y proliferados a ese mismo tiempo.

A las 24 h de proliferación, se detectó una evidente expresión de la glicoproteína CST1 dentro de los parásitos intravacuolares. Dentro de la VP se detectó una pérdida en la cohesión interparasitaria con ausencia de la roseta típica de proliferación y una disminución notable de la proliferación del parásito. En este tiempo, la célula hospedera invadida y conteniendo una VP's positivas a la presencia de CST1, presentaron una clara disminución de los filamentos intermedios de vimentina tanto en el citoplasma como alrededor de la VP (Figura 54, AMF). La marca de FI de vimentina se detectó alrededor del núcleo.

A las 48 h de proliferación, se observó la expresión de CST1 asociada a la membrana de la VP. Los filamentos de vimentina en forma similar a como se describió para el tiempo de 24 h, disminuyeron su presencia en el citoplasma y alrededor de la VP, permaneciendo solo aquellos con una distribución en la corteza nuclear (Figura 54, AMF). A las 72 h de proliferación, la marca de CST1 estuvo confinada a la periferia de la VP, adicionalmente se detectó una pérdida de los FI de vimentina en el citoplasma de la célula hospedera y la ausencia o una ligera marca asociada a la VP positiva a la CST1 (flecha blanca). La marca

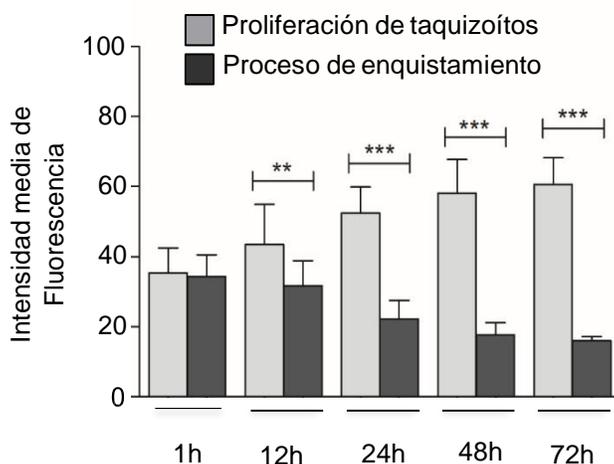
en verde de la CST1 se detectó solo de manera cortical en la VP y ausente en los parásitos intravacuolares. Por su apariencia con tendencia a la forma esférica y por el marcaje en la pared de la estructura, sugerimos la denominación a este tipo de arquitecturas con el nombre de estructuras pre- quísticas.



**Figura 54. Distribución de los filamentos de vimentina durante la proliferación de los taquizoítos y el proceso de diferenciación en células HEP-2 después del tratamiento con AMF.** Contraste de fase (CF), Rojo: filamentos de vimentina, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: núcleos marcados con DAPI. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP y en blanco la membrana de la célula hospedera. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m.

La cuantificación de la fluorescencia mediante la determinación del número de píxeles en las zonas correspondientes a la VP, mostró una clara disminución de la fluorescencia correspondiente a los filamentos intermedios en la zona circundante a la estructura pre-quística y un aumento en la fluorescencia

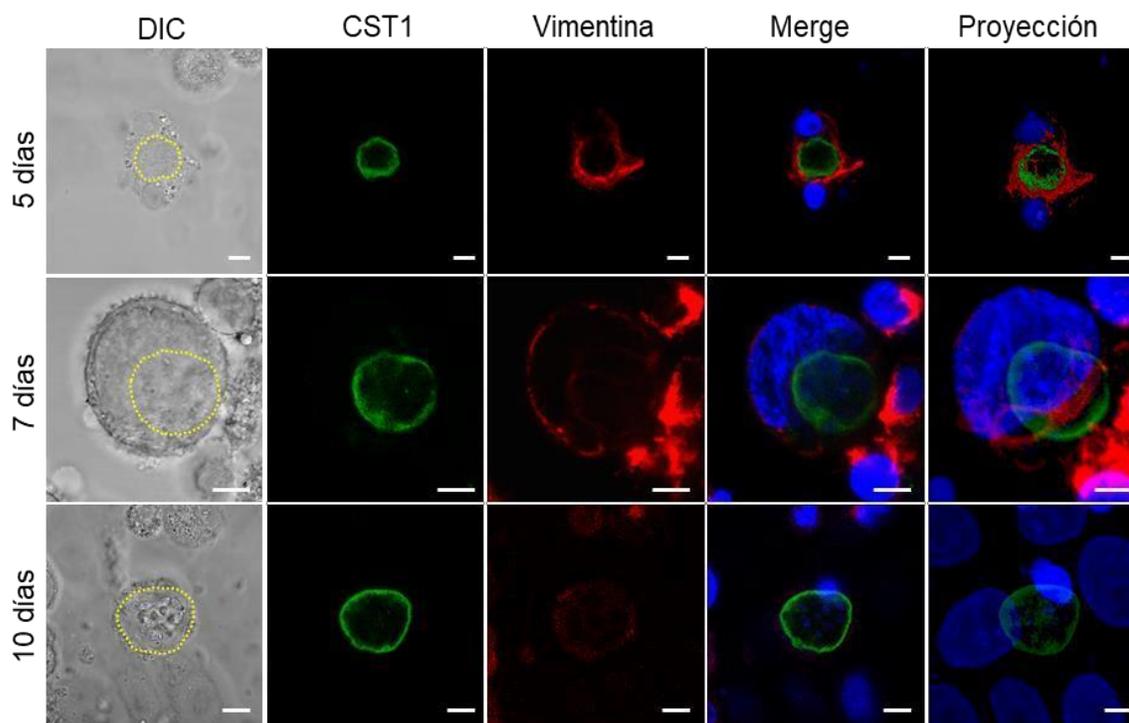
correspondiente a la expresión de la glicoproteína CST1 en la misma zona evaluada (Figura 55).



**Figura 55. Disminución de la expresión de vimentina durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii*.** Se infectaron células HEp-2 con taquizoítos de la cepa RH previamente tratados durante 4 horas con 50  $\mu\text{g/ml}$  de AMF incubados por 1, 12, 24, 48 y 72 h y teñidos con un colorante  $\alpha$ -vimentina. Se cuantificó el número de píxeles de la célula hospedera positiva a CST1 durante todo el curso temporal comparándose con el control que era una célula hospedera del mismo tiempo de proliferación negativa a CST1. \*\*  $p = < 0.0031$  y \*\*\*  $p = < 0.0001$ .  $n = 4$ .

Para analizar la distribución de los filamentos intermedios de vimentina durante la maduración de las estructuras pre-quísticas se mantuvieron los cultivos durante 5, 7 y 10 días. A los 5 días podemos observar que estos filamentos se reorganizan específicamente a la zona donde está situada la VP en proceso de diferenciación y alrededor del núcleo del hospedero. Esta asociación de los filamentos intermedios de vimentina se mantiene a los 7 días presentándose solamente entre estas dos estructuras, probablemente sean estos filamentos los responsables de mantener la asociación entre el núcleo y la VP en proceso de diferenciación. A los 10 días se disminuyen notablemente la marca que corresponde a los filamentos intermedios (figura 56). La disminución de los filamentos intermedios de vimentina en la célula hospedera infectada con la VP positiva a CST1 probablemente sea para que dicha célula sea más laxa y así

favorecer a la formación de la nueva estructura.

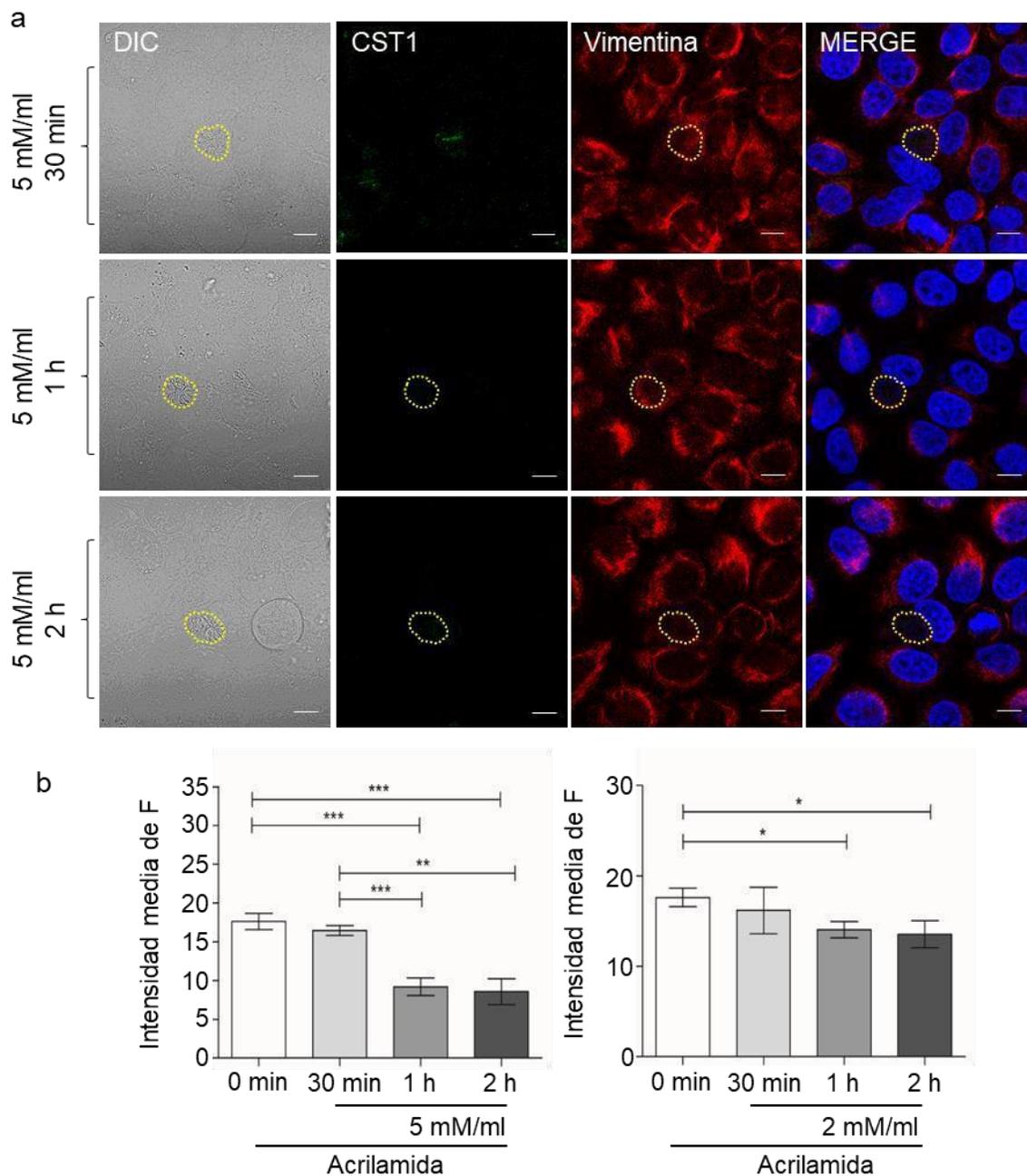


**Figura 56.** Distribución de los filamentos de vimentina durante el proceso de diferenciación de los parásitos en células HEP-2 después del tratamiento con AMF. Contraste de fase (CF), Rojo: filamentos de vimentina, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: núcleos marcados con DAPI. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la. n = 3. Escala = 5  $\mu$ m.

### 7.13 Efecto de la despolimerización de los filamentos intermedios de vimentina durante el enquistamiento de *T. gondii*

Con la finalidad de determinar si los filamentos intermedios de vimentina son esenciales durante la formación del quiste *in vitro*, se realizó un ensayo en el cual se despolimerizaron mediante el tratamiento con acrilamida a diferentes concentración (2 y 5 mM) y diferentes tiempos (30 minutos, 1 y 2 h) de acuerdo a lo reportado (Shiver, Sackett, Knipping, & Wolff, 1992). El tratamiento con acrilamida generó una disminución notable de los filamentos intermedios incluso en el tiempo y concentración más baja que fue de 2 mM de incubación. Por otro lado, solo detectamos expresión de la glicoproteína CST1 en la membrana de la estructura pre-quística en las muestras incubadas con 2 mM de acrilamida

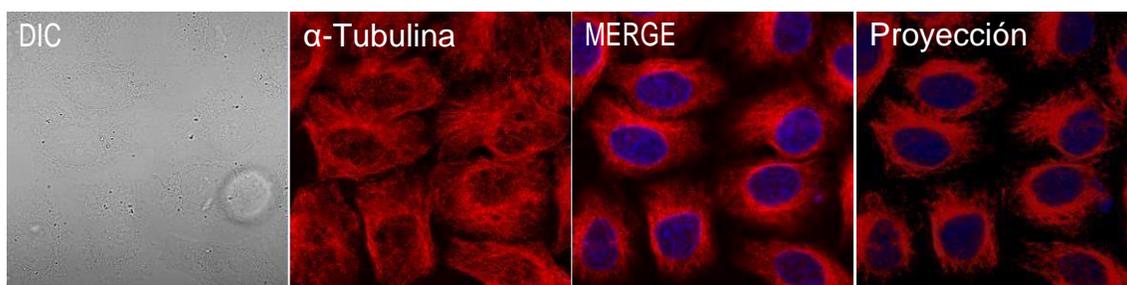
durante 30 min y 1 h obteniendo un porcentaje de estructuras positivas de 23 y 19 % respectivamente, las cuales no presentaron un marcaje definido en la membrana como ya se observa en los controles positivos a estos tiempos de incubación. El porcentaje de estructuras positivas a CST1 son menores comparadas con el control positivo en donde no se trataron con acrilamida en el cual se obtuvo un 53 %. En el caso de las muestras tratadas con 5 mM/ml de acrilamida por 30 min, 1 y 2 h se detectó solo el 10, 6 y 5 % de estructuras que presentaban un marcaje de CST1 pero al interior de los parásitos (Figura 57a). La cuantificación de intensidad media de fluorescencia nos indica que no hay una diferencia significativa entre el control positivo es decir el no tratado con acrilamida con el incubado con 2 mM/ml por 30 min y es por ello que si hay estructuras positivas pero la marca de CST1 no es tan definida como en las muestras donde no se trata con acrilamida. Por otro lado, en las muestras donde si hay diferencias significativas (en las tratadas con 5 mM) si hay una disminución en estructuras pre-quísticas, lo cual nos indica que los filamentos intermedios de vimentina juegan un papel importante en el proceso de formación del quiste *in vitro* de *T. gondii* probablemente para proporcionarle la resistencia a la nueva estructura en formación (Figura 57b).



**Figura 57. Efecto de la despolimerización de los filamentos de vimentina en el proceso de citogénesis.** Células HEp-2 infectadas con taquizoítos pre-tratados con AMF y posteriormente tratadas con 2 y 5 d mM de acrilamida por 30 min, 1 y 2 h e incubados por 48 h en MEM al 8 % SFB. Contraste Diferencial Interferencial (DIC), Verde, CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC; rojo, filamentos de vimentina y en el MERGE: actina F, DAPI para núcleo y CST1. Con línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m. **b.** Cuantificación de intensidad de fluorescencia, prueba estadística utilizada t student. \*\*\* p = < 0.0005, \*\* p = 0.0022, \* p = < 0.0420.

### 7.14 Cambios en los microtúbulos durante la proliferación de taquizoítos y el enquistamiento de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*

Los microtúbulos en la célula HEp-2 se observan distribuidos en todo el citoplasma de la célula, mediante la tinción de la proteína alfa tubulina, se detecta una mayor marca alrededor del núcleo de la célula probablemente porque ahí se encuentra el centro organizador de los microtúbulos llamado centrosoma (Figura 58), algunas de las funciones de estos filamentos son el transporte intracelular de vesículas y organelos en el citoplasma y la separación de los cromosomas durante la mitosis.

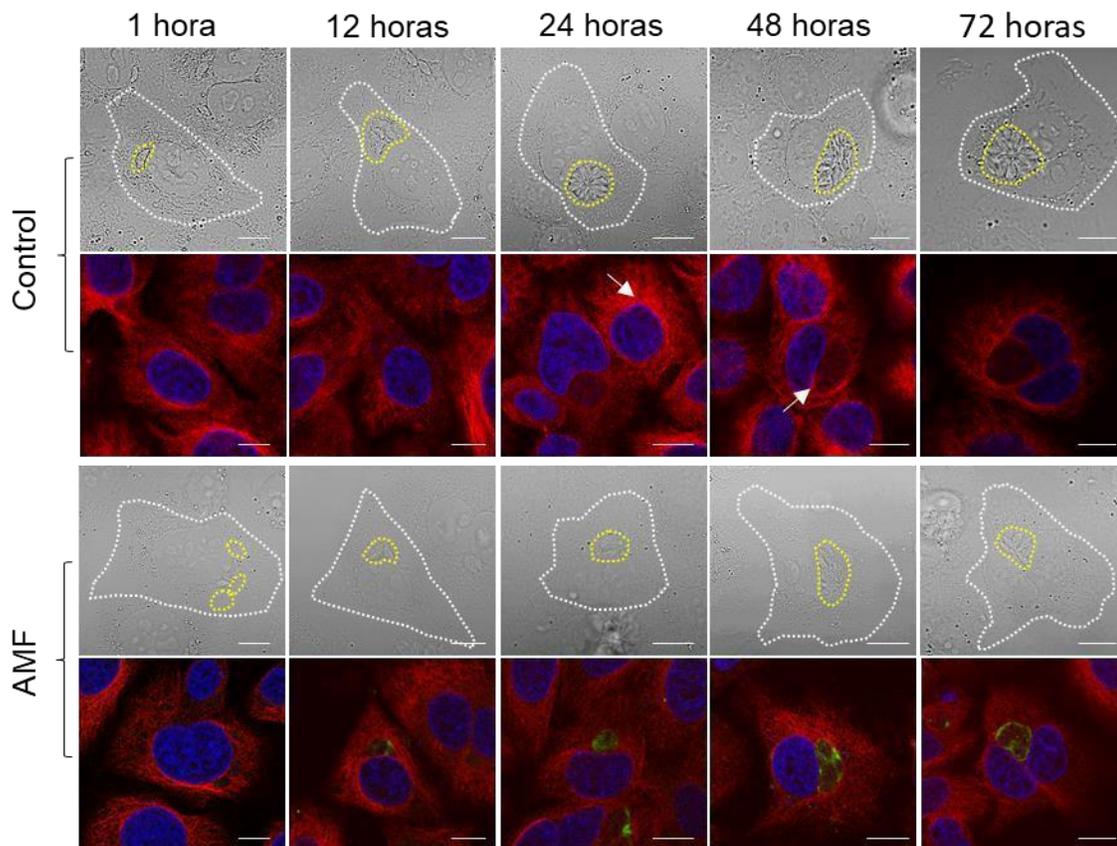


**Figura 58. Distribución de los microtúbulos en la célula HEp-2.** Contraste Diferencial interferencial (DIC), Rojo: microtúbulos, Azul: núcleos marcados con DAPI. n= 3. Escala = 10  $\mu\text{m}$ .

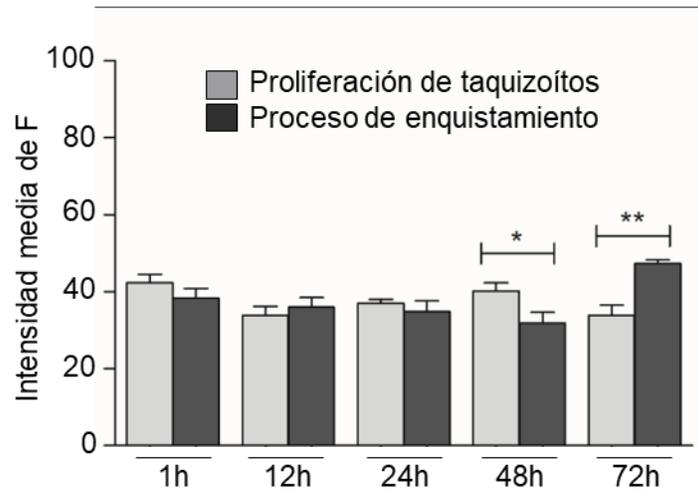
Para determinar los cambios en la organización de los microtúbulos durante la proliferación de taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* se realizó un curso temporal desde la hora hasta las 72 h de proliferación del taquizoíto, después de cada tiempo se fijaron las células y se realizó una tinción contra alfa tubulina. Los resultados obtenidos indicaron que hay una distribución homogénea en todo el citoplasma de la célula hospedera, focalizándose alrededor del núcleo de la misma y de la vacuola parasitófora, observando que hay unas secciones en donde hay un marcaje de la fluorescencia más intenso, probablemente ahí es donde se encuentra en centro organizador de los microtúbulos el MTOC (Figura 59, flechas blancas, control).

Durante el proceso de diferenciación del parásito se analizaron los cambios en los microtúbulos observando que no se detectaban cambios dramáticos en la

distribución o en la cantidad de filamentos con respecto a la organización presente durante la proliferación del taquizoíto, ya que se observaron en todo el citoplasma del hospedero con una marca más intensa alrededor del núcleo y también cubriendo por completo la estructura pre-quística hasta las 72 h (Figura 59, AMF). Cuando se realizó la cuantificación e intensidad media de fluorescencia se determinó que no hay diferencia significativa en los primeros tiempos, pero a las 72 h de proliferación después del tratamiento con AMF se detectó un incremento de los microtúbulos adyacentes a la estructura pre-quística (Figura 60), posiblemente para reclutar a organelos del hospedero, y con ello facilitar la adquisición de moléculas del hospedero que el parásito requiera para su división celular y proceso de diferenciación.

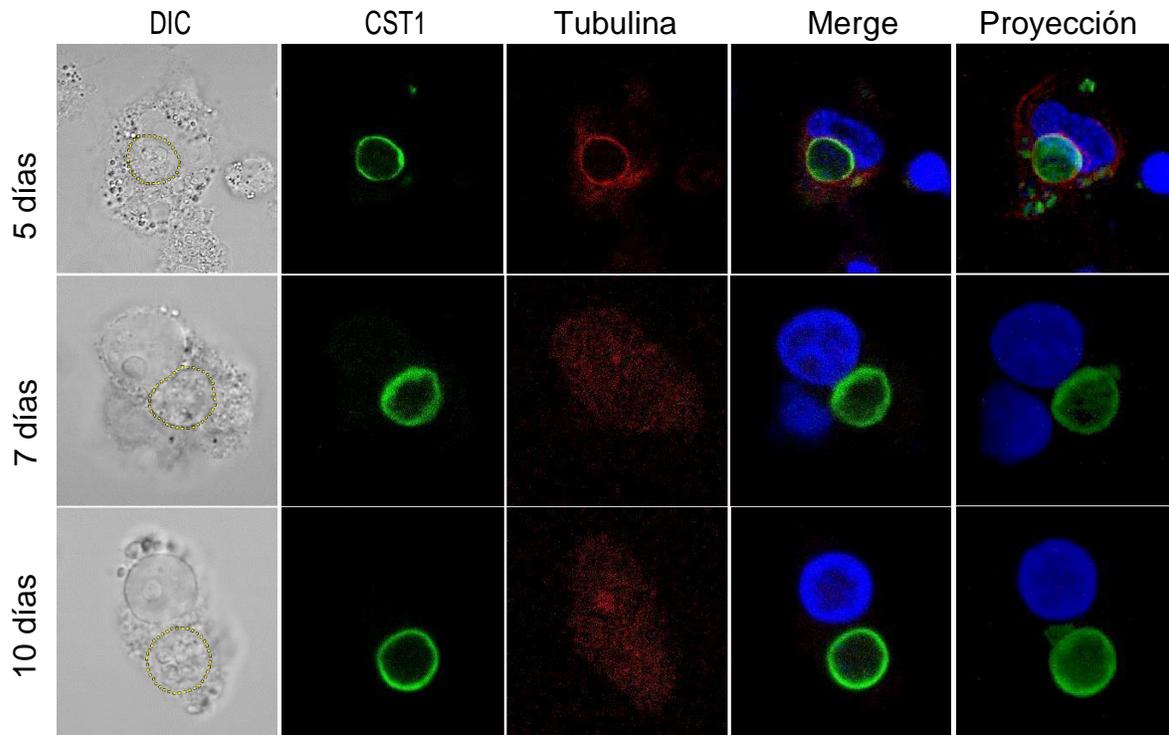


**Figura 59. Distribución de los microtúbulos durante la proliferación de los taquizoítos y el proceso de diferenciación en células HEp-2 después del tratamiento con AMF.** Contraste de fase (CF), Rojo: microtúbulos, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: núcleos marcados con DAPI. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP y en blanco la membrana de la célula hospedera. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m.



**Figura 60. Determinación cualitativa de la expresión de microtúbulos durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii*.** Se infectaron células HEp-2 con taquizoítos de la cepa RH previamente tratados durante 4 horas con 50 µg/ml de AMF incubados por 1, 12, 24, 48 y 72 h. El control consistió en células HEp-2 invadidas con taquizoítos no tratados con AMF. \*  $p = 0.0237$  y \*\*  $p = 0.0015$ . Se cuantificó el número de pixeles de las células positivas a CST1 en comparación con los pixeles de células invadidas no inducidas a cistogénesis.  $n = 3$ .

Dado que el análisis de la distribución de los microtúbulos se tenía hasta las 72 h, se realizó nuevos cultivos los cuales se incubaron por 5, 7 y 10 días para determinar cuál es la organización de estos filamentos. A los 5 días se puede observar que los microtúbulos se encuentran dispuestos principalmente alrededor de la estructura pre-quística y un poco hacia el núcleo del hospedero, mostrando una marca puntillada en el citoplasma del hospedero, misma que se mantiene e incrementa en las muestras de 7 y 10 días indicando la despolimerización o fragmentación de estos filamentos (Figura 61).

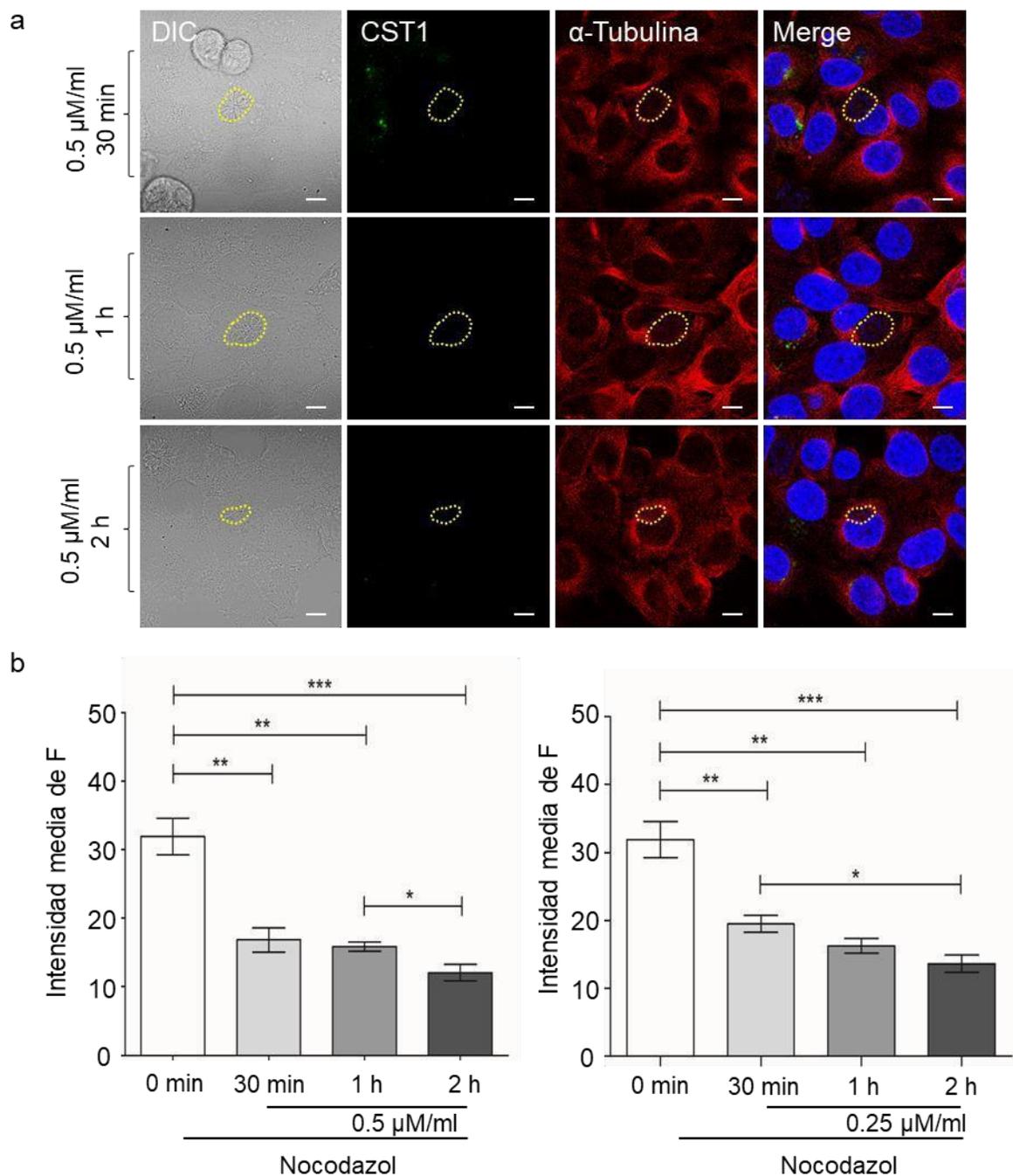


**Figura 61. Distribución de los microtúbulos durante el proceso de diferenciación a los 5, 7 y 10 días en células HEP-2 después del tratamiento con AMF.** Contraste Diferencial Interferencial (DIC), Rojo: microtúbulos, Verde: CST1 marcado con la lectina *D. biflorus*-FITC, Azul: núcleos marcados con DAPI. En línea de color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP y en blanco la membrana de la célula hospedera. n = 3. Escala = 10  $\mu$ m.

### **7.15 Efecto de la despolimerización de los microtúbulos durante el enquistamiento de *T. gondii***

Para determinar si los microtúbulos son requeridos durante la formación del quiste *in vitro*, se realizó un experimento en el cual se despolimerización mediante el tratamiento con nocodazol a diferentes concentración (0.25 y 0.5  $\mu$ M/ml) y diferentes tiempos (30 minutos, 1 y 2 h). Los datos obtenidos nos indicaron que el tratamiento con nocodazol si despolimeriza los microtúbulos incluso en el tiempo y concentración más baja, además en ninguna condición del tratamiento con nocodazol se detectó expresión de la glicoproteína CST1, por lo tanto no hubo proceso de diferenciación del parásito (Figura 61). Cuando se determinó la cuantificación de intensidad media de fluorescencia detectamos que hay una diferencia significativa en todas las muestras tratadas con nocodazol comparado con el control positivo en donde no se incubó con el

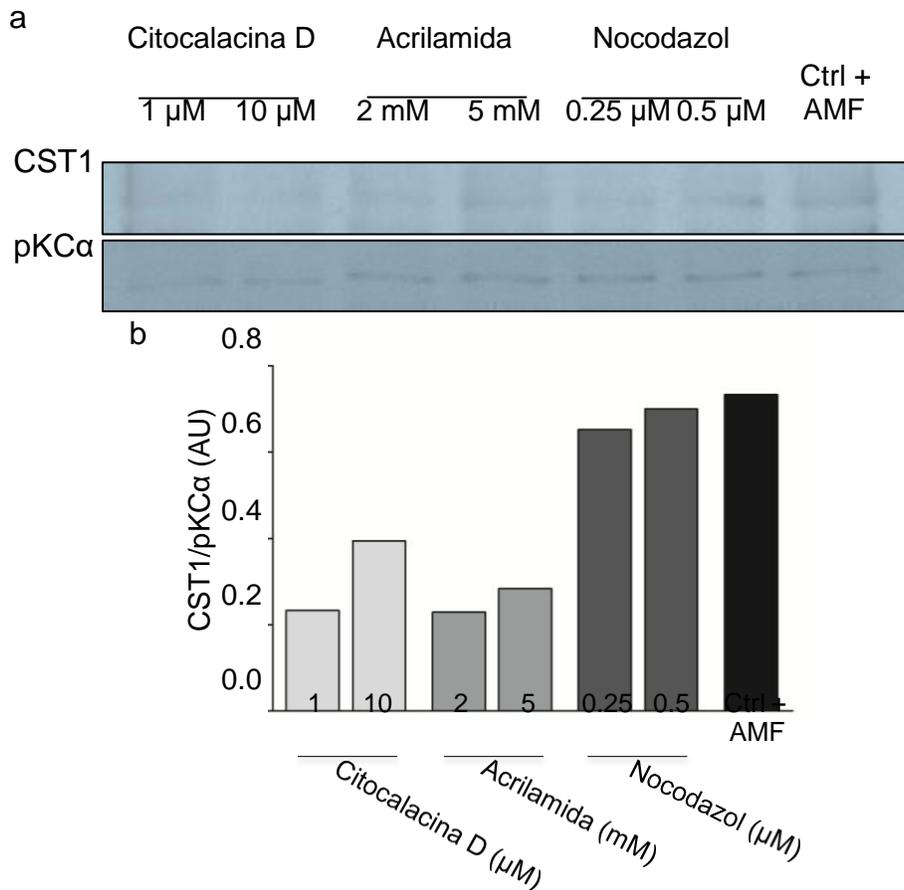
nocodazol (Figura 62) y en el cual se obtuvo un 48 % de estructuras positivas a CST1.



**Figura 62. Efecto de la despolimerización de los microtúbulos en el proceso de cigotogénesis.** Células HEp-2 infectadas con taquizoítos pre-tratados con AMF y posteriormente tratadas con 0.25 y 0.5 μM de nocodazol por 30 min, 1 h y 2 h e incubados por 48 h en MEM al 8 % SFB. Contraste Diferencial Interferencial (DIC), Verde, CST1 marcado con la lectina *D.biflorus*-FITC; rojo, microtúbulos y en el MERGE: microtúbulos, DAPI para núcleo y CST1. Con línea de

color amarillo interrumpida se delimita la membrana de la VP. n= 3. Escala = 10  $\mu$ m. **b.** Cuantificación de intensidad de fluorescencia, prueba estadística utilizada t student \*\*\*  $p = < 0.0005$ , \*\*  $p = < 0.0075$ , \*  $p = < 0.0251$ .

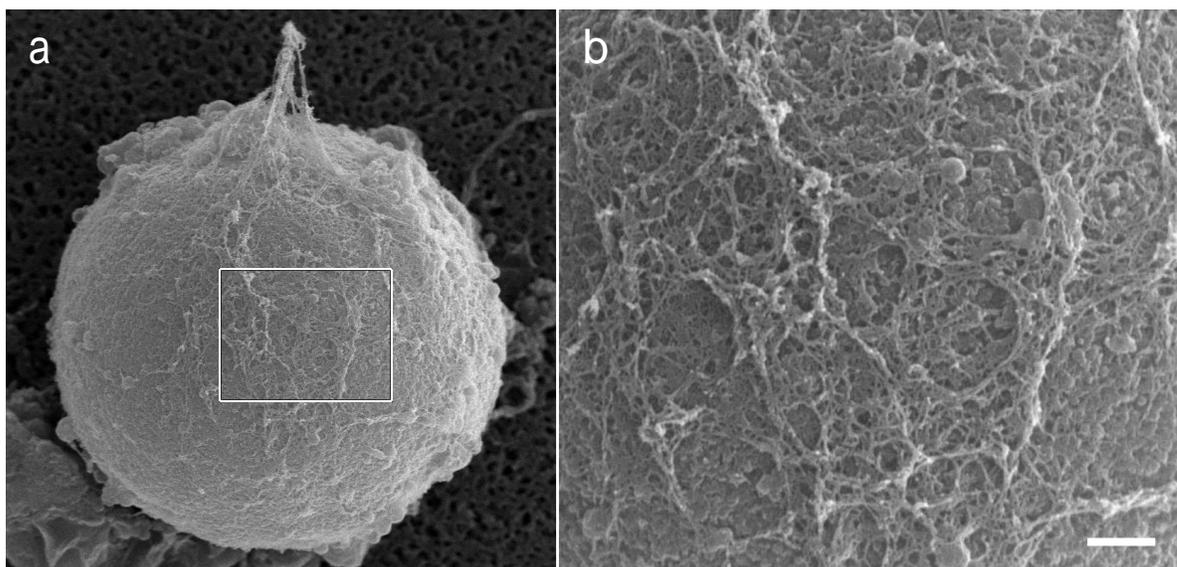
Con el objetivo de determinar si por efecto de despolimerizar el citoesqueleto de la célula hospedera (filamentos de actina, filamentos intermedios de vimentina y microtúbulos con Citocalacina D, Acrilamida y Nocodazol respectivamente), había una modificación en el transporte de la glicoproteína CST1 y por ello en las imágenes de fluorescencia vemos la marca a nivel citoplásmico o probablemente por un bloqueo río arriba, es decir en la síntesis de la molécula, realizamos un Wb en el cual la muestra fue tratada con fármacos que despolimerizaban diferentes filamentos a diferentes concentraciones y realizamos el Wb contra CST1. Como podemos observar en la figura 63a, a medida que se incrementa la concentración del fármaco utilizado se disminuye la expresión de CST1, pero no llega a cero el nivel de expresión incluso en las concentraciones más altas evaluadas, como control de carga se utilizó pKC $\alpha$ , la cual también sirvió para normalizar los datos obtenidos en el análisis densitométrico (Figura 63b). Los resultados mostraron que si hay una disminución en la expresión de la glicoproteína dado que la marca va disminuyendo con respecto a la concentración del fármaco empleado, es decir es dosis dependiente, lo cual nos indicó que hay una modificación a nivel de la síntesis de la molécula.



**Figura 63. Efecto de la despolimerización del citoesqueleto en la expresión de CST1. a.** Western blots de extractos totales de células HEp-2 invadidas con taquizoítos extracelulares pre-tratados con 50  $\mu$ g/ml AMF, posteriormente tratadas por 2 h con Citocalacina D, acrilamida o nocodazol y mantenidas en proliferación por 72 h. El control positivo donde no se expusieron los parásitos a ningún fármaco despolimerizador de citoesqueleto está representado con Ctrl+ AMF. La expresión de pKCa se utilizó como control de carga. **b.** Análisis densitométrico de la expresión de CST1 determinado del western blot en (a); los valores están representados en unidades arbitrarias.

### 7.16 Análisis de la estructura de quistes tisulares de la cepa ME49

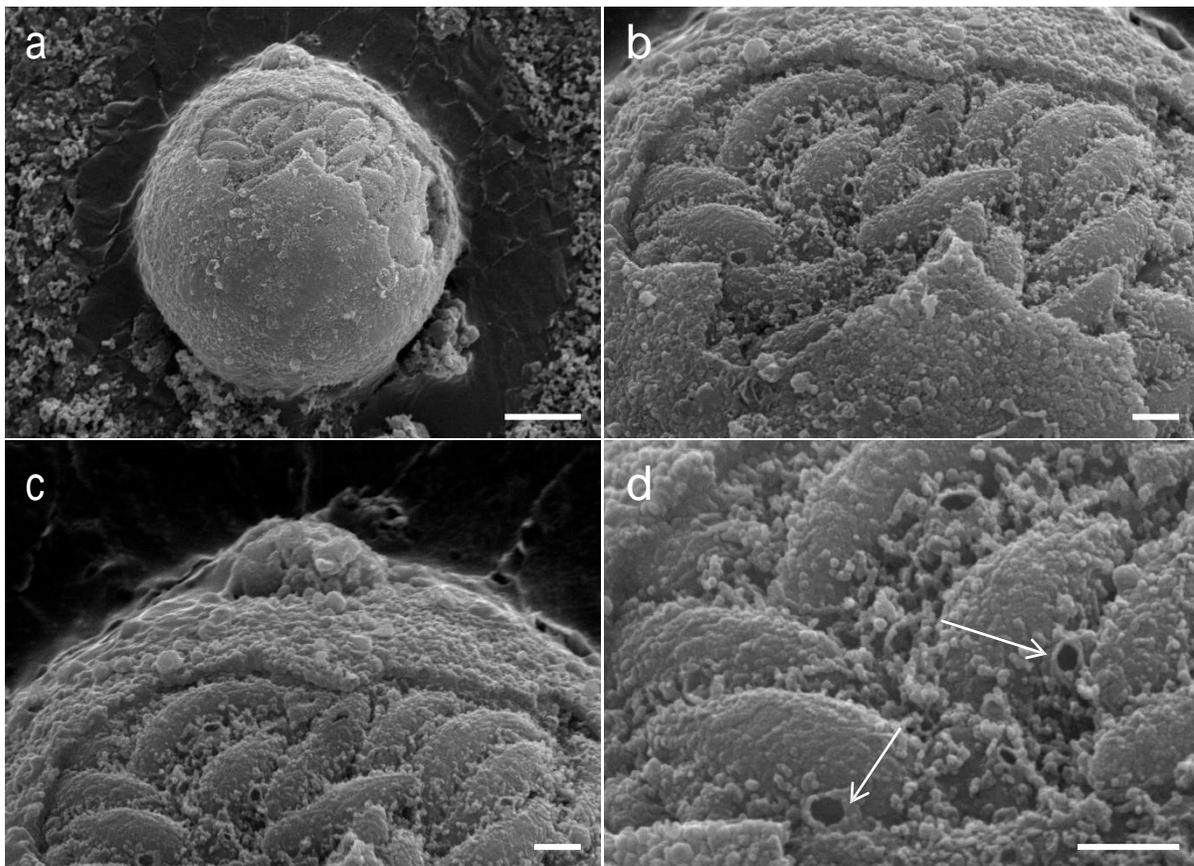
Con el fin de conocer a fondo el modelo de estudio de quistes tisulares del modelo murino de la cepa ME49 de *Toxoplasma* y poder compararlos con los quistes obtenidos *in vitro* de la cepa RH mediante el tratamiento con el AMF, es decir si presentaban características ultra-estructurales similares se procesaron quistes aislados de cerebro de ratones infectados por microscopía electrónica de barrido. Los quistes aislados tuvieron una estructura esférica con un diámetro aproximado de 20-40  $\mu\text{m}$ . Presentaron una cubierta áspera y rugosa, con una malla fibrosa cubriendo por completo al quiste, de la cual no se ha estudiado su naturaleza, y si proviene del hospedero como una forma de crear una barrera para delimitar la zona en la que se encuentra el quiste, o si es el parásito el que la sintetiza como una forma de evadir la respuesta inmune de hospedero (Figura 64).



**Figura 64. Quistes cerebrales de la cepa ME49 observado por SEM. a.** Micrografía de un quiste purificado por SEM. **b.** Micrografía de alta amplificación (mostrado en a por un recuadro blanco) de la superficie del quiste. n = 5. Escala en a = 5  $\mu\text{m}$  y en b = 1  $\mu\text{m}$ .

A estos quistes se les realizó la técnica de Tanaka para eliminar la membrana

apical y poder analizar el interior de la estructura y la organización de los bradizoítos. Gracias a esta técnica se pudo apreciar la forma en la que están organizados los bradizoítos dentro del quiste tisular, se observa que están completamente empaquetados para optimizar el espacio intraquístico y embebidos en una red fibrosa con apariencia esponjosa. Además se observaron una pequeñas vesículas envueltas en dicha red (Figura 65d, flechas), cuya función aparente es enriquecer la red fibrosa (Figura 65).



**Figura 65. Imágenes de microscopía electrónica que muestran la organización interna de los bradizoítos. a.** organización interna de los bradizoítos embebidos en una matriz fibrosa. **c-d.** Micrografías de zonas amplificadas del inserto a. n = 3. Escala en a = 5  $\mu\text{m}$  y en c-d = 1  $\mu\text{m}$ .

## VIII.- Discusión

La localización de *Toxoplasma* dentro de los quistes tisulares es una de las características más importantes que les proporciona una barrera contra la respuesta inmune del hospedero infectado (como lo es la fagocitosis y la citotoxicidad de las células, la actividad de los anticuerpos y de células efectoras como lo son las citosinas) y contra la actividad de fármacos parasiticidas (Lang, 2007). A la fecha se tiene poca información sobre los eventos moleculares y biológicos que ocurren durante la formación del quiste tisular. Por tal motivo se han desarrollado diferentes estrategias experimentales con las cuales se pueda inducir el proceso de diferenciación y la formación del quiste *in vitro*, como lo es el mantenimiento de los cultivos a pH alcalino (Soete, Camus, & Dubremetz, 1994), a altas temperaturas (43°C) (Sullivan & Jeffers, 2012), por exposición a antibióticos como la pirimetamina y clindamicina, por la exposición a citocinas como IFN-gamma (Lang, Gross, & Luder, 2007) o por la privación de nutrientes (Fux et al., 2007). El problema de estos protocolos es el tiempo en el cual se obtiene un resultado positivo de la inducción de la formación del quiste, que va desde semanas hasta meses comparado con el de tratamiento con AMF que es desde las 12 h, además de la reproducibilidad con la que se obtiene el resultado.

En la búsqueda de diferentes compuestos que mostraran propiedades parasiticidas contra *Toxoplasma*, probamos el fármaco inmunosupresor ácido micofenólico (AMF), el cual se utiliza comúnmente para prevenir el rechazo agudo de trasplante alogénico y enfermedades autoinmunes. Este fármaco es un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), que cataliza una reacción implicada en la síntesis *de novo* de purinas, importante para la síntesis de ARN y ADN. *Toxoplasma* expresa una variante de la enzima IMPDH, nombrada como TgIMPDH, la cual tiene la misma función que la enzima de humano IMPDH tipo II en términos de la biosíntesis de GMP (Hedstrom, 2009). Dado que la enzima del parásito presenta los mismos sitios de unión al fármaco que la enzima de humano, este se puede utilizar para bloquear el metabolismo de purinas en el parásito. El uso del fármaco se justificó por que actualmente se utiliza en el tratamiento de enfermedades autoinmunes debido a su capacidad

para reducir la proliferación de linfocitos T y B, (Chen et al., 2015; Wagner et al., 2015). Por otra parte considerando que el ciclo replicativo de *Toxoplasma* se da un lapso de 6 horas aproximadamente (Gubbels, White, & Szatanek, 2008; Radke et al., 2001), mientras que el ciclo replicativo de la célula hospedera HEp-2 es aproximadamente de 12 horas (Moore, Sabachewsky, & Toolan, 1955), fue posible plantearnos la hipótesis de que la tasa de proliferación de los parásitos sería la primera afectada por el tratamiento farmacológico.

Aunque los resultados mostraron que el tratamiento con el fármaco no ejerció una acción parasitaria, los parásitos mostraron una organización intravacuolar modificada. Las células hospederas infectadas adquirieron formas esferoides con PV's atípicas que contenían parásitos distribuidos de manera desorganizada sin una aparente cohesión interparasitaria. La pérdida de la disposición intravacuolar y la asincronía en la proliferación del parásito son dos características ya descritas para los quistes tisulares (Dzierszinski et al., 2004). Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con AMF indujo en la célula hospedera invadida con la cepa RH una transformación en una estructura pre-quística. La expresión de CST1 asociada a la membrana PV apoyó tal propuesta.

El proceso hacia la formación de una estructura pre-quística se siguió utilizando como marcador la lectina de *Dolichos biflorus*, la cual une específicamente dominios tipo mucinas formados por la N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina presentes en la glicoproteína CST1 de la pared del quiste tisular (Tomita et al., 2013). Se ha propuesto que la glicoproteína CST1 contribuye en proporcionarle estabilidad a la pared quística, por lo que su depleción da como resultado la formación de quistes débiles debido a la presencia de paredes más delgadas (Tomita et al., 2013).

A la fecha, los mecanismos de enquistamiento de *Toxoplasma* permanecen poco claros. En el modelo animal es imposible determinar el tiempo preciso en el cual se da la conversión de taquizoíto hacia quiste, por tal motivo se han desarrollado diversas estrategias experimentales con la finalidad de inducir la transformación de una célula invadida en una estructura quística *in vitro*.

En general las estrategias para inducir la diferenciación del estadio de taquizoíto a bradizoíto consisten en mantener a la célula infecta en condiciones de estrés, como lo es mantener el cultivo en pH alcalino (8.2) (Ferreira da Silva Mda et al., 2008).

Aunque con estas estrategias se obtiene la inducción del enquistamiento, los tratamientos per se producen un gran daño en el cultivo, con pérdida de la integridad celular incluso en tiempos cortos de mantenimiento, limitando por lo tanto la oportunidad de estudiar los eventos biológicos que tienen lugar durante este fenómeno. Además estas estrategias suelen realizarse con cepas clasificadas como “formadoras de quiste” de cepas tipo II y III como lo es la cepa ME49, ya que son menos virulentas (Lau et al., 2016; Sullivan & Jeffers, 2012).

La conversión inducida por el tratamiento con AMF, fue lograda en la cepa RH de tipo I de *Toxoplasma*, la cual es considerada como no formadora de quiste por su alto grado de virulencia, ya que mata al hospedero antes de que este active una respuesta inmune en contra del patógeno (Sullivan & Jeffers, 2012).

Debido a que la exposición del fármaco fue sólo en taquizoítos, la integridad de las células hospederas no se vio afectada, por lo que la evolución de la formación del quiste se siguió en detalle no sólo en los parásitos o en la VP, sino también en la morfología de la célula hospedera. El mantenimiento de tales cultivos invadidos durante un período prolongado de hasta 10 días además de obtener los quistes, permitió el análisis de las modificaciones del hospedero.

El análisis morfológico de las estructuras pre-quísticas evidencio la presencia de bradizoítos embebidos en una matriz intra-quística, similar a la reportada para los quistes aislados del modelo de encefalitis murino (Dubey et al., 1998). Todos estos resultados evidenciaron la posibilidad de obtener quistes de la cepa RH con características similares a quistes de la cepa tipo II, como lo es la obtención de la pared quística. Al analizar los quistes de 10 y 15 días obtenidos mediante el tratamiento con AMF por microscopía electrónica nos percatamos que los bradizoítos embebidos dentro de esta estructura estaban en proceso degenerativo, lo cual indica que se requiere de algún o algunos componentes desconocidos que no están presentes en el medio de cultivo que sería necesario

para la sobrevivencia del parásito y una maduración completa del quiste, como ocurre en un hospedero homotermo infectado. Esta aseveración la confirmamos cuando infectamos ratones de la cepa C57BL6 por vía oral con estos quistes purificados, ya que después de dos meses, al extraer el cerebro y procesarlo no fue posible obtener quistes maduros. A pesar de no obtener quistes completamente maduros, esta estrategia permitió realizar el análisis en detalle de la formación del quiste y los cambios que ocurren durante este fenómeno, tanto en la célula hospedera como en la VP.

La probable identidad de las proteínas diferencialmente expresadas durante el proceso de diferenciación del parásito se logró mediante el análisis de los geles de bidimensionales, teniendo en cuenta el pI y PM de los spots y la respectiva búsqueda bioinformática en la base de datos de Toxodb.org. Algunas proteínas como lo es la GRA1 y otras hipotéticas fueron deducidas del análisis por ser relacionadas con en el proceso de diferenciación y en la formación del quiste tisular (Ferguson, 2004). Además, otras proteínas disminuyeron su expresión durante la formación del quiste, por lo tanto corresponderían a proteínas exclusivamente encontradas en el estadio de taquizoíto.

Trabajos previos han reportado que organelos del hospedero como las mitocondrias, retículo endoplásmico y el núcleo, se redistribuyen hacia la periferia de la VP (Sinai & Joiner, 2001; Sinai et al., 1997). Al analizar los cambios que surgen en las modificaciones del núcleo del hospedero por efecto de la proliferación del taquizoíto y por el proceso de diferenciación del parásito y formación de una estructura quística, nos encontramos que la VP desde la hora de proliferación ya está localizada cercana al núcleo y esta asociación no cambia con respecto al tiempo de proliferación del parásito como ya se había reportado. Interesantemente, cuando analizamos los cambios durante el proceso de diferenciación observamos que esta asociación entre estos dos elementos no cambia, incluso, a tiempos prolongados de proliferación en donde ya encontramos detritus celular la estructura pre-quística ya está bien formada lo único que permanece asociada a ella es un remante del núcleo del hospedero, probablemente porque el parásito al ser auxótrofo para las purinas, mantiene

hasta últimas instancias la relación con el núcleo del hospedero para obtener lo necesario del hospedero para su sobrevivencia. Las mitocondrias por su parte, como lo observó Sinai y Joiner (1997) y Muñiz Hernández (2009), se mantienen asociadas a la VP durante la proliferación del taquizoíto como respuesta a un evento selectivo llevado por el propio parásito y no por restricciones estéricas impuestas por la creciente vacuola, mientras que en el proceso de diferenciación a los primeros días de proliferación esta asociación se mantiene a la VP en transformación disminuyendo las mitocondrias en el citoplasma del hospedero.

En relación a los cambios en el citoesqueleto de la célula hospedera encontramos que los filamentos de actina por ejemplo los de la cara basal se fragmentan formando cúmulos de actina aparentemente desde la primera hora de diferenciación, los asociados a los cinturones de adhesión, presentaron discontinuidad en comparación con las células vecinas infectadas pero negativas a CST1 y en la cara apical se observó una disminución progresiva de las microvellosidades. En conjunto estos resultados sugieren que durante el proceso de formación de la estructura quística hay alteración en la integridad de los filamentos de actina que se asocia con una pérdida de las uniones intercelulares y una alteración de la superficie celular perdiéndose por completo a los 10 días de formación del quiste. Aunque desconocemos que componente de *Toxoplasma* está generando la despolimerización de la actina F, durante el proceso de diferenciación, reportes previos han evidenciado la liberación por taquizoítos intracelulares de toxofilina, una proteína despolimerizadora de filamentos de actina (Delorme-Walker et al., 2012). Al estudiar la organización de los microtúbulos encontramos que durante la proliferación del taquizoíto hubo una distribución homogénea en todo el citoplasma del hospedero, mientras que durante el proceso de diferenciación se detectó una mayor expresión de los microtúbulos adyacentes a la VP en transformación, incrementándose hasta los 5 días después del tratamiento con el AMF, esto probablemente inducido por el parásito con la finalidad de reclutar todo lo que requiere por parte de la célula hospedera para terminar con la biogénesis de la pared quística. En relación a la distribución que toman los filamentos intermedios de vimentina detectamos que hay una disminución paulatinamente de los mismos en el citoplasma del

hospedero reorganizándose en las zonas cercanas a la VP en transformación, mismos que se mantiene hasta los 5 y 7 días de proliferación después del tratamiento con el fármaco, ubicándose exactamente alrededor del pre-quiste como se había estudiado (Halonen et al., 1998) y el núcleo de hospedero, probablemente estos filamentos sean los responsables de mantener la unión del núcleo del hospedero con la estructura pre-quística.

Anteriormente en el laboratorio se pensaba que la asociación de estas dos estructuras se daba gracias a las prolongaciones de membrana que emanaban de la VP, ya que estudios previos por Muñiz Hernández, demostraban que estas prolongaciones de membrana durante la proliferación del taquizoíto se extendían hasta cubrir por completo el núcleo del hospedero, mismo fenómeno encontramos nosotros al estudiar los cambios en la membrana de la VP utilizando como marcador la proteína GRA3, pero cuando indujimos el proceso de diferenciación estas prolongaciones se fueron disminuyendo, pero sin perder la asociación al núcleo del hospedero nunca se perdió.

Por otra parte en relación a las modificaciones de la membrana de la célula hospedera, se detectó que después de haber inducido el proceso de diferenciación la membrana de la célula hospedera esta discontinua, lo que podría estar ocurriendo es que parte de la membrana se degrada pero otros componentes de la misma podrían estar participando en la formación de la pared del quiste.

Los cambios observados tanto en la distribución del citoesqueleto como en diferentes organelos, así como en la organización ultra-estructural de la célula hospedera y del propio parásito durante la diferenciación inducida por la exposición de taquizoítos al AMF representa una estrategia farmacológica para poder explicar las alteraciones que se presentan en las células hospederas que resultan en una estructura insertada en los tejidos que es el quiste tisular. Nuestros resultados nos dan idea acerca de una de las preguntas acerca de la formación del quiste, y es que la VP es la estructura sobre la cual se empieza a formar el quiste tisular y no es la membrana de la célula hospedera modificada que resultaría en la pared quística como se ha sugerido. Si bien es cierto en este trabajo demostramos cambios morfológicos en la célula hospedera, así

como cambios en la organización del parásito y en proteínas de la membrana de la VP durante el proceso de formación de una estructura pre-quística, esta técnica de inducción de cistogénesis permitirá continuar con el análisis de los cambios en la bioquímica celular así como en las señales involucradas para la diferenciación parasitaria, un aspecto que en la actualidad permanece desconocida.

## IX.- Conclusiones

1. Se estandarizó una metodología reproducible para inducir la cistogénesis *in vitro* de taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* mediante la inhibición de la IMPDH por exposición al inhibidor AMF. La estrategia utilizada permitió al tratar a los taquizoítos extracelulares con el AMF que las células hospederas no entraran en contacto con el fármaco y en consecuencia no fueran afectadas por el inhibidor.
2. El proceso de diferenciación se da un lapso corto de tiempo, lo cual permitió realizar el análisis de los cambios en la distribución de organelos y citoesqueleto del hospedero y en la membrana de la VP.
3. La inducción de la cistogénesis por tratamiento con AMF ocasionó la diferenciación de los taquizoítos y transformación de la VP en una estructura pre-quística que ocasionó un cambio a una forma de la VP esférica así como una retracción de la célula hospedera infectada con separación de las uniones intercelulares y modificación de su morfología.
4. La pérdida del citoesqueleto de la célula positiva a CST1 podría representar uno de los primeros eventos celulares que ocurren en la célula hospedera durante la formación del quiste a fin de facilitar la transformación de una célula invadida en un quiste tisular.
5. Los cambios observados en estas estructuras y posiblemente en la distribución de otros nos permitirá entender cómo se genera el quiste tisular.
6. El remanente del núcleo celular se mantiene asociado a la estructura quística en formación, es posible que este sea un suministro de nucleótidos para la proliferación del parásito.
7. La membrana de la VP sufre modificaciones después de haber inducido el proceso de diferenciación, ya que pierde las prolongaciones de membrana, esto para favorecer la biogénesis de la pared quística, ya que esta es la que sirve como template para la nueva estructura.
8. Los quistes obtenidos a los 10 días *in vitro* de la cepa RH de *Toxoplasma* por el tratamiento con AMF, mostraron características ultra-estructurales similares a los quistes de la cepa ME49, como lo es la presencia de la pared quística.

## **X.- Perspectivas**

1. Estudiar los cambios en las uniones intercelulares, marcando por ejemplo a las moléculas E-cadherina y ZO-1.
2. Determinar las rutas de señalamiento involucradas en la regulación de la cistogénesis.
3. Analizar la composición de la pared quística y la matriz intra-quística mediante espectrometría de masas.

## XI.- Bibliografía

- Abbas, A., Litchman A.H., Pillai S. (2012). *Inmunología Celular y Molecular* (E. Sanuders Ed. 7 ed.).
- Andrade, E. F., Stumbo, A. C., Monteiro-Leal, L. H., Carvalho, L., & Barbosa, H. S. (2001). Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J Submicrosc Cytol Pathol*, 33(3), 337-341.
- Behnke, M. S., Khan, A., Wootton, J. C., Dubey, J. P., Tang, K., & Sibley, L. D. (2011). Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(23), 9631-9636.
- Black, M. W., & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(3), 607-623.
- Bohne, W., Heesemann, J., & Gross, U. (1994). Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun*, 62(5), 1761-1767.
- Castro, K. N. (2013). Caracterización de la formación del quiste tisular de *Toxoplasma gondii* *in vitro* y de las modificaciones en el citoesqueleto de actina de la célula hospedera., Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México
- Castro Elizalde, K.N., Mondragón, R. (2014). Cistogénesis. In E. U. d. G. México (Ed.), *Toxoplasmosis animal. Ma. L. Galván Ramírez*.
- Chen, K., Cao, W., Li, J., Sprengers, D., Hernanda, P. Y., Kong, X., Pan, Q. (2015). Differential Sensitivities of Fast- and Slow-cycling Cancer Cells to Inosine Monophosphate Dehydrogenase 2 Inhibition by Mycophenolic Acid. *Mol Med*.
- de La Monte, S. M., & Wands, J. R. (2001). Mitochondrial dna damage and impaired mitochondrial function contribute to apoptosis of insulin-stimulated ethanol-exposed neuronal cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(6), 898-906.
- Delorme-Walker, V., Abrivard, M., Lagal, V., Anderson, K., Perazzi, A., Gonzalez, V., Tardieux, I. (2012). Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma invasion*. *J Cell Sci*, 125(Pt 18), 4333-4342.
- Díaz, R. D. M., R. (2014). Invasión celular. In E. U. d. Guadalajara (Ed.), *Toxoplasmosis*

*animal. Ma. L. Galván Ramírez. .*

- Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B., & Roos, D. S. (1996). Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol Chem*, 271(24), 14010-14019.
- Dubey, J. P. (1994). Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*, 205(11), 1593-1598.
- Dubey, J. P. (1997). Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*, 44(6), 592-602.
- Dubey, J. P., & Frenkel, J. K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool*, 23(4), 537-546.
- 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. *Clin Microbiol Rev*, 11(2), 267-299.
- Dzierszinski, F., Nishi, M., Ouko, L., & Roos, D. S. (2004). Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell*, 3(4), 992-1003.
- Ferguson, D. J. (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int J Parasitol*, 34(3), 347-360.
- Ferguson, D. J. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(2), 133-148.
- Ferguson, D. J., & Hutchison, W. M. (1987). The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 411(1), 39-43.
- Ferreira da Silva Mda, F., Barbosa, H. S., Gross, U., & Luder, C. G. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst*, 4(8), 824-834.
- Finlay, B. B., & Abe, A. (1998). Enteropathogenic *E. coli* interactions with host cells. *Jpn J Med Sci Biol*, 51 Suppl, S91-100.
- Fortier, B., Coignard-Chatain, C., Soete, M., & Dubremetz, J. F. (1996). [Structure and biology of *Toxoplasma gondii* bradyzoites]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 190(4), 385-394.

- Fox, B. A., Gigley, J. P., & Bzik, D. J. (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol*, *34*(3), 323-331.
- Francia, M. E., & Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol*, *12*(2), 125-136.
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P., & Miller, N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, *167*(3919), 893-896.
- Fux, B., Nawas, J., Khan, A., Gill, D. B., Su, C., & Sibley, L. D. (2007). *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation. *Infect Immun*, *75*(5), 2580-2590.
- Gómez de León C.T. & Mondragón, R. (2014). In E. U. d. G. México (Ed.), *Toxoplasmosis animal. Ma.L. Galván Ramírez*.
- Gubbels, M. J., White, M., & Szatanek, T. (2008). The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division: tightly knit or loosely stitched? *Int J Parasitol*, *38*(12), 1343-1358.
- Halonen, S. K., & Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol*, *41*(1), 65-71.
- Halonen, S. K., Weiss, L. M., & Chiu, F. C. (1998). Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes in vitro. *Int J Parasitol*, *28*(5), 815-823.
- Hedstrom, L. (2009). IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chem Rev*, *109*(7), 2903-2928.
- Hernández Contreras, P. (2012). Inducción de la cistogénesis de *Toxoplasma in vitro* por inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa y caracterización de algunos eventos celulares y moleculares involucrados. (Tesis de maestría), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México.
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, *172*(6), 1561-1566.
- Hutchison, W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, *206*(987), 961- 962.

- Jacobs, L., Remington, J. S., & Melton, M. L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*, *46*, 11-21.
- Katris, N. J., van Dooren, G. G., McMillan, P. J., Hanssen, E., Tilley, L., & Waller, R. F. (2014). The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog*, *10*(4), e1004074.
- Kim, K., & Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*, *34*(3), 423-432.
- Krzysztof, W., Pankiewicz, Barry. & M. Goldstein. (2003). Inosine monophosphate dehydrogenase a major therapeutic target (P. a. G. A. S. S. A. C. S. W. DC. Ed.).
- Laliberte, J., & Carruthers, V. B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci*, *65*(12), 1900-1915.
- Lane, A., Soete, M., Dubremetz, J. F., & Smith, J. E. (1996). *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*. *Parasitol Res*, *82*(4), 340- 346.
- Lang, C., Gross, U., & Luder, C. G. (2007). Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*, *100*(2), 191-203.
- Lau, Y. L., Lee, W. C., Gudimella, R., Zhang, G., Ching, X. T., Razali, R., Fong, M. Y. (2016). Deciphering the Draft Genome of *Toxoplasma gondii* RH Strain. *PLoS One*, *11*(6), e0157901.
- Leira, F., Vieites, J. M., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2001). Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicol In Vitro*, *15*(3), 199-208.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J., & Boothroyd, J. C. (2000). *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*, *96*(2), 89-96.
- Lemgruber, L., Lupetti, P., Martins-Duarte, E. S., De Souza, W., & Vommaro, R. C. (2011). The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form. *Cell Microbiol*, *13*(12), 1920-1932.
- Luder, C. G. K., & Rahman, T. (2017). Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. *Microb Cell*, *4*(7), 203-211.
- Lyons, R. E., McLeod, R., & Roberts, C. W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol*, *18*(5), 198-201.

- Magno, R. C., Straker, L. C., de Souza, W., & Attias, M. (2005). Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal*, 11(2), 166-174.
- Mercier, C., & Cesbron-Delauw, M. F. (2015). *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol*, 31(2), 60-71.
- Mondragón, R. (2014). Ciclo de vida. In E. U. d. Guadalajara. (Ed.), *Toxoplasmosis animal*. Ma. L. Galván Ramírez.
- Moore, A. E., Sabachewsky, L., & Toolan, H. W. (1955). Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res*, 15(9), 598-602.
- Muñiz-Hernández, S., Carmen, M. G., Mondragón, M., Mercier, C., Cesbron, M. F., Mondragón- Gonzalez, S. L., Mondragón, R. (2011). Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 473983.
- Muñiz Hernández, S. (2009). Modificación en la distribución de organelos y del citoesqueleto de la célula hospedera inducido por el parásito *Toxoplasma gondii* durante la invasión y proliferación intracelular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México
- Nagata, Y., & Burger, M. M. (1974). Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem*, 249(10), 3116-3122.
- Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool*, 34(2), 217- 226.
- Otify, Y. Z. (2012). Movable computer ruler (MCR): a new method for measuring the size of *Toxoplasma gondii* cysts, tachyzoites and other selected parasites. *Exp Parasitol*, 130(1), 1-5.
- Patrón, S. A., Mondragón, M., González, S., Ambrosio, J. R., Guerrero, B. A., & Mondragón, R. (2005). Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Int J Parasitol*, 35(8), 883-894.
- Puig, J. M. (1996). Ácido micofenólico, *Hospital del Mar. Barcelona*.
- Radke, J. R., Striepen, B., Guerini, M. N., Jerome, M. E., Roos, D. S., & White, M. W. (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 115(2), 165-175.

- Ramakrishnan, S., Docampo, M. D., Macrae, J. I., Pujol, F. M., Brooks, C. F., van Dooren, G. G., Striepen, B. (2012). Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, 287(7), 4957-4971.
- Ribeiro, M., Franco, P. S., Lopes-Maria, J. B., Angeloni, M. B., Barbosa, B. F., Gomes, A. O., Ferro, E. A. V. (2017). Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. *Exp Parasitol*, 181, 111-118.
- Rommereim, L. M., Hortua Triana, M. A., Falla, A., Sanders, K. L., Guevara, R. B., Bzik, D. J., & Fox, B.A. (2013). Genetic manipulation in Deltaku80 strains for functional genomic analysis of *Toxoplasma gondii*. *J Vis Exp*(77), e50598.
- Rosowski, E. E., Nguyen, Q. P., Camejo, A., Spooner, E., & Saeij, J. P. (2014). *Toxoplasma gondii* Inhibits gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-beta-induced host cell STAT1 transcriptional activity by increasing the association of STAT1 with DNA. *Infect Immun*, 82(2), 706-719.
- Rubsam, M., Broussard, J. A., Wickstrom, S. A., Nekrasova, O., Green, K. J., & Niessen, C. M. (2017). Adherens Junctions and Desmosomes Coordinate Mechanics and Signaling to Orchestrate Tissue Morphogenesis and Function: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2), 509-513.
- Selseleh, M., Modarressi, M., Shojaee, S., Mohebbali, M., Eshraghian, M., Selseleh, M., & Keshavarz, H. (2013). Brain Tissue Cysts in Infected Mice with RH-Strain of *Toxoplasma gondii* and Evaluation of BAG1 and SAG1 Genes Expression. *Iran J Parasitol*, 8(1), 40-46.
- Shimajima, M., Yuasa, S., Motoda, C., Yozu, G., Nagai, T., Ito, S., Fukuda, K. (2017). Emerin plays a crucial role in nuclear invagination and in the nuclear calcium transient. *Sci Rep*, 7, 44312.
- Shiver, T. M., Sackett, D. L., Knipling, L., & Wolff, J. (1992). Intermediate filaments and steroidogenesis in adrenal Y-1 cells: acrylamide stimulation of steroid production. *Endocrinology*, 131(1), 201-207.

- Sibley, L. D., Khan, A., Ajioka, J. W., & Rosenthal, B. M. (2009). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1530), 2749-2761.
- Sinai, A. P., & Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol*, 154(1), 95-108.
- Sinai, A. P., Webster, P., & Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci*, 110 ( Pt 17), 2117-2128.
- Soete, M., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1994). Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Exp Parasitol*, 78(4), 361-370.
- Soete, M., & Dubremetz, J. F. (1996). *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 219, 76-80.
- Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., & Sibley, L. D. (2003). Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, 299(5605), 414-416.
- Sullivan, W. J., Jr., Dixon, S. E., Li, C., Striepen, B., & Queener, S. F. (2005). IMP dehydrogenase from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(6), 2172-2179.
- Sullivan, W. J., Jr., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*, 36(3), 717-733.
- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., & Remington, J. S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240(4851), 516-518.
- Tomita, T., Bzik, D. J., Ma, Y. F., Fox, B. A., Markillie, L. M., Taylor, R. C., Weiss, L. M. (2013). The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. *PLoS Pathog*, 9(12), e1003823.
- Tran, T. V., Allen, S., & Smith, J. C. (1991). The behavior of a fast-responding barbituric acid potential-sensitive molecular probe in bovine heart submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta*, 1059(3), 265-274.

- Wagner, M., Earley, A. K., Webster, A. C., Schmid, C. H., Balk, E. M., & Uhlig, K. (2015). Mycophenolic acid versus azathioprine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*(12), CD007746.
- Weiss, L. M., & Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*, 5, D391-405.
- Weiss, L. M., Laplace, D., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B., Cali, A., & Wittner, M. (1995). A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol*, 42(2), 150-157.
- Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*, 14(2), 109-121.
- Zhou, X. W., Kafsack, B. F., Cole, R. N., Beckett, P., Shen, R. F., & Carruthers, V. B. (2005). The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. *J Biol Chem*, 280(40), 34233-34244.

## **XII.- Apéndice**

### **12.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Para la cuantificación de proteínas se sigue el método de Bradford (Bradford, M. Anal. Biochem., 72, 248. 1976, BIORAD, California EU.) para ello se prepara una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0.05 a 0.5 miligramos por mililitro de proteína. Para la determinación de proteínas, se toman 2 µl de la muestra (pared quística y fracción soluble) o del estándar de BSA, se diluyo con 38 µl de buffer de lisis, y se adicionaron 180 µl de reactivo de Bradford 1:4 en placas de 96 pozos de poli-estireno. Se incubaron por 5 min y se leyeron a 655 nm. La curva de calibración se graficó con los valores de absorbancia, y se determinó la concentración de proteína de la muestra mediante la ecuación de la recta.

### **12.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las muestras fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %, a 80 V, en el gel concentrador y a 100 V en el gel separador. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie o con nitrato de plata. Para los geles de 10 pozos se colocaron 20 µg de muestra por pozo y para los geles preparativos 250 µg.

### **12.3 Tinción con Nitrato de Plata**

Para teñir los geles, se colocaron en un recipiente de vidrio y se lavaron con 50 ml de agua MQ por 10 min en agitación. El gel se colocó en solución fijadora (Metanol al 40 % y 50 µl de formaldehído al 37 %) por 10 min en agitación. Después se lavó dos veces con agua MQ por 5 min, se agregó la solución de tiosulfato de sodio (0.2 g/ml) durante 1 minuto en agitación. Se lavó con agua MQ 2 veces durante 20 segundos y se incubó con una solución de Nitrato de Plata al 0.1 % por 10 min en agitación. Se adicionó la solución reveladora (Carbonato de Sodio al 3 %, Tiosulfato de Sodio al 0.0004 % y 50 µl de Formaldehído al 37 %) en agitación hasta que aparezcan las bandas. La reacción se detuvo con Ácido Cítrico 2.3 M por agitación durante 10 min, y se lavó con agua MQ. El gel se tiñó con Nitrato de Plata, se digitalizaron los geles 2D y se analizaron con el software ImageMaster 2D

Platinum 6.0 para determinar las propiedades de PM y pI de las manchas de proteína que se expresaron o aquellas que desaparecieron durante la diferenciación. Los datos obtenidos se utilizaron para la identificación de proteínas viables en la base de datos Toxodb.org. Para Western blot, se realizó la detección usando anticuerpos primarios contra las proteínas BAG1 o SAG1 a las diluciones mencionadas anteriormente y luego se reveló mediante la incubación con anticuerpos secundarios acoplados a HRP (dil 1: 7,000 en TBST al 0,1%; Millipore, MA).

#### **12.4 Tinción con azul de Coomassie**

El gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente limpio y se tiñó con azul Coomassie al 13 % en metanol al 50 % más ácido acético al 10 %. Se agitó por 4 h a TA, y se decoloró con metanol al 50 % más ácido acético al 10 % hasta observar las bandas.

#### **12.5 Análisis estadístico**

Los datos representan la media +/- SD y fueron analizados usando la prueba *t* de student. La cuantificación del número de píxeles se realizó con el software ImageJ (National Institutes of Health) tomando un área determinada de todas las imágenes del curso temporal (n = 10).

### **XIII.- Anexo (Artículo)**