



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Caracterización del efecto de interferón- γ en la inducción de la
cistogénesis en la cepa RH de *Toxoplasma gondii***

T E S I S

Que presenta

L.Q. DIANA ALEXANDRA OSPINA RIAÑO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOQUÍMICA

Director de la Tesis: Dr. Ricardo Mondragón Flores

México, D. F.

Agosto, 2015

AGRADECIMIENTOS AL CONACyT

El presente trabajo se realizó en el laboratorio No. 16 “Bioquímica celular de patógenos intracelulares” del departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional con apoyo del proyecto CONACyT No.155459, bajo la dirección del Doctor Ricardo Mondragón Flores.

Agradezco:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca crédito con número de registro 295905, otorgada para realizar los estudios de maestría en el departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN del periodo de septiembre del 2013 a agosto del 2015, bajo el número de CVU: 555670.

Al colegio de profesores por la enseñanza durante el periodo de maestría y sus aportes en los seminarios departamentales.

Al departamento por el acceso de las instalaciones y los equipos, así como por el material de apoyo proporcionado.

A la secretaria Priscila González Ceja por su apoyo.

A las unidades administrativas y académicas del Cinvestav como: Control Escolar, Departamento de Becas, Relaciones Internacionales, Biblioteca.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Ricardo Mondragón Flores**, por brindarme su asesoría, sus consejos y su dirección, lo cual contribuyó ampliamente al desarrollo de este trabajo y a mi formación como futura investigadora.

De igual manera agradezco a mis sinodales los doctores:

Dr. Marco Antonio Vega López del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes del Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN

Por sus valiosos comentarios y puntos de vista que sin duda enriquecieron mi formación, así como el contenido y enfoque de esta tesis.

Agradezco a:

- La **Maestra en Ciencias Kitzia Nohemi Castro Elizalde** por su ayuda, sugerencias y apoyo técnico proporcionado, para el desarrollo óptimo de este trabajo.
- La **QFB Sirenia González Pozos** de la Unidad de Microscopia Electrónica del LANSE-CINVESTAV por la asistencia técnica proporcionada y sus ideas e ingenio durante el análisis de microscopia electrónica.
- La **Auxiliar de Investigación Mónica Edith Mondragón Castelán** del Departamento de Bioquímica por su asistencia técnica en el trabajo del laboratorio.
- Al **Ing José Claudio Jiménez Vargas** por su apoyo y asistencia en la preparación del material utilizado.
- Al **M. en Ciencias Iván José Galván Mendoza** de la Unidad de Microscopia Confocal por la asistencia técnica proporcionada durante el análisis de microscopia confocal.
- A los **M. en Ciencias Rubén Darío Díaz Martín y Carmen T. Gómez de León** por compartir sus conocimientos y experiencia adquirida.
- A la **UPEAL-CINVESTAV** por el suministro de los animales empleados en este proyecto.
- A la **M. en ciencias Derly Escobar Wilches**, por su apoyo y carisma.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

A Dios,

Mis padres:

Martha Lucía Riaño Lemus y José Norbey Ospina Gómez.

Mi hermano:

Norbey Andrés Ospina Riaño

Mi pareja:

Manuel Alejandro Bertieri Arcila

Mis amigos:

Alejandra Estrada, Ángela Becerra, Doris Rojas, René Bernal y Yojana Castañeda.

Mis Maestros:

Julio Cesar Calvo Mozo y Mario Sánchez Rodríguez.

Por su apoyo incondicional, por ser grandes motivaciones para querer continuar con este proyecto de vida y por haber respetado y valorado siempre mi amor por la ciencia.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS AL CONACyT	I
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
TABLA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. GENERALIDADES.....	2
Ciclo de vida	2
Estadios de <i>Toxoplasma</i>	6
Taquizoíto.....	6
Bradizoíto	8
Esporozoíto	9
Estructura genotípica.....	10
III. ANTECEDENTES	10
Quiste tisular	10
Proteínas específicas de taquizoítos y bradizoítos	13
Mecanismos de enquistamiento <i>in vitro</i>	13
pH alcalino.....	15
Empleo de fármacos y compuestos químicos	15
Choque térmico	16
IV. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	18
Interferón gamma (IFN- γ).....	18
Biología del IFN- γ	19
Estructura del IFN- γ	22

Receptor del interferón gamma (R1 IFN- γ)	24
Afinidad del receptor	29
Señalización del receptor	30
Endocitosis mediada por receptor	31
V. JUSTIFICACIÓN	33
VI. HIPÓTESIS.....	34
VII. OBJETIVOS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
VIII. METODOLOGÍA.....	36
Cultivo celular	36
Animales	36
Mantenimiento de la cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	37
Validación de la presencia del R1IFN- γ en células HEp-2	38
Cuantificación de proteínas	38
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	38
<i>Western blot</i> del R1IFN- γ en el modelo celular HEp-2.....	39
Distribución temporal del R1IFN- γ en células HEp-2 expuestas al IFN- γ	40
Endocitosis mediada por receptor inducida por exposición al IFN- γ en las células HEp-2.....	41
Expresión de la glicoproteína CST1 inducida por la exposición de células HEp-2 invadidas con taquizoítos de la cepa RH a IFN- γ	42
Expresión de la glicoproteína CST1 de la pared de quiste tisular en células HEp-2 invadidas con cepa RH de <i>T. gondii</i> por exposición a IFN- γ	44
Expresión de las proteínas SAG1 y BAG1 de taquizoítos y bradizoítos respectivamente durante la cistogénesis inducida por IFN- γ	44

Análisis ultraestructural de la cistogénesis inducida por exposición a IFN- γ por microscopia electrónica de barrido por la técnica de Tanaka y mediante microscopía electrónica de transmisión en corte fino	45
Análisis estadístico	47
IX. RESULTADOS	48
Validación del modelo celular para la inducción de la cistogénesis <i>in vitro</i> mediada por IFN- γ	48
Inducción de la expresión de CST1 en células HEp-2 invadidas con la cepa RH de <i>T. gondii</i> y expuestas a IFN- γ	54
Cuantificación de la cistogénesis en células HEp-2 invadidas con cepa RH de <i>T. gondii</i>	63
Evaluación del efecto de IFN- γ en la inducción de la cistogénesis de la cepa RH de <i>T. gondii</i> en células HEp-2 mediante <i>Western blot</i>	69
Expresión de BAG-1 durante la cistogénesis inducida por IFN- γ	71
Cambios en la expresión de SAG1 en la cistogénesis inducida por IFN- γ	75
Análisis por microscopia electrónica (barrido y transmisión) de células HEp-2 invadidas e inducidas a cistogénesis por IFN- γ	77
Análisis por microscopia electrónica de barrido	77
Ultraestructura de células invadidas inducidas a cistogénesis.....	78
Evaluación de la cistogénesis en tiempos prolongados de exposición a IFN- γ	80
Análisis por microscopía electrónica de transmisión.....	82
X. DISCUSIÓN	86
XI. CONCLUSIONES	94
XII. PERSPECTIVAS	95
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .	5
Figura 2. Morfología de un taquizoíto y un bradizoíto.	9
Figura 3. Morfología de un quiste cerebral de la cepa ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> .	11
Figura 4. Modelo de quiste tisular.	12
Figura 5. Co-expresión de CST1 y BAG1 en células HEp-2 invadidas con taquizoítos de la cepa RH tratadas con AMF.	17
Figura 6. Participación de células efectoras del sistema inmune e inhibición de la replicación del parásito.	21
Figura 7. Estructura primaria y secundaria de la molécula de IFN- γ .	23
Figura 8. Ubicación subcelular y topología de R1IFN- γ .	27
Figura 9. Secuencia de aminoácidos del R1IFN- γ .	28
Figura 10. Formación de vesículas cubiertas con clatrina en la membrana celular.	32
Figura 11. Expresión del R1IFN- γ en extractos de células HEp-2.	49
Figura 12. Expresión de R1IFN- γ en células HEp-2.	50
Figura 13. Expresión de R1IFN- γ en células HEp-2 por microscopía confocal.	51
Figura 14. Expresión de R1IFN- γ en células HEp-2.	53
Figura 15. Expresión de CST1 en células control con MEM al 8%.	55
Figura 16. Expresión de CST1 en células expuestas a 100 U/mL de IFN- γ .	58
Figura 17. Expresión de CST1 en células expuestas a 200 U/mL de IFN- γ .	59
Figura 18. Expresión de CST1 en células expuestas a 500 U/mL de IFN- γ .	60
Figura 19. Expresión de CST1 en células expuestas a 1000 U/mL de IFN- γ .	61
Figura 20. Micrografías de baja amplificación de la expresión de CST1 marcada con lectina de <i>D. biflorus</i> .	62
Figura 21. Cuantificación de VP's positivas a CST1 después del tratamiento con IFN- γ .	63
Figura 22. Efecto de IFN- γ en la inducción de la cistogénesis mediante exposición a IFN- γ por 12 y 24 h.	64

Figura 23. Efecto de IFN- γ en la inducción de la cistogénesis mediante exposición a IFN- γ por 36 y 48 h.	65
Figura 24. Efecto de IFN- γ en la inducción de la cistogénesis mediante exposición a IFN- γ por 72 h.	66
Figura 25. Evaluación del efecto de IFN- γ 10 y 50 U/mL en la inducción de la cistogénesis.	67
Figura 26. Expresión temporal de CST1 en cultivo celular infectado con taquizoítos de la cepa RH y tratados con 200 U/mL de IFN- γ .	70
Figura 27. Co-expresión de CST1 y BAG1 durante el curso temporal de la cistogénesis inducida por exposición a IFN- γ .	72
Figura 28. Co-marcaje de BAG-1 y CST1 después de 72 h de inducción de la cistogénesis con 200 U/mL de IFN- γ .	73
Figura 29. Proliferación asincrónica de los parásitos en proceso de diferenciación a quiste inducidos por exposición a IFN- γ	74
Figura 30. Cambios en la expresión de SAG-1 vs CST1 durante el curso temporal de cistogénesis inducida por exposición a IFN- γ .	76
Figura 31. MEB de células HEp-2 invadidas sin tratamiento con IFN- γ .	78
Figura 32. Estructuras prequísticas <i>in vitro</i> inducidas con 200 U/mL de IFN- γ en cepa RH de <i>T. gondii</i> observado por MEB.	79
Figura 33. Estructuras prequísticas de 6 días, conformación de placas, red interna y externa y quistes de 10 días.	81
Figura 34. Estructuras de HEp-2 invadidas con cepa RH, sin tratamiento de IFN- γ como control negativo.	83
Figura 35. Gránulos de amilopectina y micronemos en bradizoítos de la cepa RH de <i>T. gondii</i> a los 10 días del proceso de cistogénesis.	84
Figura 36. Formación de la pared quística, polarización de la red vesículo tubular, dispersión mitocondrial y desorden intravacuolar.	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación estructural del receptor de IFN- γ de humano y murino.	26
Tabla 2 Sitios de unión y afinidad en diferentes linajes celulares.	30

TABLA DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
BAG1	Antígeno de bradizoíto 1
BSA	Albúmina sérica bovina
Bra	Bradizoíto
°C	Grados centígrados
CF	Contraste de fase
CO ₂	Bióxido de carbono
DIC	Contraste de interferencia diferencial
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
ET	Extracto total
GD	Gránulos densos
H	Hora
HEp-2	Carcinoma epidermoide humano cepa-2
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenasa
IF	Inmunofluorescencia
IFN- γ	Interferón gamma
KCl	Cloruro de potasio
kDa	kiloDaltones
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
M	Molar
mA	Miliamperios
MQ	Matriz quística
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
MEM	Medio mínimo esencial
MET	Microscopia electrónica de transmisión
mL	Mililitros

mm	Milímetros
mM	Milimolar
mV	Milivolts
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
OsO ₄	Tetróxido de osmio
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PAF	Paraformaldehído
PBS	Solución salina con amortiguador de fosfatos
PES	Penicilina-estreptomicina
PM	Peso molecular
PQ	Pared quística
R1IFN-γ	Receptor de interferón gamma
Rpm	Revoluciones por minuto
SAG1	Antígeno de superficie 1
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TBST	Solución <i>buffer</i> de tris con Tween al 1%
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TLCK	N α-tosil –L-lisina clorometil cetona
TPCK	N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
V	Volts
V/h	Volts/hora
VP	Vacuola parasitófora

RESUMEN

Toxoplasma gondii es identificado como un patógeno oportunista causante de la toxoplasmosis en una amplia variedad de mamíferos y aves. Mientras que en individuos inmunocompetentes la infección transcurre de manera asintomática, en recién nacidos y pacientes con variedad de inmunodeficiencias la enfermedad puede llegar a ser letal, pues la respuesta inmune participa activamente en la activación de células y moléculas efectoras que limitan el crecimiento y la replicación del parásito. El interferón γ es una citocina del sistema inmune, que parece activar la diferenciación del parásito y la cistogénesis o enquistamiento tisular. Este es un proceso clave en la patogénesis y en el ciclo celular de este parásito, pues le permite protegerse de la respuesta inmune que activa el hospedero en su defensa. Hasta el momento no se ha detectado la cistogénesis mediada por dicha citocina en cepas tipo I de *T.gondii*. En el presente proyecto, se observaron los cambios inducidos por el tratamiento de interferón γ en células HEP-2 invadidas con la cepa RH (cepa tipo I), encontrándose cambios celulares progresivos que ocurren en la célula hospedera, en la vacuola parasitófora y en el parásito, los cuales resultaron en la formación de estructuras quísticas, que podrían estar permitiéndole al patógeno evadir la acción de la citocina. De esta manera, la cistogénesis constituiría un posible mecanismo que activa el parásito, formando una barrera física que lo mantiene aislado de condiciones que puedan amenazar su supervivencia.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is known as an opportunistic pathogen responsible of toxoplasmosis in a wide variety of mammals and birds. While in immunocompetent individuals the infection is asymptomatic, in newborns and patients with a variety of immune deficiency disease can result lethal, since the immune response is actively involved in the activation of effector cells and molecules that limit the growth and replication of the parasite. The interferon gamma (IFN- γ) is an immune system cytokine that seems to activate the parasite differentiation and the cystogenesis or tissue encystment. This is a key process in the pathogenesis and in the parasite cell cycle, because it allows it to protect from the immune response that defends the host. Until now, it has not been detected tissue encystment cytokine mediated in strains from type I of *T. gondii*. In this project, we observed changes induced by the treatment of IFN- γ in HEp-2 cells infected with the RH strain (strain type I), finding progressive cellular changes that happen in the host cell, the parasitophorous vacuole and the parasite that resulted in the formation of cystic structures, which could allow the pathogen to evade the cytokine action. Cystogenesis thereby constitute a possible mechanism that activates the parasite, forming a physical barrier that keeps it isolated from survival threatening conditions.

I. INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado con gran éxito, debido a su efecto patógeno, pues tiene una transmisibilidad importante, que causa infección permanente en la mayoría de las especies a las que agrede (White, Radke, & Radke, 2014). *Toxoplasma gondii* pertenece a los apicomplexa que forman quistes tisulares. Este parásito presenta un ciclo de vida heterogéneo, con estados sexuales reproductivos en el hospedero definitivo y un segundo ciclo replicativo en muchos animales endotérmicos incluyendo a los humanos (White *et al.*, 2014).

Este protozoo que puede infectar a todos los mamíferos y aves, normalmente a través de alimentos contaminados, ha recibido considerable atención científica debido a que causa serias y severas enfermedades en individuos inmunocomprometidos y pacientes con VIH (Sullivan & Jeffers, 2012). Adicionalmente se considera, como uno de los parásitos con mayor distribución ubicua alrededor del mundo, pues presenta una seroprevalencia superior al 30 % en toda la tierra (Montoya & Liesenfeld, 2004).

En Latinoamérica, este parásito ha sido detectado particularmente en áreas tropicales donde puede permanecer infectivo por periodos prolongados debido a las condiciones del ambiente, por ejemplo: en sitios que presentan elevadas temperaturas y humedad durante la mayor parte del año. Algunos estudios epidemiológicos se han desarrollado tanto en animales como en humanos, sin embargo aún hay un gran desconocimiento acerca del modo de transmisión, las alternativas de tratamiento y las medidas de control de esta enfermedad (Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000).

II. GENERALIDADES

Toxoplasma gondii es la única especie del género *Toxoplasma*, está ubicado en el *Phylum* Apicomplexa, clase Sporozoa y subclase coccidia. Otros parásitos incluidos en el mismo orden incluyen *Isospora*, *Eimeria*, *Neosporum* y *Sarcocystis*. El nombre de la especie proviene de *Ctenodactylus gondii*, roedor del cual fue aislado por primera vez *Toxoplasma gondii*.

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 incluyendo al hombre) en donde se desarrolla la replicación asexual del parásito (Black & Boothroyd, 2000) (Figura 1). Existen por lo tanto, dos procesos de reproducción en *Toxoplasma gondii*, uno sexual relacionado con la formación de un **ooquiste** donde se alojan esporozoítos infectivos y el cual es liberado en las heces de los felinos infectados, y uno asexual en el cual se forma el **quiste tisular** en el que se albergan los bradizoítos (White *et al.*, 2014).

El ciclo de vida empieza cuando el felino, se infecta ingiriendo presas infectadas (ratones /ratas). Estas presas contienen quistes tisulares en todos sus tejidos. En estos quistes se alojan los bradizoítos, el estadio de *Toxoplasma* de lenta reproducción. Una vez el quiste se encuentra en el intestino, este se rompe mediante la acción de enzimas digestivas, liberándolos. Estos bradizoítos son más resistentes al ácido y a la pepsina que los taquizoítos, sobreviviendo de 1 a 2 horas, mientras que taquizoítos sobreviven únicamente 10 minutos en este medio (Jacobs, Remington, & Melton, 1960).

Los bradizoítos invaden a los enterocitos del intestino delgado del gato en donde se inicia un proceso de diferenciación celular, en el cual el parásito se convierte en microgametos y macrogametos (Popiel, Gold, & Booth, 1996). Los microgametos son la forma parasitaria masculina de *Toxoplasma*, que se caracterizan por tener un flagelo y ser altamente dinámicos, estos se exteriorizan de la célula invadida hacia el lumen intestinal, detectan a enterocitos invadidos que alojan en su interior a la forma femenina del parásito conocida como macrogametocito y al penetrarlos, lo fertilizan dando origen a un cigoto, el cual posteriormente se transformará en un ooquiste inmaduro. Este ooquiste no alberga formas parasitarias desarrolladas y por lo tanto, no es infectivo. Cuando dicho ooquiste es excretado en las heces del felino, puede madurar en condiciones de temperatura y humedad adecuadas en 2-3 días. Esta maduración genera 8 esporozoítos altamente infectivos en su interior.

La ingesta de agua, vegetales y alimentos contaminados con estos ooquistes representa una importante forma de transmisión de la toxoplasmosis (Sibley, Krahenbuhl, Adams, & Weidner, 1986). Cuando los hospederos intermediarios (animales de sangre caliente y el hombre) consumen ooquistes maduros, los esporozoítos intraquísticos son liberados por la acción digestiva e invaden a los enterocitos intestinales alojándose dentro de una vacuola parasitófora (VP) que representa el nicho intracelular de proliferación y diferenciación celular del taquizoíto, 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 (Mondragón, 2014 a). Cada etapa de división se lleva a cabo de entre 3-4 h (Martín Díaz & Mondragón, 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.). Debido a la presencia del parásito en el organismo, se activa la respuesta inmune del individuo con producción de anticuerpos y activación de células efectoras (como las células T y macrófagos) que liberan diversas citocinas como el interferón gamma (IFN- γ). Dicha citocina ha mostrado ser clave en la respuesta inmune contra *Toxoplasma*, limitando la replicación del parásito. (Sullivan & Jeffers, 2012). La presencia de IFN- γ cumple una función esencial para el parásito, ya que es aparentemente detectado por los taquizoítos intracelulares, activando su diferenciación a la forma del bradizoíto, para de esta forma generar quistes tisulares a través de mecanismos aún desconocidos (Castro & Mondragón, 2014).

Los quistes tisulares son estructuras esféricas endosadas en una pared gruesa y densa responsable de aislar y proteger a los bradizoítos, de la respuesta inmunológica (respuesta celular y humoral) y contra fármacos anti-parasitarios (Lemgruber, Lupetti, Martins-Duarte, De Souza, & Vommaro, 2011). Es dentro del quiste tisular, que el parásito en forma de bradizoíto puede sobrevivir en los diferentes tejidos por prácticamente toda la vida del hospedero. La capacidad para diferenciarse en bradizoíto y formar esos quistes impenetrables hace imposible de erradicar a *Toxoplasma* del hospedero.

Mientras que hay fármacos que pueden controlar la toxoplasmosis aguda, tales como la pirimetamina en combinación con la sulfadiazina, no hay a la fecha tratamiento que elimine el quiste tisular (Wong & Remington, 1993). Los bradizoítos dentro del quiste tisular, entran en un estadio de lenta proliferación y latencia que les permite sobrevivir por toda la vida del individuo (Dubey, Lindsay, & Speer, 1998).

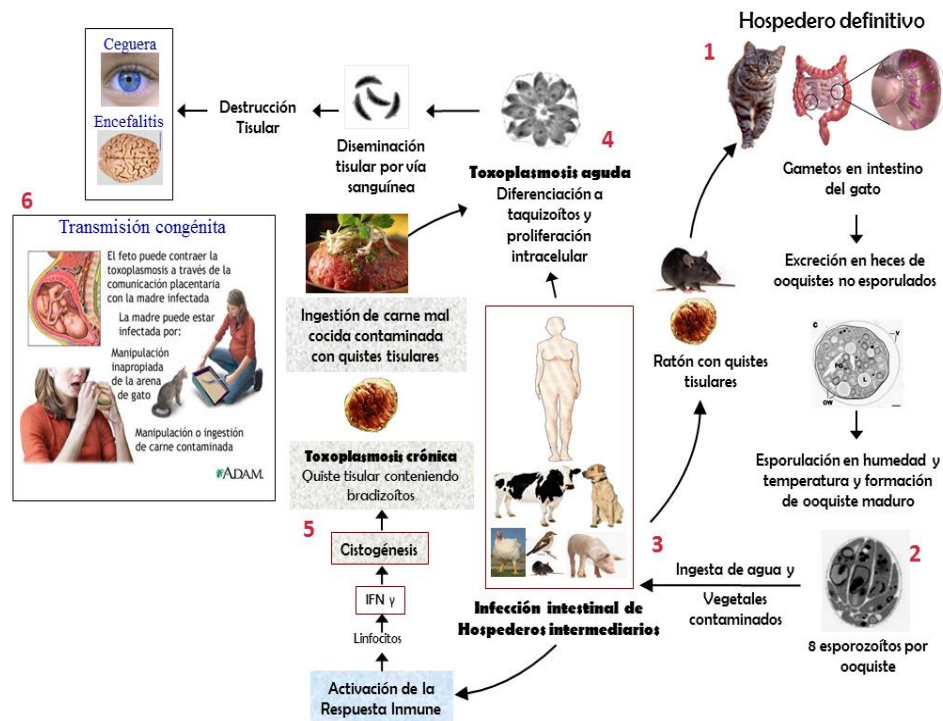


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. 1). Los felinos y el gato doméstico son los hospederos definitivos en quienes se lleva a cabo el ciclo sexual, dando como resultado un cigoto que es liberado al medio ambiente en las heces. 2) En el medio ambiente se forman ooquistes con 8 esporozoítos infectivos que contaminan hortalizas, agua y alimentos. (Su *et al.*, 2003). 3) Los hospederos intermediarios se infectan al ingerir a los ooquistes maduros. (Martín-Hernández & García, 2003). 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 el sistema inmune del hospedero activa los linfocitos y la secreción de IFN- γ , 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 (Mondragón, 2014 a).

El hombre también se puede infectar al ingerir carne mal cocida contaminada con quistes tisulares, de tal manera que cuando los bradizoítos se liberan en el intestino por la acción digestiva, invaden a las células del epitelio intestinal y se alojan en una VP, en donde se diferencian rápidamente en taquizoítos para favorecer la diseminación tisular de los parásitos. Esta rápida diferenciación se ha relacionado con una alta frecuencia de toxoplasmosis aguda, a menudo observada en individuos inmuno comprometidos (Montoya & Liesenfeld, 2004). Una vez el taquizoíto, se disemina a todos los órganos y tejidos atravesando barreras fisiológicas como la hemato-encefálica, la ocular y la placentaria, causa daños irreparables como la coriorretinitis con pérdida de la visión, y mortales como el aborto en mujeres embarazadas, la encefalitis y muerte en pacientes inmunodeficientes (Mondragón, 2014 b).

Estadios de *Toxoplasma*

El desarrollo del ciclo de vida en este parásito involucra la conversión entre tres estados infecciosos: taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos. El **taquizoíto**, es el estadio que presenta elevada motilidad, rápida replicación y que se encuentra dentro de VP's. El **bradizoíto**, por su parte, se encuentra en quistes tisulares, presenta lenta motilidad y proliferación. Y finalmente el estadio que está presente en el interior de ooquistes maduros: el **esporozoíto** (Ferreira da Silva Mda, Barbosa, Gross, & Luder, 2008).

Taquizoíto

Es el estadio más dinámico e invasivo de *Toxoplasma* (Figura 2), presenta una longitud aproximada de 6 a 8 micras, invade a cualquier célula nucleada del organismo, así como a eritrocitos aunque no prolifera en ellos (Otify, 2012).

La región apical es típica del *Phylum Apicomplexa*, ya que en ella se encuentran dos de los tres organelos secretores, las roptrías y los micronemos. El tercer organelo secretor son los gránulos densos, que están dispersos por todo el citoplasma del parásito (Leriche & Dubremetz, 2012). De la región apical se organiza un citoesqueleto subpelicular con un anillo polar apical, conoide, anillos preconoidales y 22 microtúbulos subpeliculares que se extienden hasta las tres cuartas partes del cuerpo del parásito (Patron *et al.*, 2005). También se presenta una red submembranal de filamentos que envuelve a todo el parásito hasta el extremo posterior. Tanto los microtúbulos subpeliculares como la red submembranal de filamentos determinan la forma característica de media luna del parásito y también sus propiedades de motilidad (Patron *et al.*, 2005). El conoide, es un organelo retráctil compuesto por unidades filamentosas organizadas en forma helicoidal en el sentido de las manecillas del reloj, además contiene al menos α tubulina (Muñiz & Mondragón, 2009).

Adicionalmente, *Toxoplasma* tiene un apicoplasto y un organelo trimembranal resultante de una endosimbiosis primitiva con un alga verde (Dubey, 1994), este es un organelo esencial para el parásito, ya que en él se localiza la maquinaria enzimática responsable de la biosíntesis de lípidos, así como de purinas a través de la ruta de Shikimato, en la cual se sintetizan bases púricas a partir del corismato (Ramakrishnan *et al.*, 2012). Todo el parásito se encuentra rodeado por una estructura trimembranal conocida como películo, la cual está constituida por la membrana plasmática y el complejo membranal interno (CMI) (Muñiz & Mondragón, 2009), los cuales son muy importantes en la motilidad, la secreción, la adhesión a la célula blanco y en el mantenimiento de la forma del parásito.

Bradizoíto

Esta es la forma de lenta proliferación y motilidad del parásito, pueden llegar a medir de 7 μm a 1.5 μm (Figura 3) (Dubey, 1998). Se encuentran dentro de quistes tisulares, los cuales están distribuidos en la mayoría de los tejidos de un organismo infectado, pero son más comunes en cerebro, corazón, músculo esquelético y retina (Ferguson. & Hutchison, 1987).

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. Por otra parte, la apariencia de las roptrías es más electrodensa y su densidad varía con la edad del quiste tisular, mientras más viejo sea el quiste más electrodensas son las roptrías. Mientras los bradizoítos poseen de 1 a 3 roptrías, los taquizoítos tienen de 6-8 roptrías. En los bradizoítos se observa un mayor número de micronemos con una distribución submembranal, en contraste a los observados en taquizoítos que están solo en el extremo apical. Por último, se detectan numerosos gránulos de amilopectina, los cuales en el taquizoíto están escasos o ausentes (Dubey, 1998; Gómez de L & Mondragón, 2014).

Los bradizoítos son más resistentes a la acción de enzimas proteolíticas o a condiciones de estrés. En un estudio en el cual se eliminó el CO_2 de las condiciones de cultivo celular por dos semanas a parásitos de la cepa tipo II (Prugniaud), se observó que los taquizoítos no proliferaron, mientras que los bradizoítos inmaduros se replicaron en un lapso mayor a 12 h 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, Nishi, Ouko, & Roos, 2004).

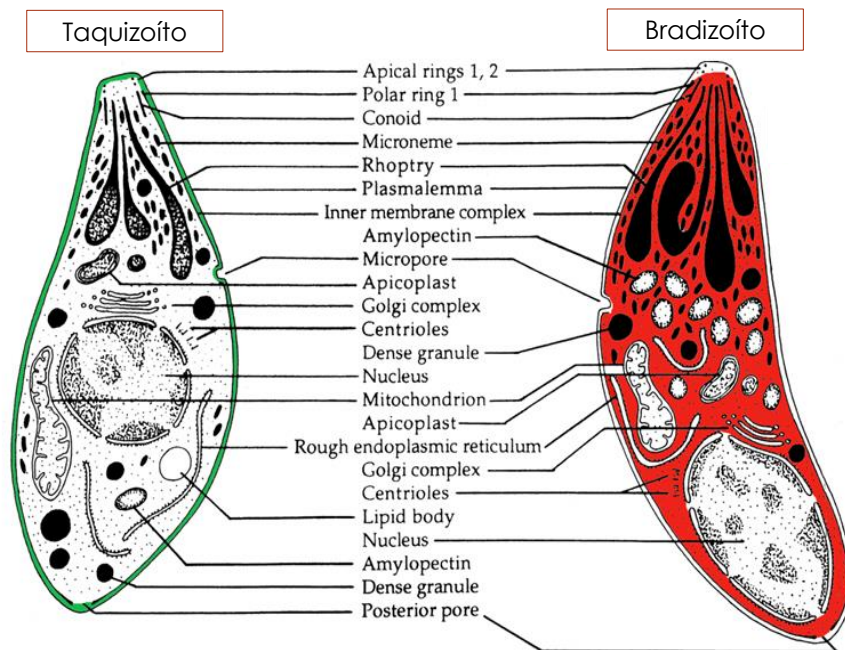


Figura 2. Morfología de un taquizoíto y un bradizoíto. La proteína SAG-1 de la membrana está representada en verde y la proteína citosólica BAG-1 se presenta en rojo, modificado de: (Dubey *et al.*, 1998), (Gómez de L & Mondragón, 2014).

Esporozoíto

El esporozoíto es similar al taquizoíto excepto por la mayor presencia de micronemos y roptrías. Es la forma que se encuentra en el ooquiste, liberado en las heces de los gatos infectados, el cual esporula en el medio ambiente y en condiciones adecuadas de humedad y temperatura, en un lapso de 1 a 5 días, genera una estructura ovoide con un tamaño de 10-12 μm , y que contiene 8 esporozoítos infectivos (Dubey *et al.*, 1998). El ooquiste puede permanecer viable por largos periodos en ambientes de alta humedad; sin embargo, en condiciones de sequedad o alta temperatura es degradado e inactivado (Frenkel JK, 1970).

Estructura genotípica

La estructura poblacional de *Toxoplasma gondii* ha sido descrita de acuerdo a diversos análisis filogenéticos y estadísticos, los cuales indican 3 linajes genotípicos bien caracterizados (Howe & Sibley, 1995), de acuerdo a diferentes factores como: el genoma, el tipo de hospedero al que infecta, su grado de virulencia y su habilidad para formar quistes (Behnke *et al.*, 2011). Se ha sugerido que el linaje tipo I es considerado de virulencia elevada al causar el 100% de letalidad en ratones infectados con tan solo un parásito. En el linaje tipo II, se encuentran cepas como la 76K y ME49, estas son de virulencia intermedia, al causar el 50% de letalidad en ratones infectados con 10^4 taquizoítos. Y finalmente el genotipo III, que causa el 50% de letalidad a ratones inoculados con 10^6 taquizoítos (Sibley & Boothroyd, 1992).

III. ANTECEDENTES

Quiste tisular

Los quistes tisulares son estructuras que alojan en su interior a cientos o miles de bradizoítos (Figura 3). Pueden permanecer en los tejidos desde años hasta toda la vida del hospedero. Generalmente presentan forma esférica y puede medir desde 5 μm hasta alcanzar los 70 μm de diámetro y contener en su interior hasta 2000 bradizoítos (Weiss & Kim, 2000). En tejido muscular pueden llegar a medir hasta 100 μm y llegan a ser más elongados (Dubey, 1998). El quiste se compone principalmente de la pared quística, la matriz quística y los bradizoítos.

La pared es elástica y delgada, mide alrededor de 0.5 μm de grosor permitiendo el paso de moléculas de hasta 10 kDa (Lemgruber *et al.*, 2011) y posee una carga negativa. La pared es rica en fosfolípidos (Guimaraes, Acquarone, de Carvalho, & Barbosa, 2007) y en carbohidratos como la N-acetil galactosamina y N-acetilglucosamina.

Presenta algunas proteínas de la familia GRA de gránulos densos como la proteína GRA5, la cual está presente en forma abundante. En menor proporción se han detectado a las proteínas GRA1, GRA3 y GRA6 (Lane, Soete, Dubremetz, & Smith, 1996). En el laboratorio, se puede inducir la formación de quistes cerebrales, mediante la infección por vía oral de ratones de la cepa C57BL/6 con quistes purificados de las cepas de los tipos II y III. En los quistes aislados del macerado cerebral después de 2 meses de la infección, se han detectado algunos antígenos como la glicoproteína CST1, característica de la pared quística y que es detectable por tinción con la lectina aislada de la semilla de la planta *Dolichos biflorus* (DBA), que une específicamente a residuos de N-acetil galactosamina (Castro & Mondragón, 2014).

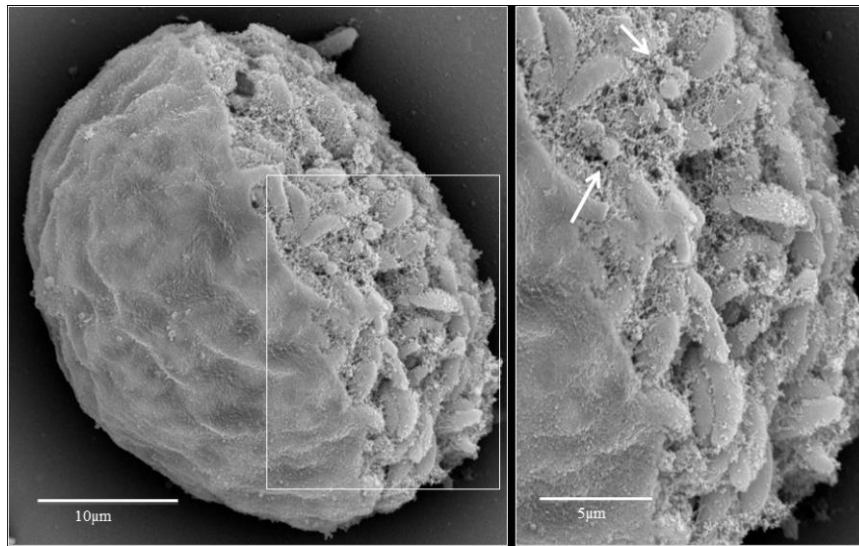


Figura 3. Morfología de un quiste cerebral de la cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*. Los bradizoítos están embebidos en una red fibrosa con presencia de pequeñas vesículas esféricas (flechas). Los bradizoítos no presentan una organización interna definida. La micrografía de la derecha representa una amplificación del recuadro indicado en la micrografía de la izquierda. Tomado de: (Hernández Contreras, 2012).

Al interior de los quistes se alojan los bradizoítos embebidos en un material fibroso denominado como matriz intraquística de funciones desconocidas (Figura 3). Estructuralmente, esta matriz está formada por dos fases, una que corresponde a un material filamentoso y vesicular, en donde unas vesículas tienen tamaños que oscilan entre 50 y 140 nm de diámetro y otras más grandes que miden entre 250 y 700 nm de diámetro y presentan una cobertura densa en su superficie externa (Lemgruber *et al.*, 2011).

Las vesículas intraquísticas presentan una alta cantidad de material granular en su lumen. Vesículas similares se encontraron asociadas al exterior del extremo posterior de los bradizoítos y próximos a la pared del quiste. La pared quística se caracteriza por tener dos capas, una externa muy compacta y una interna más laxa (Lemgruber *et al.*, 2011).

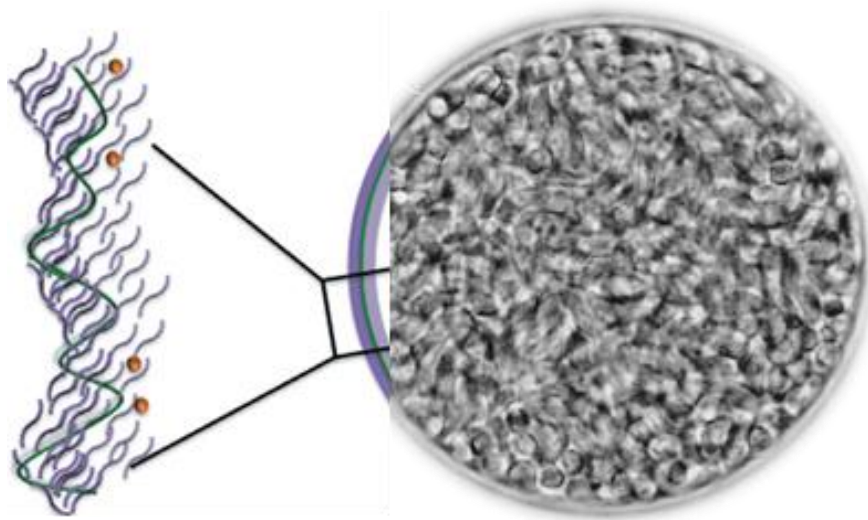


Figura 4. Modelo de quiste tisular. La pared quística se encuentra formada por 2 capas, una capa externa compacta y una interna más laxa. En el interior de la matriz quística se encuentran los bradizoítos muy adheridos entre sí. Modificado de (Lemgruber *et al.*, 2011).

Proteínas específicas de taquizoítos y bradizoítos

Los cambios moleculares que se presentan durante la conversión de taquizoítos a bradizoítos incluyen la expresión diferencial de antígenos específicos de cada estadio, así como modificaciones en el metabolismo (Lyons, McLeod, & Roberts, 2002). Entre las proteínas específicas de taquizoítos se encuentran los antígenos de superficie 1 (SAG1), SAG2A, SAG2B, lactato deshidrogenasa 1 (LDH1), enolasa (ENO2), y secuencias relacionadas a SAG 1-3 (SRS1-3). En cuanto a los bradizoítos, las que son específicas son SAG2C, SAG2D, SAG4, la proteína de bradizoíto 4 (BSR4), el antígeno de matriz (MAG1), LDH2, ENO1 y el antígeno de bradizoíto 1 (BAG1). BAG1 que es una pequeña proteína de choque térmico (Heat shock) de expresión temprana en el proceso de cistogénesis, la inhibición de su expresión disminuye la formación de quistes tisulares *in vivo*; sin embargo, no es esencial para la formación del quiste (Zhang *et al.*, 1999).

Mecanismos de enquistamiento *in vitro*

En la búsqueda de varios modelos de diferenciación de este parásito se han desarrollado mecanismos *in vitro*, lo cual favorece la transición de taquizoítos a bradizoítos. Algunos estudios sugieren que un entorno celular agresivo para el parásito, además de factores de estrés exógenos, pueden incidir considerablemente en la diferenciación de *T. gondii* (Ferreira da Silva Mda *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconocen los cambios ocurridos en este proceso. Por ejemplo, si la pared del quiste corresponde en su origen a la membrana plasmática de la célula infectada, a la membrana de la VP o es una estructura nueva.

También se desconoce de qué organelos provienen los componentes que constituyen la pared quística y la matriz intraquística o cuáles son los eventos moleculares involucrados en la diferenciación de los taquizoítos a bradizoítos, asimismo se desconoce si los bradizoítos son capaces de exteriorizarse del quiste una vez que éstos están localizados en los tejidos y si lo hacen qué herramientas moleculares y celulares utilizan para romper la pared quística para su exteriorización y posterior diferenciación a taquizoítos, etc.

Para tratar de caracterizar estos eventos se han reportado diversas estrategias para inducir la cistogénesis *in vitro* en cultivos celulares infectados con taquizoítos (Ferreira da Silva Mda *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios se han enfocado al uso de cepas tipo II y III de baja virulencia, que son sometidas a condiciones de estrés en el cultivo, detectando la expresión de proteínas específicas de cada estadio como P30 o SAG1 para taquizoíto y P36, P34, P21 y P18 proteínas de la membrana de bradizoíto (Soete & Dubremetz, 1996). Dentro de los resultados, se ha encontrado que la velocidad de la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto es más alta en cepas tipo II y III que en cepas tipo I (Ferreira da Silva Mda *et al.*, 2008).

Dentro de las principales estrategias que se han evaluado con cierto éxito como inductoras de la cistogénesis *in vitro* en la cepas de los tipos II y III, están el mantenimiento de los cultivos celulares infectados en condiciones de estrés, como son; el pH alcalino (8.0-8.2), el choque térmico (40-45°C), la exposición a IFN- γ y a otras citocinas pro-inflamatorias, así como la exposición a compuestos químicos o fármacos y finalmente la eliminación de nutrientes en el medio de cultivo (Bohne, Holpert, & Gross, 1999).

pH alcalino

La inducción de la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos *in vitro*, ha sido lograda bajo el incremento de pH a 8.0-8.2 en el medio de cultivo. De hecho, el fenotipo bien definido detectable con anticuerpos específicos para bradizoítos confirma la efectividad de esta técnica (Soete & Dubremetz, 1996). La estrategia consiste en infectar durante algunas horas con taquizoítos a células hospederas en condiciones fisiológicas de pH (pH 7.2 - 7.4), luego son transferidas a un medio alcalino de pH a 8.0 - 8.2.

Las células infectadas son por lo general, cultivadas en condiciones que involucran el uso de amortiguadores líquidos no volátiles y no de CO₂ con el fin de evitar las variaciones de pH. Mediante técnicas de inmunofluorescencia y *Western blot* se ha demostrado que la expresión de BAG1 en el citoplasma se hace presente entre el día 3 y 6 (Weiss *et al.*, 1995). No obstante, este éxito en la expresión de proteínas típicas de bradizoítos, la estrategia *per se* es muy limitada, ya que el mantenimiento de los cultivos a estos pH's alcalinos afecta la viabilidad y la integridad de las células hospederas muriendo a los pocos días e impidiendo que se pueda llevar a cabo la caracterización de los eventos celulares y moleculares involucrados en la cistogénesis, adicionalmente esta estrategia no permite que se generen estructuras quísticas maduras (Ferreira da Silva Mda *et al.*, 2008).

Empleo de fármacos y compuestos químicos

En la búsqueda de fármacos con actividades anti-parasitarias se han detectado varios compuestos que inducen la cistogénesis *in vitro* de *Toxoplasma*, más que afectar la replicación del parásito. Dentro de los fármacos que se han utilizado con frecuencia para inducir la cistogénesis están diversos antibióticos como: pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, espiramicina, hidronaftoquinonas y macrólidos de nueva generación; sin

embargo, su eficiencia y reproducibilidad en la inducción de la cistogénesis son variables e inconsistentes (Sullivan & Jeffers, 2012). En un proyecto en desarrollo en nuestro laboratorio, se ha demostrado que el inmunosupresor ácido micofenólico (AMF), un inhibidor de la síntesis de purinas que bloquea la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), induce la cistogénesis en el parásito de manera reproducible y con frecuencias superiores al 70% (Figura 5) (Hernández Contreras, 2012); (Castro E.K., 2012). No obstante, el éxito en la inducción de la cistogénesis, mediante un agente farmacológico, éste, no obedece a un proceso natural con una molécula fisiológica; sin embargo, representa una alternativa metodológica para el estudio de la cistogénesis.

Choque térmico

A fin de generar una situación de estrés, tanto para las células como para el parásito con esta estrategia, se pretende mantener los cultivos a diferentes temperaturas. En este método, las células no infectadas son mantenidas por dos horas a 34°C para que adquieran termo-tolerancia, posteriormente son llevadas a 37°C por dos horas más a fin de que se presente la invasión con taquizoítos de *T. gondii*; finalmente la temperatura de incubación se aumenta a 43°C durante 12-48 h. Después las células son mantenidas de nuevo a 37°C por el tiempo de duración del experimento. Bajo estas condiciones, se observa desde las 48 horas, la presencia de estructuras quísticas similares a las aisladas de cerebros de ratones infectados (Castro & Mondragón, 2014; Rivera & Mondragón, 2010). La principal limitante de dicha metodología es su baja reproducibilidad, eficiencia y gran mortalidad de las células cultivadas.

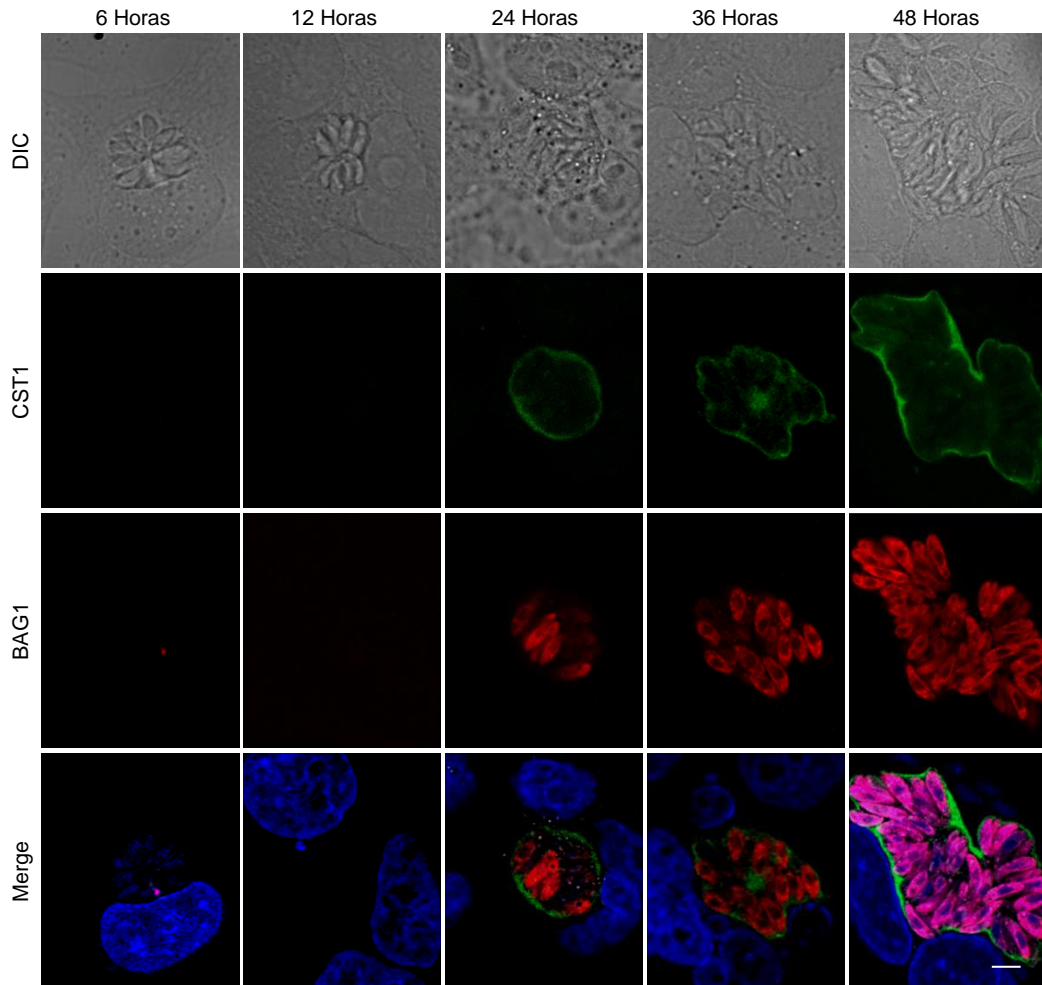


Figura 5. Co-expresión de CST1 y BAG1 en células HEp-2 invadidas con taquizoítos de la cepa RH tratadas con AMF. Las células invadidas por dos horas se expusieron al AMF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6, 12, 24, 36 y 48 h. DIC, Contraste Diferencial interferencial; CST1, marcaje con lectina de *D. biflorus*-FITC, marcaje con anticuerpo (Ac) anti BAG1 y un Ac secundario-TRITC; Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala = 5 μm . (Castro E.K., 2012).

IV. ANTECEDENTES DIRECTOS

Interferón gamma (IFN- γ)

Los modelos *in vitro* de diferenciación a bradizoítos que emplean citocinas pro-inflamatorias, tienen la intención de generar el estrés en el parásito ejercido por la respuesta inmune. Se ha encontrado que la exposición de cultivos de células infectadas con taquizoítos de *T. gondii* a IFN- γ , no solo limita la replicación del parásito sino que también induce la formación de quistes (Bohne *et al.*, 1999). Este efecto solo se ha reportado en cepas de los tipos II y III de *Toxoplasma*, así como en ciertas líneas celulares.

Por ejemplo, no se ha podido inducir la diferenciación a bradizoítos de la cepa virulenta RH tipo I de *Toxoplasma* (Soete, Camus, & Dubremetz, 1994). Estas limitaciones reportadas para el IFN- γ han afectado su caracterización como inductor de la cistogénesis de *T. gondii*. No obstante la inducción exitosa de la cistogénesis por el IFN- γ , a la fecha se desconoce el mecanismo involucrado en dicha inducción, incluyendo la presencia de un receptor específico y las rutas de señalamiento intracelular involucradas en la diferenciación del parásito.

Similarmente, no se han descrito los cambios que ocurren tanto en las células hospederas como en los parásitos durante dicha cistogénesis inducida. Debido a que el IFN- γ es una molécula fisiológica, la inducción de la cistogénesis por esta citocina representa una estrategia que permite entender los procesos que ocurren durante la formación de los quistes tisulares.

Como citocina, el IFN- γ es esencial en el control de la proliferación de *Toxoplasma* durante la fase aguda de la infección, a través de la activación de los macrófagos (Suzuki Y, Claflin J, Wang X, & Lengi A, 2005). El IFN- γ , junto con otras citocinas son moléculas que se expresan en respuesta a la presencia en el organismo de diversos patógenos. En el caso de la infección con *Toxoplasma*, esta juega un papel relevante en el control de la parasitosis al inducir varios mecanismos efectores como; la explosión oxidativa, mediante la cual se produce óxido nítrico y se limita la síntesis de arginina; y la expresión de GTPasas p47, las cuales restringen la replicación del parásito o causan su muerte (Lang, Gross, & Luder, 2007).

Biología del IFN- γ

Por ser el IFN- γ una molécula importante en el control de la parasitosis, así como una molécula inductora de la cistogénesis, se considera pertinente presentar los aspectos más relevantes de la biología de esta molécula. El IFN- γ es una citocina producida por células T (CD4+ y CD8+) y células NK (Figura 6) que tienen una participación importante en procesos inmunopatológicos y en la promoción de la defensa del hospedero (Farrar & Schreiber, 1993). El IFN- γ es una citocina tipo II. Los cDNA para IFN- γ de murino y humano fueron clonados en 1982 por Gray & Goeddel (Gray & Goeddel, 1982, 1983; Gray *et al.*, 1982) y hoy se conoce que los genes que codifican para esta proteína tienen 6 kb, 4 exones y 3 intrones. Los genes de humano y murino han sido localizados en los cromosomas 12 y 10 respectivamente (Trent, Olson, & Lawn, 1982).

El IFN- γ es de 1 a 10.000 veces más activo como inmunomodulador que cualquier otra clase de interferones como el alfa (α) y el beta (β) (Martín-Hernández & García, 2003).

Esta observación ha permitido confirmar que los IFN- α y IFN- β son principalmente agentes antivirales, mientras que el IFN- γ es un inmunomodulador antiparasitario, que también puede ejercer alguna actividad antiviral (Pfefferkorn, 1984). Uno de las características fisiológicas más importantes del IFN- γ es su habilidad para regular las proteínas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) I y II en una gran variedad de células (Figura 6) como macrófagos, astrocitos y células de la microglia así como en células endoteliales y células epiteliales (Trinchieri & Perussia, 1985).

El IFN- γ se relacionó previamente con la limitación de la replicación del parásito (Nathan, Murray, Wiebe, & Rubin, 1983) a través de la activación de la vía JAK-STAT (Schroder, Hertzog, Ravasi, & Hume, 2004), la que promueve la activación del factor STAT1 (Shuai, Schindler, Prezioso, & Darnell, 1992; Watling *et al.*, 1993). Esta proteína se trasloca al núcleo y es crucial en la respuesta del hospedero a la infección, como se ha visto en ratones desprovistos de STAT1, los cuales son extremadamente sensibles a infecciones virales y agentes patógenos (Meraz *et al.*, 1996). Esta susceptibilidad se ha atribuido en el caso de diferentes tipos celulares (Figura 6), a la inducción de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (Taylor & Feng, 1991), pues la activación de esta enzima favorece la degradación del triptófano, aminoácido esencial para el crecimiento y supervivencia del parásito (Pfefferkorn, 1984), el cual es convertido en N-formil quinurenina (Pfefferkorn, Rebhun, & Eckel, 1986). Al igual que con la enzima IDO, se ha visto que el IFN- γ favorece la conversión de L-arginina a L- citrulina mediante la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Hibbs JB Jr, 1987), además de que este aminoácido también es necesario para la supervivencia del parásito (Adams, Hibbs, Taintor, & Krahenbuhl, 1990).

El NO producido también en esta reacción, es un producto celular que parece representar un papel importante en la muerte intracelular de patógenos microbianos en ratones (Figura 6).

Por otra parte, recientes estudios indican que la GTPasa p47, activada por el tratamiento con IFN- γ es crítica para que macrófagos restrinjan el crecimiento de taquizoítos (Suzuki, Sa, Gehman, & Ochiai, 2011). De hecho, se ha visto la inhibición de la proliferación de taquizoítos en astrocitos de murino, activados por IFN- γ (Melzer, Duffy, Weiss, & Halonen, 2008). Esta proteína se acumula en las vacuolas que contienen a los parásitos, vesiculizando la membrana de la VP, para finalmente promover su disrupción (Martens *et al.*, 2005).

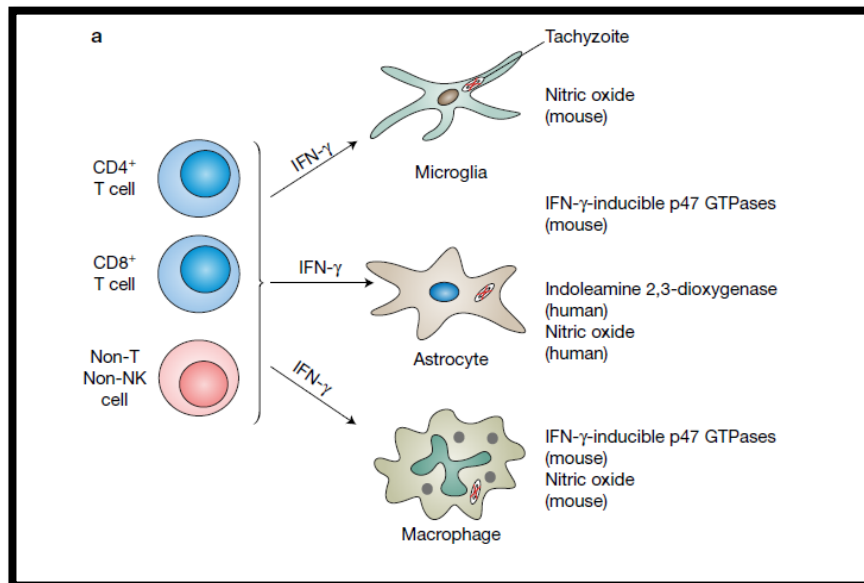


Figura 6. Participación de células efectoras del sistema inmune e inhibición de la replicación del parásito. Producción del IFN- γ y mecanismos activados por el IFN- γ para la inhibición de la replicación del parásito (modificado de: Suzuki *et al.*, 2011).

Interesantemente, aunque el IFN- γ incrementa la expresión de proteínas del MHC de clase II en la mayoría de las células, también inhibe su expresión en células B, mientras que los IFN- α y IFN- β solo pueden regular la expresión de proteínas del MHC de clase I. Además, promueve la presentación de antígenos en macrófagos, no solo a través de la inducción de la expresión del MHC de clase II, sino también por el incremento en los niveles de muchas enzimas intracelulares importantes en el procesamiento antigénico (Johnson & Panitch, 1989). Adicionalmente, esta citocina aumenta la expresión de proteínas de adhesión intercelular ICAM-1, en los macrófagos, lo que mejora la interacción con las células T (Snapper & Paul, 1987).

Estructura del IFN- γ

El IFN- γ humano está compuesto de un polipéptido de 166 aminoácidos con una masa molecular de 19 kDa y con masas de 20 y 25 kDa de acuerdo al grado de glicosilación (Figura 7) (Kelker, Yip, Anderson, & Vilcek, 1983). Esta glicosilación diferencial determina la heterogeneidad en el peso molecular de ésta molécula, en diferentes organismos como humano y murino, oscilando entre 30 y 50 kDa (Rutenfranz & Kirchner, 1988). Mientras la glicosilación no parece interferir en la actividad, si parece influir la vida media de la molécula en circulación (Cantell *et al.*, 1986).

El extremo amino terminal es un ácido piroglutámico mientras que el extremo carboxilo terminal de la molécula es susceptible a la degradación enzimática post transduccional. En conclusión, seis diferentes extremos carboxilo terminal han sido detectados de las formas naturales y recombinantes de IFN- γ (Mulkerrin & Wetzel, 1989). Dado que esta porción de la molécula contiene un gran número de residuos de aminoácidos cargados, su cantidad determina la carga heterogénea de la totalidad de la molécula. Dos polipéptidos se asocian para formar un homodímero con un peso molecular aparente de 34 kDa.

Solo el dímero puede ejercer una actividad biológica, posiblemente porque solo esta forma de la molécula puede promover la dimerización del receptor de IFN- γ (Kelker *et al.*, 1984). Los polipéptidos provenientes del IFN- γ natural están desprovistos de cisteína, es por esto que el homodímero se interconecta por fuerzas no covalentes. La estructura cuaternaria de la molécula explica su sensibilidad a la desnaturalización a temperaturas sobre los 56°C y su sensibilidad al pH (su actividad desciende rápidamente en valores de pH menores a 4.0 y mayores que 9.0) (Hsu & Arakawa, 1985; Youngner & Salvin, 1973).

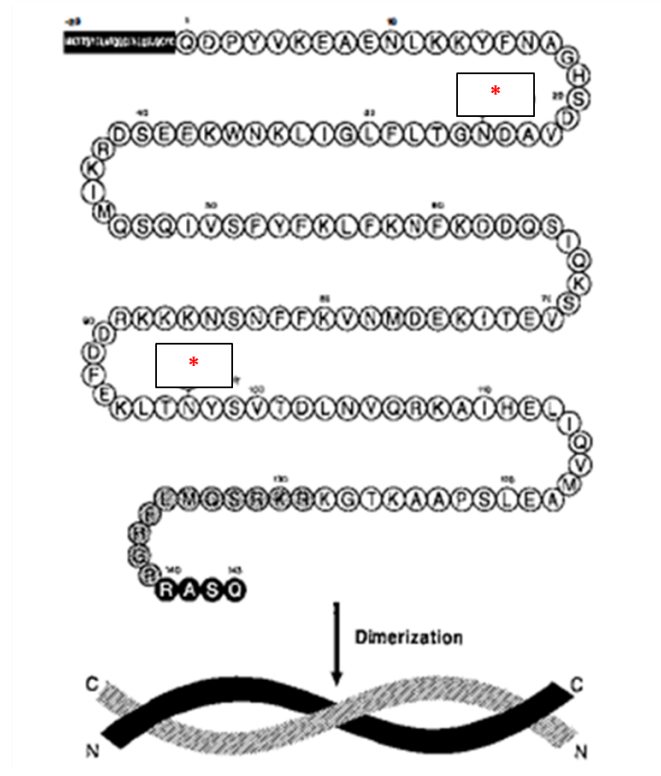


Figura 7. Estructura primaria y secundaria de la molécula de IFN- γ . Asteriscos: posibles puntos de glicosilación de la molécula (Kelker *et al.*, 1983).

La estructura dimérica es compacta y globular. La molécula es helicoidal en un 62% y no presenta hojas plegadas. Cada subunidad consiste de 6 hélices muy cercanas entre sí.

El modelo predice que las subunidades se asocian en una estructura antiparalela en donde se yuxtaponen los extremos carboxilo y amino terminal de cada cadena opuesta. Mientras que el extremo amino terminal se establece firmemente, el extremo carboxilo terminal no adopta una conformación rígida en solución, como se determinó usando cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (Grzesiek *et al.*, 1992). Este mismo modelo sugiere que cada dímero de IFN- γ puede unirse a dos receptores de IFN- γ .

Receptor del interferón gamma (R1 IFN- γ)

El receptor de IFN- γ está constituido por dos subunidades, la α con 472 aminoácidos y un peso molecular de 54,563 D y la subunidad β con 337 aminoácidos y un peso molecular de 37,806 D. Ambas subunidades presentan dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares. Los anticuerpos dirigidos contra la cadena α se le ha denominado R1IFN- γ . En ausencia del ligando, las dos subunidades presentan uniones débiles o están separadas; sin embargo, con la presencia del IFN- γ se acopla el receptor completo activando su funcionalidad (Fischer, Novick, Orchansky, & Rubinstein, 1988).

La unión del ligando induce endocitosis mediada por receptor, con la formación característica de vesículas de clatrina. La dinámica molecular del receptor del interferón (R1IFN- γ) ha sido elucidada usando técnicas de inmunoprecipitación y marcaje radioactivo.

El receptor se sintetiza en el retículo endoplásmico y glicosilado en el aparato de Golgi. Al final ocurren tres glicosilaciones intermedias con masas moleculares de 65, 70 y 75 kDa (Mao, Aguet, & Merlin, 1989). Estos receptores glicosilados se expresan en la superficie de las células. (Celada, Allen, Esparza, Gray, & Schreiber, 1985).

Esta masa molecular heterogénea es el resultado de las diferencias de glicosilación entre algunas células. Después de la interacción con el ligando en la superficie celular, el dominio intracelular del receptor es fosforilado en residuos de serina y treonina. Aunque la función de esta fosforilación se desconoce, la velocidad y extensión con la que sucede esta reacción se ha relacionado con la magnitud de la respuesta inducida por IFN- γ . El complejo receptor-ligando fosforilado es internalizado, en un compartimento ácido y disociado. El IFN- γ libre migra eventualmente al lisosoma donde es finalmente degradado.

En muchas células, como fibroblastos, los receptores desacoplados entran en grandes reservas intracelulares y eventualmente se reciclan a la superficie de la célula. La cantidad de reservas de los receptores intracelulares es generalmente de 2 a 4 veces más grande, que la cantidad de receptores expresados en la superficie celular (Finbloom, 1988).

La habilidad del receptor de IFN- γ para reciclarse en macrófagos es aun controversial. Mientras algunos reportes indican que el reciclamiento ocurre en fagocitos mononucleares primarios (Celada & Schreiber, 1987), en otros reportes se afirma que los receptores internalizados son degradados en monocitos primarios (Fischer *et al.*, 1988). La caracterización completa del receptor de humano fue lograda mediante clonación.

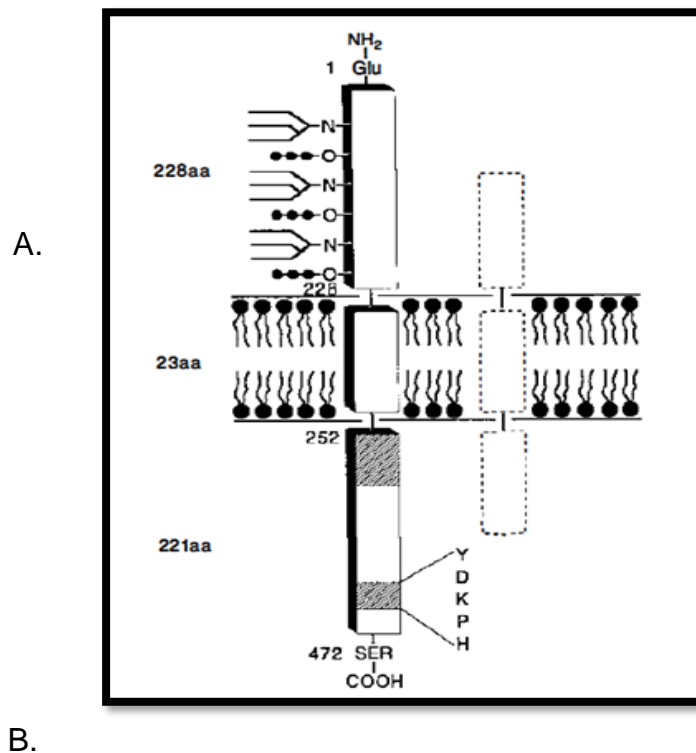
Los genes del receptor tanto en humano, como en murino se hallaron en el cromosoma 6 y 10 respectivamente (Kozak *et al.*, 1990). El tamaño de los genes de los receptores son 30 kb. Cada uno consiste de 7 exones. (Tabla 1, Figura 8). Las proteínas maduras consisten de 472 y 451 aminoácidos, respectivamente y tienen una masa molecular de 54.5 y 49.8 kDa (Tabla 1).

Ambas proteínas se encuentran orientadas simétricamente alrededor de un dominio de 23 aminoácidos transmembranales. Presentan un dominio extracelular de 228 aminoácidos que contiene múltiples residuos de cisteína (Figura 9) (Hershey & Schreiber, 1989). Estos oligosacáridos contribuyen aproximadamente en 25 kDa del peso molecular aparente de la proteína madura.

PROPIEDAD	R1 IFN- γ	
	HUMANO	MURINO
Secuencia primaria		
Péptido señal	17 aa	26 aa
Forma madura	472 aa	451 aa
Homología	52 %	
Estructura de dominios		
Extracelular	228 aa	228 aa
Transmembranal	23 aa	23 aa
Intracelular	221 aa	200 aa
Sitios potenciales de N- glicosilaciones	5	5
Peso molecular predicho	54,563	49,819
Peso molecular de la molécula madura	90,000	90,000
Contenido serinas/ treoninas		
En toda la molécula	17.6%	20%
En dominio extracelular	11.8%	15.8%
En dominio intracelular	23.3%	24.6%

Tabla 1. Comparación estructural del receptor de IFN- γ de humano y murino. Tomada de: (Farrar & Schreiber, 1993).

Se ha demostrado que el dominio extracelular es suficiente para que ocurra un enlace altamente afín y que la glicosilación del receptor no es crítica para la interacción entre el ligando y el receptor (Fischer, Thoma, Scheurich, & Pfizenmaier, 1990). La digestión proteolítica del dominio soluble extracelular demostró que los seis residuos del extremo amino terminal no se requieren para el enlace ligando - receptor.



Característica	Posición	Longitud	Descripción	Vista gráfica
Dominio topológico	18-245	228	Extra celular	
Transmembranal	246-266	21	Helicoidal	
Dominio topológico	267-489	223	Citoplásmico	

Figura 8. Ubicación subcelular y topología de R1IFN- γ . A). Ubicación subcelular del R1IFN- γ ; B). Topología de la proteína. ("Uniprot," 2015).

En cuanto al dominio intracelular del receptor, las proteínas de humano como de murino presentan 221 y 200 residuos, respectivamente. Ambos son particularmente ricos en serinas y treoninas. Estos aminoácidos constituyen aproximadamente el 25% de los residuos dentro del dominio. Además, el dominio intracelular de la proteína contiene entre 6 y 5 residuos de tirosinas, de los cuales al menos 5 son conservados (asteriscos rojos - Figura 9).

10	20	30	40	50
MALLFLLPLV	MQGVSRAEMG	TADLGPSSVP	TPTNVTIESY	NMNPIVYWEY
60	70	80	90	100
QIMPQVPVFT	VEVKNYGVKN	SEWIDACINI	SHHYCNISDH	VGDPNSNLWV
110	120	130	140	150
RVKARVGQKE	SAYAKSEefa	VCRDGKIGPP	KLDIRKEEKQ	IMIDIFHPSV
160	170	180	190	200
FVNGDEQEVD	YDPETTCYIR	VYNVYVRMNG	SEIQYKILTQ	KEDDCDEIQC
210	220	230	240	250
QLAIPVSSLN	SQYCVSAEGV	LHWGVTTEK	SKEVCITIFN	SSIKGSLWIP
260	*	280	290	300
VVAALLLFLV	LSLVFICFYI	KKINPLKEKS	IILPKSLISV	VRSATLETKP
* 310	* 320	330	340	350
ESKYVSLITS	YQPFsLEKEV	VCEEPLSPAT	VPGMHTEDNP	GKVEHTEELS
360	370	380	390	* 400
SITEVVTTEE	NIPDVVPGSH	LTPIERESSS	PLSSNQSEPG	SIALNSYHSR
410	420	430	440	450
NCESDHSRN	GFDTDSSCLE	SHSSLSdSEF	PPNNKGEIKT	EGQELITVIK
* 460	470	*		
APTSFGYDKP	HVLVDLLVDD	SGKESLIGYR	PTEDSKEFS	

Figura 9. Secuencia de aminoácidos del R1IFN- γ . Proteína completa con su respectivo péptido señal: 489 aa. 54,563 de masa molecular (Da). Los asteriscos rojos muestran residuos conservados de tirosina ("Uniprot," 2015).

Afinidad del receptor

Es notable que cuando la expresión del receptor en diferentes tejidos es analizada a nivel de mRNA o proteico, la elevada expresión que se observa en algunos tejidos, no necesariamente representa que tenga participación o funciones inmunológicas primarias.

Específicamente, en piel, en nervio, y a nivel de placenta los receptores de IFN- γ son a menudo 10 a 100 veces de los observados en bazo o células hematopoyéticas. A la fecha se desconoce la función de esos receptores a IFN- γ en tejidos no relacionados con la respuesta inmune.

Los receptores se enlazan al ligando, IFN- γ con alta afinidad ($K_a = 1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-10}$ M) y es expresado en la mayoría de las células solo en niveles modestos de (200 a 25.000 sitios/célula). Estudios previos en una amplia variedad de células de diferentes tejidos, demostraron la variabilidad en la cantidad de sitios afines por el ligando y la similitud entre la afinidad que presenta el receptor en dichos linajes (Tabla 2) (Van-Loon *et al.*, 1991). Entre estos linajes se presentaron células epiteliales como células HEp-2 (células epiteliales de cáncer de laringe) o HEp-G2 (hepatocitos epiteliales), que muestran entre 4900 y 6200 sitios de unión. Las constantes de afinidad presentaron valores de alrededor 0.5 y 3.5×10^{-10} M en todos los linajes.

En cuanto al aparente peso molecular del receptor, las masas variaron en 110 y 90 kDa en técnicas de Western blot. La diferencia en masa molecular resultó de diferentes grados de N-glicosilaciones del dominio extracelular del receptor. Sin embargo, el receptor de cada célula parece presentar las mismas características bioquímicas e inmunológicas.

LINAJE CELULAR	TIPO DE LÍNEA CELULAR	SITIOS DE UNIÓN POR CÉLULA	KDS (1X10 ⁻¹⁰)	NÚMERO DE EXPERIMENTOS
Raji	Linfocito B	8,500 +/- 2,500	2.4 +/- 1.3	17
GM1	Monocitos	2,100 +/-1,000	2.0 +/- 1.7	5
U937	Promonocitos	5,300 +/- 1,800	2.5 +/- 3.3	4
HL60	Promielocitos	3,000 +/- 1,600	1.3 +/- 0.8	4
WISH	fibroblastos	1,800 / 5,700	3.4/3.5	2
HEPG2	Epitelio hepático	4,900 / 6,200	1.8/0.5	2
Jurkat	Linfocitos T inmaduros	500	1.0	1
Molt-4	Linfocitos T inmaduros	700	1.1	1
COLO205	Epitelio de colón	10,300	1.7	1
Monocitos de sangre		2,800 +/- 900	1.9 +/- 1.6	3
Linfocitos de sangre		600	1.0	1

Tabla 2 Sitios de unión y afinidad en diferentes linajes celulares. Tomado de: (Van-Loon *et al.*, 1991).

Señalización del receptor

Las subunidades R1 IFN- γ y R2 IFN- γ constituyen el receptor completo. Estudios previos reportan que estas subunidades se ensamblan antes de unirse al ligando (Krause *et al.*, 2002). Una vez ocurre la unión del ligando, las cadenas de los dominios intracelulares del receptor se abren para permitir la asociación con otras proteínas tipo JAK cinasas. La unión del ligando induce la auto-fosforilación de JAK 2, proteína anclada a R2 IFN- γ (Briscoe *et al.*, 1996). Posteriormente, JAK2 fosforila a JAK1 en su dominio 252 - 255 (LPKS) y esta activación a su vez, fosforila un residuo crítico de tirosina en la posición 440 - 444 (YDKPH) del R1 IFN- γ . Dichos residuos crean sitios de acoplamiento adyacentes para dominios SH2 de la proteína STAT1.

Así como, el receptor recluta un homodímero de STAT1, que se une desde su residuo de tirosina 701 cercano al carbono terminal (Briscoe *et al.*, 1996). Los cuatro residuos críticos de tirosina presentes en JAK1, JAK2, R1 IFN- γ y STAT1) se fosforilan después de 1 minuto de tratamiento con la citocina (Igarashi *et al.*, 1994). Luego de ocurrir esta fosforilación, se disocia el homodímero de STAT1 (también conocido con factor de activación de IFN- γ). Posteriormente entra al núcleo, se une a elementos promotores para iniciar o suprimir la transcripción de genes reguladores de IFN- γ ; (Ramana, Chatterjee-Kishore, Nguyen, & Stark, 2000). La primera ola de factores de transcripción de IFN- γ ocurre en los primeros 15 y 30 min de tratamiento con la citocina (Kerr & Stark, 1991).

Endocitosis mediada por receptor

La endocitosis mediada por receptor es un proceso por el cual el ligando es internalizado en la célula como un requisito previo a la activación celular. Este proceso es general y se aplica a lo que sucede cuando el IFN- γ se une a su respectivo receptor para ser internalizado, previo a la activación de las rutas de señalamiento intracelular correspondientes. En la endocitosis mediada por receptor, las moléculas específicas se internalizan selectivamente. Estas moléculas se encuentran en el espacio extracelular en concentraciones bajas, como pueden ser citocinas, hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, hierro, enzimas, vitaminas y colesterol. Las moléculas específicas que son internalizadas se unen a sus respectivos receptores, que están localizados en el exterior de la superficie celular y poseen un sitio específico de unión a la molécula. Una vez que ocurre el enlace, los receptores se mueven en la membrana plasmática y se concentran en pequeñas depresiones llamadas invaginaciones de clatrina (Schmid, 1997).

Estas depresiones se encuentran cubiertas en su cara citosólica por una proteína denominada clatrina (Figura 10) que es la responsable de la depresión física de la membrana; una vez formada la vesícula endocítica, la cubierta de clatrina se separa y las vesículas son transportadas por la vía endocítica al interior de la célula, ya sea para fusionarse a endosomas tempranos, tardíos o directamente a los lisosomas para su degradación (Harvey *et al.*, 2000).

Las invaginaciones de clatrina ocupan el 2% de la membrana plasmática, las vesículas cubiertas se forman en 1 minuto y las vesículas liberadas se fusionan en segundos con los endosomas tempranos. Cuando se desprenden las vesículas de la membrana plasmática y se liberan al espacio intracelular, se remueve la cubierta de clatrina, de esta manera se facilita la endocitosis de receptores en vesículas pequeñas menores a 0.1 μm de diámetro. Así, se forma una capa sobre la cara citoplasmática de la membrana. Las vesículas que aun transportan los receptores y las moléculas unidas específicamente se fusionan con la membrana de otro organelo denominado endosoma. La función de los endosomas es empaquetar y procesar a las moléculas en nuevas vesículas y enviarlas a diferentes lugares dentro de la célula.

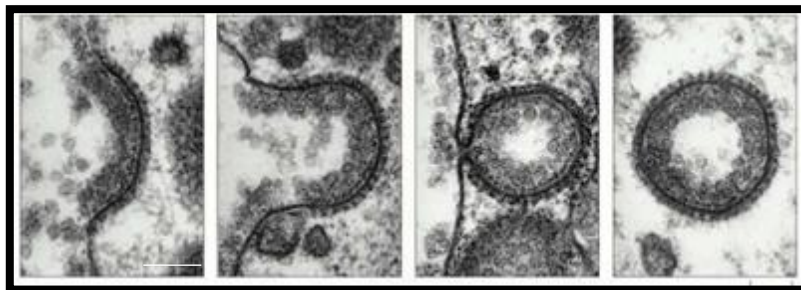


Figura 10. Formación de vesículas cubiertas con clatrina en la membrana celular. (Tomado de: Harvey *et al.*, 2000). Escala = 0.5 nm.

V. JUSTIFICACIÓN

El Interferón γ (IFN- γ) es una importante citocina que al activar a células efectoras de la respuesta inmune, limita el crecimiento de *Toxoplasma* y otros patógenos en el organismo. En el caso particular de *Toxoplasma*, esta citocina tiene un efecto adicional e importante en el ciclo de vida del parásito, pues funciona como una molécula inductora de la cistogénesis o enquistamiento tisular, como ha sido reportado para las cepas de baja virulencia de los genotipos II y III de *T. gondii*. Sin embargo, aún se desconoce el efecto del IFN- γ en el genotipo I, que corresponde a las cepas altamente infectivas como la RH y que se relacionan con la encefalitis y neumonía en pacientes inmunosuprimidos.

No obstante, los reportes sobre el efecto del IFN- γ en las cepas de baja y media virulencia de *Toxoplasma*, no se conocen los mecanismos de inducción, las señales de transducción involucradas o los eventos celulares y moleculares ocurridos en la célula hospedero o en el mismo parásito durante la transformación de la célula infectada en un quiste tisular. Actualmente, no existen reportes relacionados con la composición bioquímica de la pared quística, de la matriz intraquística o incluso de los mismos bradizoítos y sus organelos. Caracterizar la cistogénesis en detalle de una cepa altamente invasiva, permitirá conocer los eventos propios de la biología del parásito y la expresión diferencial de moléculas, cuya naturaleza podrían servir para el diseño de fármacos dirigidos a blancos en el quiste o de moléculas con interés inmunogénico, en la búsqueda de estrategias profilácticas y de inmunoprotección.

Con el fin de caracterizar precisamente estos eventos celulares y moleculares que ocurren en la célula hospedera, en la vacuola parasitófora y en el parásito mismo durante el proceso de cistogénesis, en el presente proyecto se estudió el proceso de cistogénesis *in vitro*, inducido por exposición a la citocina IFN- γ de células HEp-2 invadidas con la cepa RH (cepa que presenta elevada virulencia y que hasta el momento, ha sido descrita como no inductora de quiste tisular).

VI. HIPÓTESIS

El tratamiento con IFN- γ , en células infectadas con taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, induce la diferenciación de los parásitos a la forma de bradizoítos con modificaciones moleculares, celulares y estructurales de la célula hospedera y de la vacuola parasitófora para generar un quiste tisular *in vitro*.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Inducir la cistogénesis de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* por exposición de células infectadas a IFN- γ y determinar los cambios que ocurren en la célula hospedera invadida que resultan en un quiste tisular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar una célula hospedera que exprese el receptor de IFN- γ a fin de que pueda inducir el desarrollo de la cistogénesis de *Toxoplasma gondii* mediante la exposición a IFN- γ .
2. Inducir la cistogénesis en las células blanco invadidas con *Toxoplasma gondii*, evaluando la exposición a diferentes concentraciones y tiempos de incubación con IFN- γ y detectando la expresión de proteínas asociadas al quiste tisular como BAG1 de bradizoítos, CST1 de la pared quística y SAG1 de taquizoítos, mediante Western blot y microscopia confocal.
3. Caracterizar la ultraestructura de la célula hospedera, del parásito intracelular, así como de la vacuola parasitófora, durante la transformación a un quiste tisular inducida por exposición al IFN- γ mediante microscopia electrónica de transmisión y barrido.

VIII. METODOLOGÍA

Cultivo celular

Se cultivó la línea celular HEp-2 (células epiteliales humanas de carcinoma de laringe) (HEp-2, ATCC-CCL 23) en esterilidad y en una campana de bioseguridad tipo II (Nuair, Biological Safety Cabinet Type IIA/B3, Plymouth MN, EE.UU.) sobre cubreobjetos de vidrio, o en cajas Petri de plástico de 33 mm o en botellas de cultivo de 25 cm² (Corning Inc., New York, EE.UU.) y se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 8% (Byproducts, Guadalajara, Jalisco, México) y una solución (PES – Sigma St. Louis MO, EE.UU) con 40 unidades/mL de penicilina y 20 µg de estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Esta línea celular se seleccionó como modelo, debido a que el parásito presenta un desarrollo intracelular normal y la conformación típica en sus etapas de replicación. Además las células HEp-2 presentan el receptor a IFN-γ.

Animales

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad para el mantenimiento de la cepa RH de *T. gondii* mediante inoculación intraperitoneal. Los animales sanos e infectados se mantuvieron en cajas con sistema de filtro y mantenidos en el bioterio del Cinvestav – Zacatenco, en condiciones de temperatura y suministro de aire controlado y agua estéril en los bebederos. El manejo de los animales se hizo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los ratones fueron proporcionados por la unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio del CINVESTAV.

Mantenimiento de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*

La cepa RH del genotipo I de *T. gondii* se manejó bajo las medidas de bioseguridad correspondientes a patógenos de nivel de bioseguridad tipo II, de acuerdo al *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* publicado por el CDC. (5ta Edición, *Centers for Disease control and Prevention National Institutes of Health*). Durante el manejo del patógeno se utilizaron bata, guantes, cubrebocas y condiciones de esterilidad.

Para el mantenimiento de los taquizoítos de *Toxoplasma*, se realizaron pases sucesivos por medio de inoculaciones intraperitoneales en ratones hembras BALB/c con 3×10^6 taquizoítos en 100 μ L de PBS estéril a pH 7.4. Para lo cual cada 3 o 4 días se sacrificaron ratones por medio de dislocación cervical, se inocularon 5 mL de PBS estéril (salina fosfatos en mmoles: 137 NaCl, 2.7 KCl, 7.9 Na₂HPO₄, 1.1 KH₂PO₄, pH 7.4 – JT Baker, Edo México, México) en la cavidad peritoneal previamente limpiada con etanol y posteriormente se recuperó el líquido peritoneal conteniendo a los taquizoítos. La suspensión obtenida de parásitos se centrifugó a 1700 rpm en un rotor de 16.1 cm de diámetro, por 10 min, se desechó el sobrenadante y el botón de parásitos se resuspendió en 5 mL de PBS estéril.

La suspensión parasitaria se lavó dos veces más por centrifugación. La suspensión de taquizoítos se filtró a través de membranas Millipore con poros de 5 μ m de diámetro (Millipore, Bedford MA) a fin de eliminar los macrófagos peritoneales contaminantes. Los taquizoítos purificados fueron cuantificados en cámara de Neubauer y se ajustó su número de acuerdo a los ensayos por realizarse.

Validación de la presencia del R1IFN- γ en células HEp-2

Para validar que las células HEp-2 expresaban el receptor de IFN- γ (R1IFN- γ), se utilizó un anticuerpo primario de chivo contra la subunidad α del R1IFN- γ (R1IFN- γ - catálogo No. I5152 de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) en dos metodologías: a) *Western blot* y b) Inmunofluorescencia, adicionalmente c) se determinó que el R1IFN- γ era funcional al evaluar la internalización de IFN- γ fluorescente por medio de endocitosis mediada por receptor, registrada por time-lapse en un microscopio de fluorescencia.

Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se siguió el método de Bradford (Bradford, 1976). Se preparó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) en un rango de 0.05 a 0.5 mg/mL. Para la determinación de proteínas, se tomaron 10 μ L de la muestra problema o del estándar de BSA. La muestra fue previamente tratada o diluida en 50 μ L de *buffer* de lisis, y se le adicionó 200 μ L del reactivo de Bradford (Biorad, Hercules, CA, EE.UU) diluido 1:5 en placas de 96 pozos de poliestireno. Se incubó por 5 min y se leyó la absorbancia a una longitud de 595 nm. Se graficó la curva de calibración y se determinó la concentración proteica de la muestra mediante la ecuación de la recta.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las células HEp-2 crecidas en cajas Petri de 33 mm en una confluencia al 100%, se rasparon con ayuda de un policía y la suspensión celular se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se lisaron mediante la adición de *buffer* de lisis y se sonicó 4 veces por 1 min cada vez a 40 Hz y en hielo.

El lisado completo fue sometido a electroforesis en condiciones desnaturizantes en gel de poliacrilamida al 10% y SDS polimerizado con persulfato de amonio y (APS) y (TEMED). Los geles se corrieron a 80 V para el gel concentrador y a 100 V para el gel separador. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie al 13% en metanol al 50% más ácido acético al 10% y se agitó por 4 h a TA. Los geles se decoloraron con una mezcla que contenía metanol al 40% más ácido acético al 10% en agua destilada, el tratamiento se siguió hasta observar las bandas. Para geles de 10 pozos se colocaron 20 μ g de muestra por pozo. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.).

Western blot del R1IFN- γ en el modelo celular HEp-2

Con el fin de identificar la expresión del R1IFN- γ , se realizó un análisis por Western blot, para lo cual se prepararon extractos de células HEp-2 no infectadas, que se lisaron con buffer de lisis compuesto por β -mercaptoetanol, SDS al 1 %, EGTA, Tris HCl, TLCK, TPCK y PMSF. El extracto se preparó por triplicado y se le adiciono buffer de muestra compuesto con glicerol, Tris, SDS, β mercaptoetanol a pH 6.8. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida –SDS al 10% (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizantes. El gel se tiñó con azul de Coomassie por toda la noche. Otro gel idéntico fue transferido a membranas de nitrocelulosa a 200 mA durante 70 min para el análisis por Western blot. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 6% disuelta en TBS-T al 0.1% durante 2 h en agitación, posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario de chivo contra la subunidad α del R1IFN- γ . Esta incubación se realizó por 1 h en agitación y posteriormente por toda la noche a 4°C.

La membrana se lavó con TBS-T conteniendo 0.1% de Tween 20, por 3 min y se incubó con el anticuerpo secundario de conejo anti- IgG de chivo acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dalla, TEX, EE.UU, dil 1:7000 en TBS-T al 0.1 %) durante 1 h y se lavó 5 veces por 5 min con TBS-T al 0.1%. La reacción se reveló empleando un kit de quimioluminiscencia de acuerdo a las instrucciones del proveedor (ECL-Plus Healthcare, GE, EE.UU.).

Distribución temporal del R1IFN- γ en células HEp-2 expuestas al IFN- γ .

Con el fin de comprobar los cambios en la distribución topográfica del R1IFN- γ como resultado de la exposición de las células HEp-2 al IFN- γ , se sembraron células HEp-2 sobre cubreobjetos de vidrio por 24 h hasta alcanzar una confluencia del 60%. Luego se pulsaron con 200 U/mL, de IFN- γ disuelto en MEM con SFB al 8% por tiempos de incubación de 1, 5, 10, 15 y 30 min que son los tiempos reportados en los cuales transcurre la cascada de señalización activada por la citocina (Kerr & Stark, 1991).

Como control negativo se evaluó la fluorescencia basal de células HEp-2 sin tratamiento de IFN- γ . Pasados los tiempos de incubación respectivos, se fijaron las células crecidas en los cubreobjetos con paraformaldehído (PAF) (Electron Microscopy Science, EM grade purified) al 2% recién preparado durante 30 min. Luego las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron con tritón X-100 (Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al 0.5 % durante 1 min, nuevamente se lavaron con PBS y se bloquearon las células con SFB al 1% por 20 min. A continuación las células se incubaron con el anticuerpo primario contra el R1IFN- γ diluido 1:100 en PBS (catálogo No. I5152 de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) a 4°C durante toda la noche.

Al siguiente día se lavaron las células con PBS 5 veces por 5 min y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario anti-chivo acoplado a FITC (Jackson immunoresearch, West Grove, PA, EE.UU) de nuevo se lavaron 5 veces por 5 min y se incubaron con DAPI (molecular probes, Oregon, EE.UU) durante 20 min, finalmente se realizaron lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio usando como medio de montaje 7 μ L de Vectashield (Vector laboratorios, Burlingame, CA, EE.UU).

Los cubreobjetos fueron sellados con barniz de uñas y se observaron en un microscopio de fluorescencia y contraste de fases Axioscope 2 Mot Plus con un objetivo 100x Plan Neofluar, 1.3 N.A. (Carl Zeiss, México) y se procesaron con el software Axiovision de Carl Zeiss el microscopio confocal LSM-700 Zeiss del departamento de Bioquímica del CINVESTAV y las imágenes se procesaron con el software ZEN lite for windows (Carl Zeiss).

Endocitosis mediada por receptor inducida por exposición al IFN- γ en las células HEp-2.

Con el fin de demostrar que el R1IFN- γ expresado en el modelo celular seleccionado (células HEp-2) era funcional, se indujo la endocitosis del R1IFN- γ por la exposición a 200 U/mL IFN- γ . Debido a que el IFN- γ es una proteína recombinante de origen humano y las células HEp-2 son de origen humano, se esperaba una inducción de la endocitosis del R1IFN- γ . Las células HEp-2 se crecieron sobre cubreobjetos a una confluencia del 80% y posteriormente se montaron sobre una cámara de observación que permitió la perfusión de una solución de IFN- γ .

El registro de los cambios en las células como resultado de la interacción con el IFN- γ , se hizo mediante time lapse cuyo registro se inició unos segundos antes de adicionar el ligando (IFN- γ) y se continuó por hasta 10 min. La temperatura de la platina se mantuvo entre 30-37°C, recambiando la solución del medio de cultivo cada min.

El time lapse se programó mediante el software Axiovision de Carl Zeiss acoplado al microscopio, de tal manera que se registraran imágenes cada 10 segundos. La reproducción y análisis se hizo con el fin de conformar una fotocomposición de los eventos desarrollados durante la endocitosis. Como control negativo se profundieron las células HEp-2 con MEM con SFB al 8%.

Expresión de la glicoproteína CST1 inducida por la exposición de células HEp-2 invadidas con taquizoítos de la cepa RH a IFN- γ

Con el fin de determinar si la exposición a IFN- γ inducía la diferenciación de los taquizoítos intracelulares en bradizoítos con formación de un quiste tisular, se detectó la expresión de la glicoproteína CST1 mediante fluorescencia utilizando la lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC.

Los cultivos de células HEp-2 a una confluencia del 60% se infectaron con 1×10^6 taquizoítos por 2 h, posteriormente se eliminaron los parásitos no invasores y se inició el tratamiento con concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 U/mL de IFN- γ disuelto en MEM con SFB al 8% por: 6, 12, 24, 36, 48, y 72 h en el incubador de 37°C y 5% de CO₂. Durante el tiempo de tratamiento, se recambió la solución de IFN- γ cada 48 h.

En aquellos casos en los cuales se mantuvo el cultivo por más de 6 días, ya no se recambió el IFN- γ y solo se realizaron lavados con MEM sin SFB cada 24 horas a fin de, eliminar los parásitos extracelulares que pudieran afectar la integridad del cultivo. Al final de cada tiempo, se fijaron las células con 2% de PAF (Electron Microscopy) por 30 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con tritón X-100 (Sigma, Aldrich) al 0.5 % por 3 minutos.

Después de lavarse con PBS, se bloqueó con SFB al 1% por 20 min. A continuación las células se incubaron con la lectina acoplada a FITC (Vector, Burlingame CA, EE.UU, dil 1:200 en PBS) por 2 h a TA y se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI (molecular probes, Oregon, EE.UU) por 20 min. Finalmente, se lavaron con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre laminillas usando Vectashield (Vector laboratorios). Los cubreobjetos se sellaron con barniz y se observaron en el microscopio de fluorescencia y en el microscopio confocal. Se cuantificó el número de VP's que presentaban a la CST1 en al menos 300 vacuolas por laminilla y se repitió en 5 ensayos independientes.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de VP's positivas a CST1, con respecto al tiempo y para cada concentración evaluada. Como control negativo, se expusieron células invadidas solo a MEM-SFB al 8% sin IFN- γ por los tiempos indicados. Como control positivo, se expusieron células invadidas con 50 μ g AMF (un inductor de cistogénesis que previamente se usó y caracterizó en el laboratorio como se presenta en la Figura 5), durante los mismos tiempos de incubación y se procesaron para fluorescencia como se describió arriba.

Expresión de la glicoproteína CST1 de la pared de quiste tisular en células HEp-2 invadidas con cepa RH de *T. gondii* por exposición a IFN- γ

Con el fin de determinar la diferenciación de los taquizoítos intracelulares en bradizoítos y transformación de la VP en un quiste tisular, se detectó la expresión de la glicoproteína CST1 inducida por la exposición al IFN- γ en células HEp-2 invadidas con taquizoítos de la cepa RH, mediante Western blot utilizando la lectina de *D. biflorus* acoplada a peroxidasa de rábano (catálogo No. L1287 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). Las células fueron invadidas por 2 h, y posteriormente expuestas al IFN- γ (200 U/mL) por 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h.

Al término, se rasparon las células y se lisaron en buffer de lisis, posteriormente se procedió a realizar la electroforesis en SDS y el Western blot. La lectina de *D. biflorus*-peroxidasa se utilizó a una dilución de 1:1000 en TBS-T al 0.1%. Para el control de carga se usó la misma membrana y se incubó con un anticuerpo anti vimentina de ratón diluido 1:400. El proceso de transferencia, incubación con el ligando y revelado se realizó de la misma forma que para el Western blot del R1IFN- γ arriba descrito.

Expresión de las proteínas SAG1 y BAG1 de taquizoítos y bradizoítos respectivamente durante la cistogénesis inducida por IFN- γ

Con el fin de monitorear el progreso de la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos durante la cistogénesis inducida por IFN- γ , se realizó la inmunotinción de las proteínas SAG-1 y BAG1 para taquizoítos y bradizoítos respectivamente.

Una vez que las células HEp-2 infectadas con los taquizoítos, se expusieron al IFN- γ por 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h, las células fueron procesadas para inmunofluorescencia siguiendo el protocolo arriba mencionado y utilizando un anti-SAG1 de conejo (donado por la Dra C. Mercier, UJF, Grenoble FRA) y un anti-BAG1 de ratón generado en el laboratorio previamente mediante la inoculación de un péptido sintético específico. La marca de SAG1 fue evidenciada mediante el uso de anticuerpos de chivo anti conejo acoplados a TRITC (Jackson immunoresearch, West Grove, PA, EE.UU) y para BAG1 se utilizó un anticuerpo de conejo anti- IgG de ratón acoplado a TRITC (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU). Para realizar una co-localización con la glicoproteína CST1, las células fueron lavadas con PBS y se incubaron con lectina de *D. biflorus* acoplada a FITC (dilución 1:200 en PBS) por 2 horas a TA.

Una vez lavados, se incubaron con DAPI (molecular probes) por 20 min. Como controles negativos se expusieron células invadidas en MEM con SFB al 8% durante los tiempos ya especificados (sin IFN- γ). Las células fueron observadas en el microscopio de fluorescencia y en el microscopio confocal.

Análisis ultraestructural de la cistogénesis inducida por exposición a IFN- γ por microscopia electrónica de barrido por la técnica de Tanaka y mediante microscopía electrónica de transmisión en corte fino

Las células HEp-2 cultivadas a confluencia del 60% se invadieron con los taquizoítos RH en una relación 1:20 (HEp-2: parásito) por 1 h y posteriormente y se expusieron a 200 U/ml de IFN- γ disuelto en MEM con SFB al 8% por 3, 6 y 10 días con renovación de la solución de IFN- γ cada 48 h.

Para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), las células y quistes en formación se fijaron con glutaraldehído al 2.5% por 2 h, se cosecharon con policía y se lavaron por centrifugación de 1500 rpm por 10 min. Las células y los quistes en formación se depositaron en filtros (Millipore) resistente a etanol de 0,22 μm . Los filtros se lavaron con PBS, y se post-fijaron con una solución de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en PBS por 12 h a 4°C. Después de lavarse con PBS, se deshidrataron por pases en concentraciones crecientes de etanol del 50 al 100% a TA.

Se realizó el secado y punto crítico del CO_2 de las muestras en un secador marca Tousimis (Mod 2085, Tousimis Research Corp. EE.UU) y finalmente se cubrieron con una delgada capa de oro en un evaporador (Desk II evaporator, Denton Vacuum, Florida, EE.UU). Las muestras se observaron en el MEB, JSM-6510LV (JEOL, Japan).

Para Microscopía Electrónica de Transmisión, las células y los quistes en formación fijados con glutaraldehído y post-fijados con OsO_4 , se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol desde 50 hasta 100% por 10 min en cada concentración a TA y en agitación.

Posteriormente, las muestras se infiltraron gradualmente en una mezcla de resina Spurr (EMS, Hatfield PA) –etanol absoluto (1:1, 3:1 y posteriormente en resina al 100% dos veces). Una vez infiltradas, las muestras se colocaron en moldes y se polimerizaron a 60°C por 48 h. De los bloques obtenidos se realizaron cortes finos en el ultramicrotomo (Reichert Jung, Austria), se colectaron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo saturados.

Las rejillas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (MET), JEM 1400 (JEOL, LTD, Japan). El procesamiento para la observación al MEB y al MET, se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica del LANSE-CINVESTAV, en colaboración con la QFB Sirenia González.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados para determinar la media \pm SD y fueron analizados usando la prueba ANOVA de una vía, el test de múltiples comparaciones de Tukey y el programa GraphPad Prism 6. La cuantificación de las unidades arbitrarias de densitometría se obtuvo del software Image J. Cada ensayo realizado a lo largo del presente trabajo se reprodujo de 3 a 5 veces de acuerdo al ensayo particular y en eventos independientes.

IX. RESULTADOS

Validación del modelo celular para la inducción de la cistogénesis *in vitro* mediada por IFN- γ

Con el fin de validar que el modelo celular (HEp-2) utilizado para la inducción de la cistogénesis, mediante el tratamiento con IFN- γ tenía expresado el receptor de IFN- γ , se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la subunidad α del receptor (Ac anti-R1IFN- γ).

El análisis realizado mediante Western blot mostró en los extractos totales de células HEp-2 una banda específica entre 40 y 50 kDa (Figura 11), que corresponde al peso molecular del dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor de interferón gamma (R1IFN- γ), reportado en las especificaciones técnicas del proveedor (Sigma Aldrich).

La masa de la subunidad R1IFN- γ es de aproximadamente 54.5 kDa. La ficha técnica del anticuerpo indica que se reconoce una banda de entre 40-50 kDa tal y como se observa en nuestra determinación. Este anticuerpo recombinante de humano anti R1IFN- γ no presentó reactividad cruzada con la subunidad β del receptor (R2IFN- γ). La presencia de la banda al peso esperado es evidencia que las células HEp-2 (y como se esperaba) expresan la subunidad α de este receptor.

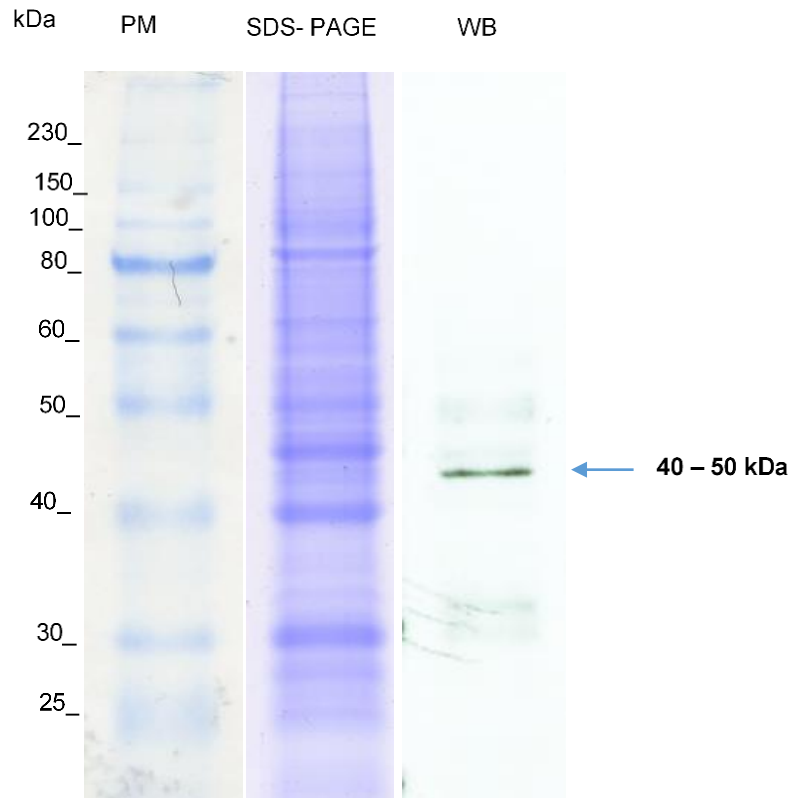


Figura 11. Expresión del R1 IFN- γ en extractos de células HEp-2. La flecha corresponde al peso molecular del R1IFN- γ . n=5.

Cuando se realizó la inmunodetección del receptor y su distribución en ausencia y en presencia de IFN- γ por medio de inmunofluorescencia (Figuras 12 y 13), se evaluaron tiempos durante los cuales ocurre la unión al receptor, la endocitosis y la activación celular de la cascada de señalización activada por IFN- γ . (Kerr & Stark, 1991), (Paludan, 1998). Esta cascada de señalización se denomina JAK-STAT1.

En células HEp-2 que no son tratadas con IFN- γ como se muestra en el control negativo (-), así como las células expuestas por 1 min al IFN- γ , la marca fluorescente que corresponde al R1IFN- γ , se presentó distribuida en la membrana celular (Figura 12, control negativo de 0 min y 1 min).

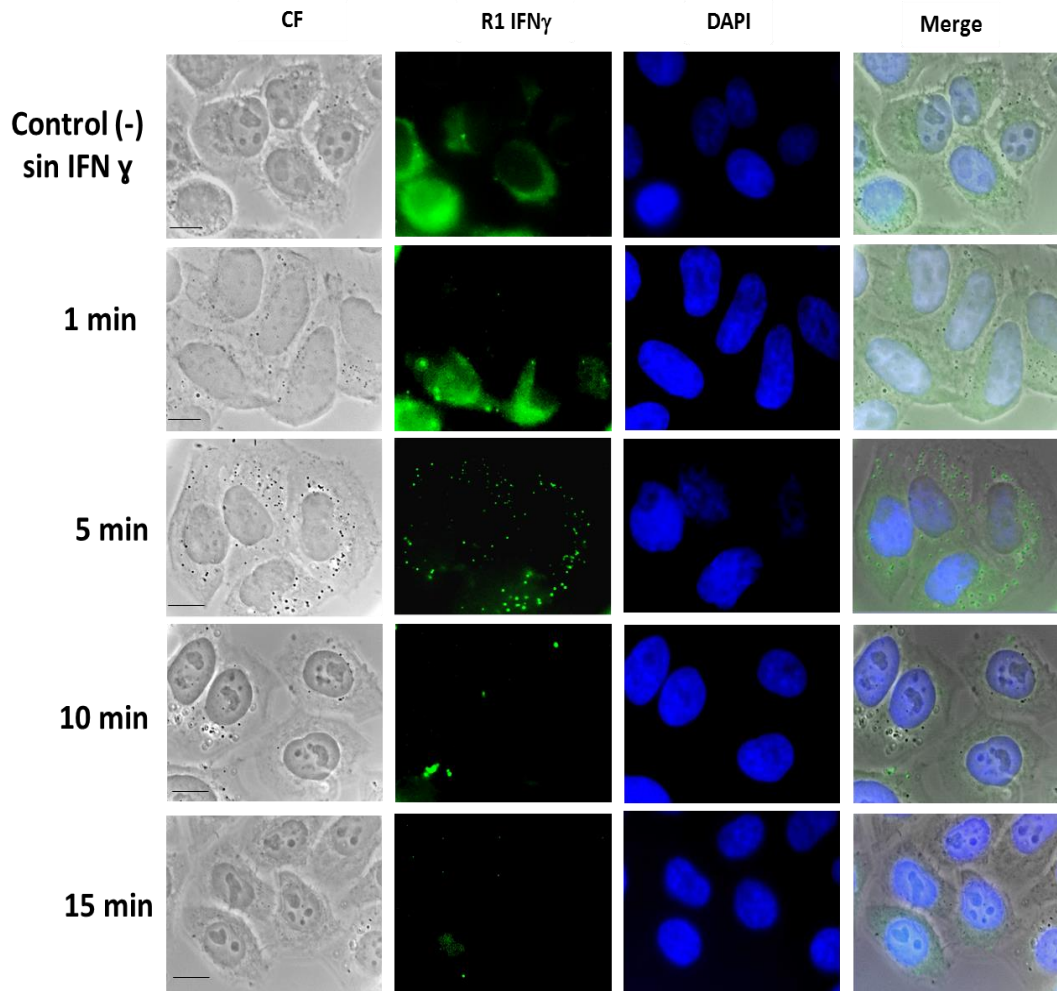


Figura 12. Expresión de R1IFN- γ en células HEp-2. Contraste Fase (CF), R1IFN- γ marcado con FITC. Núcleos marcados con DAPI. Merge indica la presentación de DAPI y lectina en la misma imagen. Escala = 10 μ m. n=5

En el microscopio convencional de fluorescencia, la marca en los primeros minutos de tratamiento con la citocina, (Figura 12), se observa en toda la periferia de la célula, debido a que estas fotografías, no son cortes ópticos registrados en confocal, como los obtenidos en la Figura 13.

Después de 5 min de exposición al IFN- γ la marca se observó confinada a vesículas de diferente tamaño y distribuidas por todo el citoplasma, aunque con mayor densidad por debajo de la membrana plasmática (Figura 12- 5 min), dicha vesiculización al interior de la célula después de los 5 minutos de exposición, fue analizada y confirmada en las micrografías de cortes ópticos en el microscopio confocal (Figura 13).

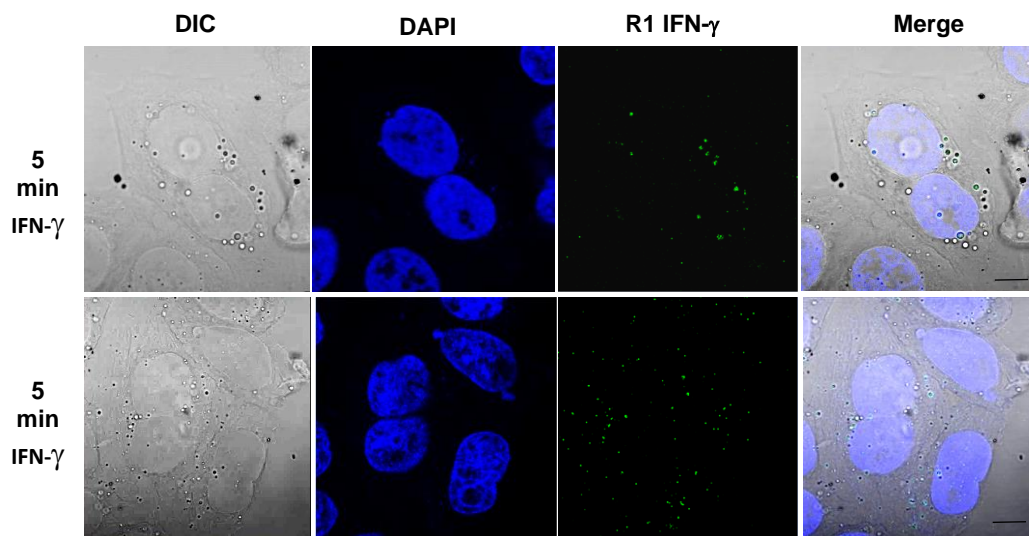


Figura 13. Expresión de R1IFN- γ en células HEp-2 por microscopía confocal. Se muestran dos campos de células HEp-2 que fueron expuestas a 200 U/ml de IFN- γ por 5 min, posteriormente se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia y se observaron en el microscopio confocal. Contraste de interferencia Diferencial (DIC), R1IFN- γ marcado con FITC. Núcleos marcados con DAPI. Merge indica la presentación de DAPI, R1IFN- γ sobre la imagen de contraste de fases. Escala = 10 μ m.

La presencia de vesículas citosólicas positivas al R1IFN- γ , indica que el proceso de endocitosis mediada por receptor al unirse a su ligando respectivo se ha llevado a cabo con éxito. Después de 10 y 15 min de exposición al IFN- γ , la marca fluorescente correspondiente al receptor disminuyó de forma evidente hasta desaparecer (Figura 12, 10 min y 15 min). Este signo, muy probablemente se relacione con la degradación del complejo ligando-receptor en proteosoma. Los cambios aparentes ocurridos en las células HEp-2 cuando se expusieron a 200 U/ml de IFN- γ , se registraron también por medio de videomicroscopia en modo time lapse. Como control negativo, se registró el comportamiento de las células HEp-2 perfundidas con MEM- SFB al 8%. En la Figura 14 se presentan las secuencias videomicrográficas de ambas preparaciones. En el control negativo no se detectaron movimientos celulares o del citoplasma evidente excepto el movimiento browniano característico (Figura 14 - A). En contraste, en las células expuestas a IFN- γ (Figura 14 - B) se presentaron gran número de vesículas pequeñas con un evidente movimiento citoplásmico. Estas vesículas muy probablemente, son el resultado de la endocitosis mediada por la unión del ligando-receptor e indican que, las células HEp-2 presentan un R1IFN- γ probablemente funcional que se activa al exponerse al ligando el IFN- γ , lo que se deduce de la evidente endocitosis registrada en el microscopio. Será necesario en el futuro determinar signos de señalamiento intracelular, como por ejemplo la activación de las JAK 1 y 2 (Schroder *et al.*, 2004). Por el momento y con base en los resultados de *Western blot*, inmunofluorescencia y time lapse, es evidente que las células HEp-2 representan un buen modelo para estudiar la inducción de la cistogénesis en células infectadas con la cepa RH de *T gondii*, mediante la exposición a IFN- γ , ya que cuentan con un receptor que es funcional y que responde a la exposición de IFN- γ humano recombinante.

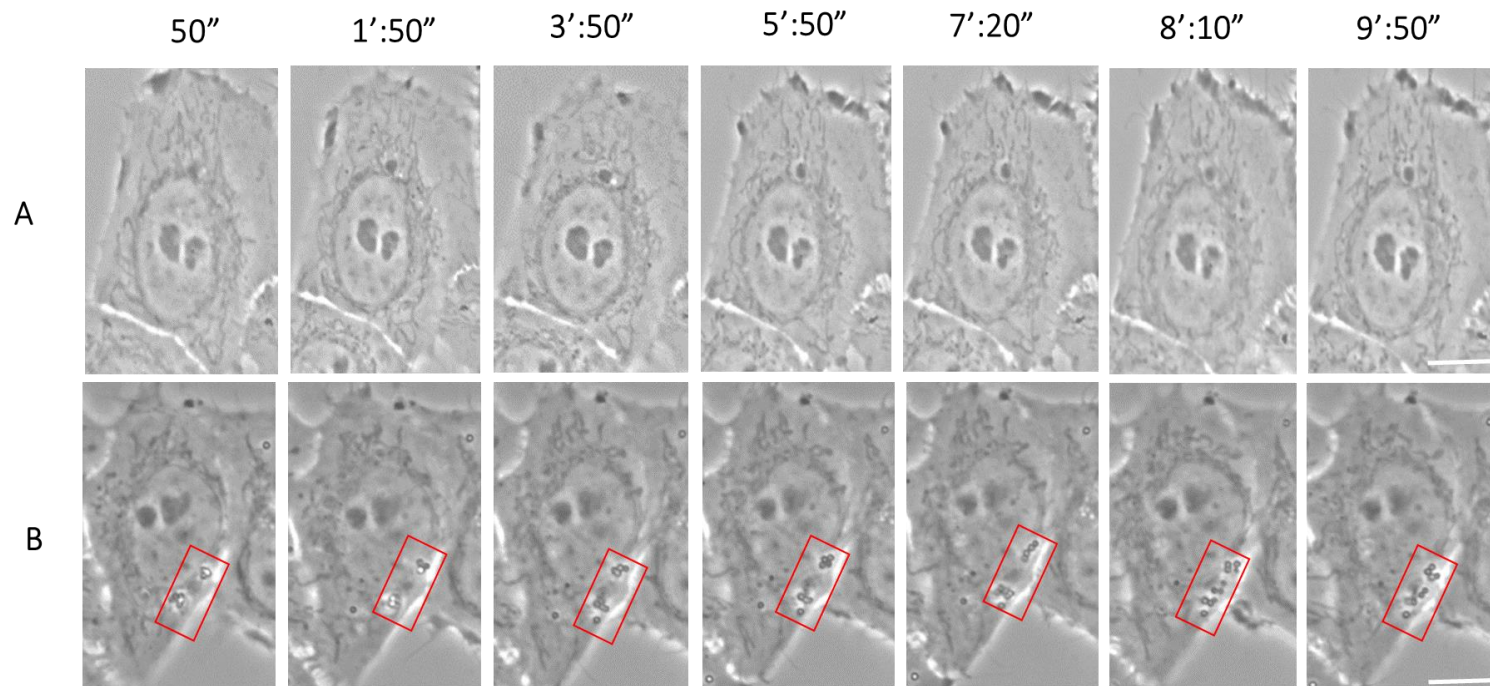


Figura 14. Expresión de R1 IFN- γ en células HEp-2. Imágenes en CF. Fotografías tomadas en 10 min- comprimidas en 30 seg. A, control negativo - células tratadas con MEM 8%. B, Células tratadas con 200 U/ml IFN- γ . Escala= 10 μ m. n=7

Inducción de la expresión de CST1 en células HEp-2 invadidas con la cepa RH de *T. gondii* y expuestas a IFN- γ

El tratamiento de células HEp-2 invadidas con la cepa patógena RH de *T. gondii* con IFN- γ , indujo modificaciones en la organización intravacuolar de los parásitos diferente a la organización intravacuolar que presentan los parásitos cuando proliferan como taquizoítos (Muñiz-Hernández S., González del Carmen M., & Mondragón, R.,2011). En las células control infectadas pero que no fueron expuestas al IFN- γ , se encontró la típica proliferación intravacuolar de los parásitos en forma de roseta o de racimo, hasta llenar el espacio intracelular a los tiempos de proliferación máximos evaluados de 72 h (Figura 15).

Cuando se evaluó la expresión de la glicoproteína CST1 mediante la lectina de *D. biflorus*-FITC, en estas células invadidas no tratadas con IFN- γ no se detectó marca fluorescente en ninguna de las células invadidas (Figura 15, CST1). De esta manera, se descartó una cistogénesis espontánea en nuestras condiciones experimentales normales.

Como control positivo se utilizó el AMF. Este fármaco ha sido utilizado en nuestro laboratorio para inducir la cistogénesis a partir de las 48 horas de tratamiento, los resultados obtenidos (no mostrados aquí) fueron similares a los mostrados en la Figura 5.

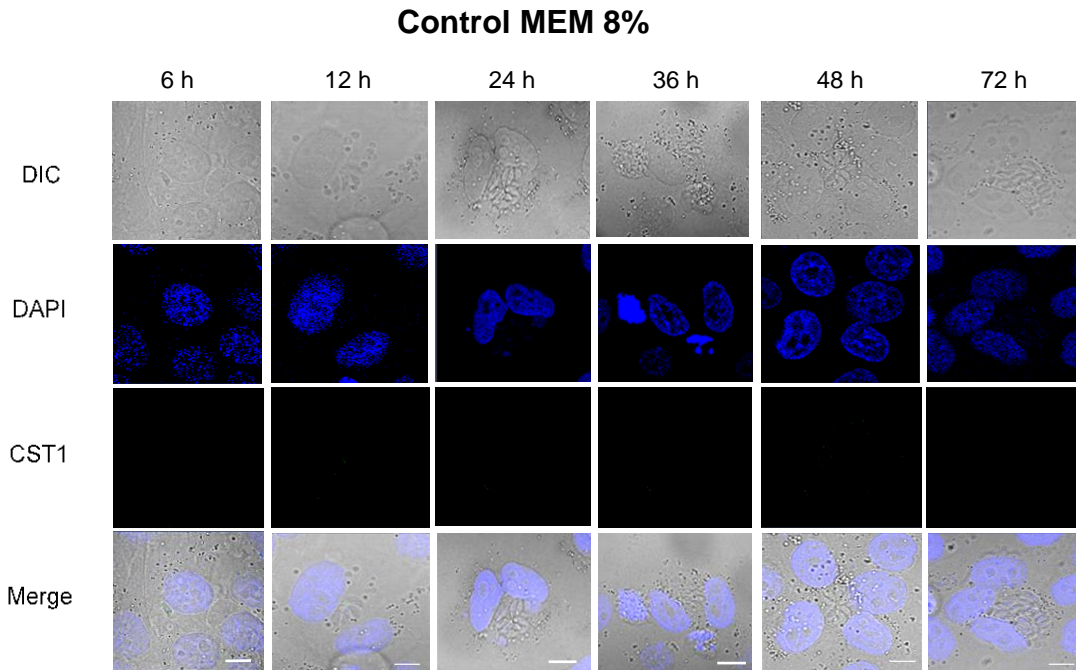


Figura 15. Expresión de CST1 en células control con MEM al 8%. Contraste Diferencial interferencial (DIC), CST1 marcado con Lectina *D. biflorus*-FITC, Núcleos marcados con DAPI. Merge indica la presentación de DAPI y lectina en la misma imagen. Escala = 10 μ m. n=5

Cuando los cultivos infectados fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de IFN- γ , se obtuvo una respuesta muy distinta a los controles.

En primer lugar, se detectó una disminución evidente en la proliferación intravacuolar de los parásitos y principalmente una modificación en la organización intravacuolar de los parásitos, de tal forma que ya no se detectan ni rosetas ni racimos, sino una desorganización de los parásitos y una pérdida de la cohesión inter-parasitaria, signo característico del inicio de la cistogénesis.

Adicionalmente, se encontró la aparición de una marca positiva a la glicoproteína CST1, cuya intensidad y frecuencia presente en las VP's se incrementó de acuerdo a la concentración y al tiempo de exposición a la citocina (Figuras 16-19).

La glicoproteína CST1, es una molécula característica de la pared del quiste tisular, de tal manera que su detección mediante el uso de la lectina de *D. biflorus* representó una excelente herramienta para dar seguimiento al desarrollo de la diferenciación de los taquizoítos y transformar la VP en una estructura prequística, que contiene en su membrana a la CST1. En todas las concentraciones de IFN- γ evaluadas, el patrón de detección de la marca fluorescente para CST1 fue similar, presentándose esta tinción a partir de las 12 h de proliferación y exposición a la citocina como una marca difusa y muy tenue en el espacio intravacuolar (Figura 16-19, 12 h).

A las 24 h la marca se presentó consistentemente en el cuerpo residual intravacuolar, el cual está ubicado en el centro de las rosetas o en un extremo del racimo. El cuerpo residual es una estructura que aparentemente corresponde a componentes segregados por los parásitos durante la proliferación, formando una estructura esférica a la cual se anclan los parásitos en proliferación, aunque su función es desconocida, muchos de los componentes que son secretados intravacuolarmente se detectan en esta estructura (Muñiz, González del C, & Mondragón, 2011).

La presencia de la CST1 podría obedecer a su secreción y posterior migración al cuerpo residual y de ahí tal vez a la membrana de la VP.

A partir de las 36 h, la marca de la fluorescencia se incrementó en comparación con tiempos anteriores. Esta marca ya se localizó asociada a la membrana de la VP, aunque con una distribución discontinua.

Se encontró además un desarreglo intravacuolar con proliferación sincrónica del parásito. A las 48 horas la expresión de la glicoproteína CST1 se evidenció principalmente asociado a la membrana de la VP y en forma más continúa y regular sobre la membrana de la VP.

Desde el inicio de la exposición a la citocina hasta este tiempo, la mayoría de las VP's decoradas con la marca fluorescente tenía una morfología irregular. A partir de las 72 horas de tratamiento y con todas las concentraciones probadas de IFN- γ se observaron estructuras esferoidales con marca fluorescente de CST1 confinada a la periferia de la VP. Al interior de estas VP's los parásitos presentaron arreglos desordenados con poca proliferación.

Es evidente que a la máxima concentración evaluada de IFN- γ (1000U/ml) y el máximo tiempo de exposición evaluada (72 h) no se afectó la viabilidad ni la integridad morfológica de las células HEp-2 infectadas y no infectadas como se puede observar en las micrografías respectivas de contraste de fases de las Figuras 16-19.

Este curso temporal de expresión de la CST1 se repitió en experimentos independientes por al menos 5 veces. Estos cambios, tanto en la expresión de CST1 como, en el arreglo del parásito dentro de la VP representan las primeras descripciones acerca del proceso de cistogénesis aún no reportadas.

100 U/mL de IFN- γ

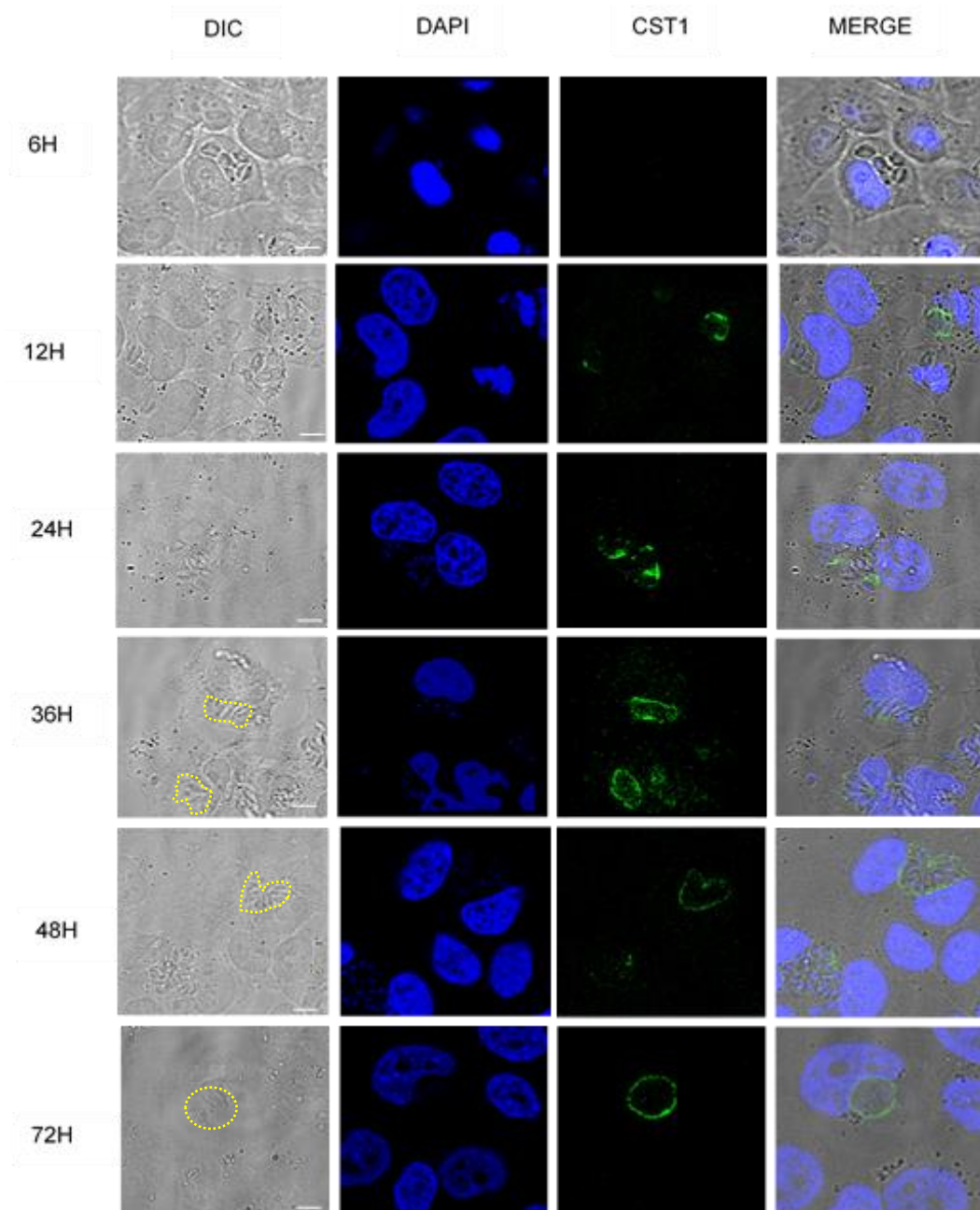


Figura 16. Expresión de CST1 en células expuestas a 100 U/mL de IFN- γ . Contraste diferencial interferencial (DIC), CST1, marcaje con la lectina *D. biflorus*-FITC, DAPI, núcleos. Merge indica la presentación de la fluorescencia de DAPI y de la lectina en la misma imagen. Escala= 5 μ m. n=5.

200 U/mL de IFN- γ

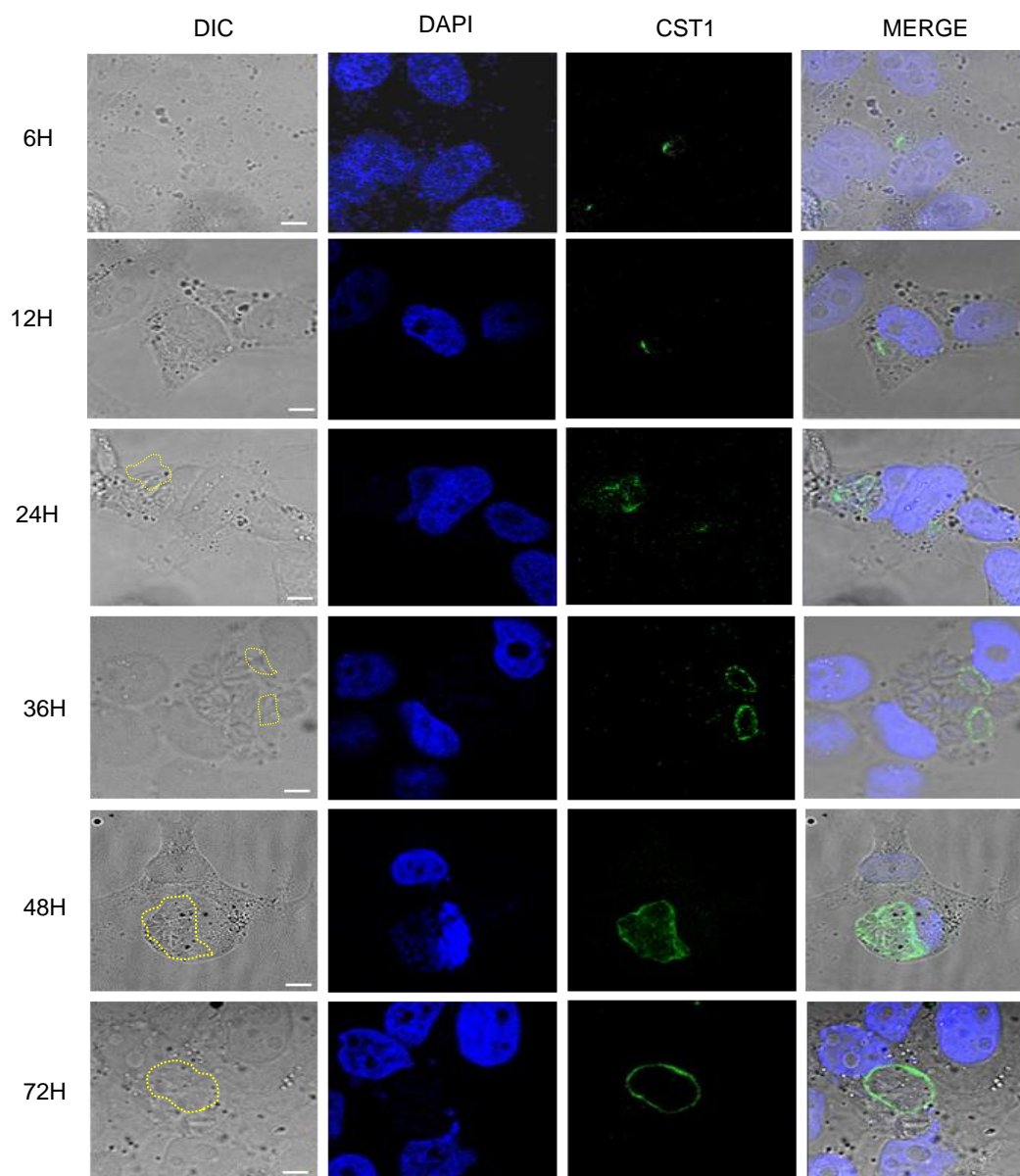


Figura 17. Expresión de CST1 en células expuestas a 200 U/mL de IFN- γ . Contraste diferencial interferencial (DIC), CST1, marcaje con la lectina *D. biflorus*-FITC, DAPI, núcleos. Merge indica la presentación de la fluorescencia de DAPI y de la lectina en la misma imagen. Escala= 5 μ m. n=5.

500 U/mL de IFN- γ .

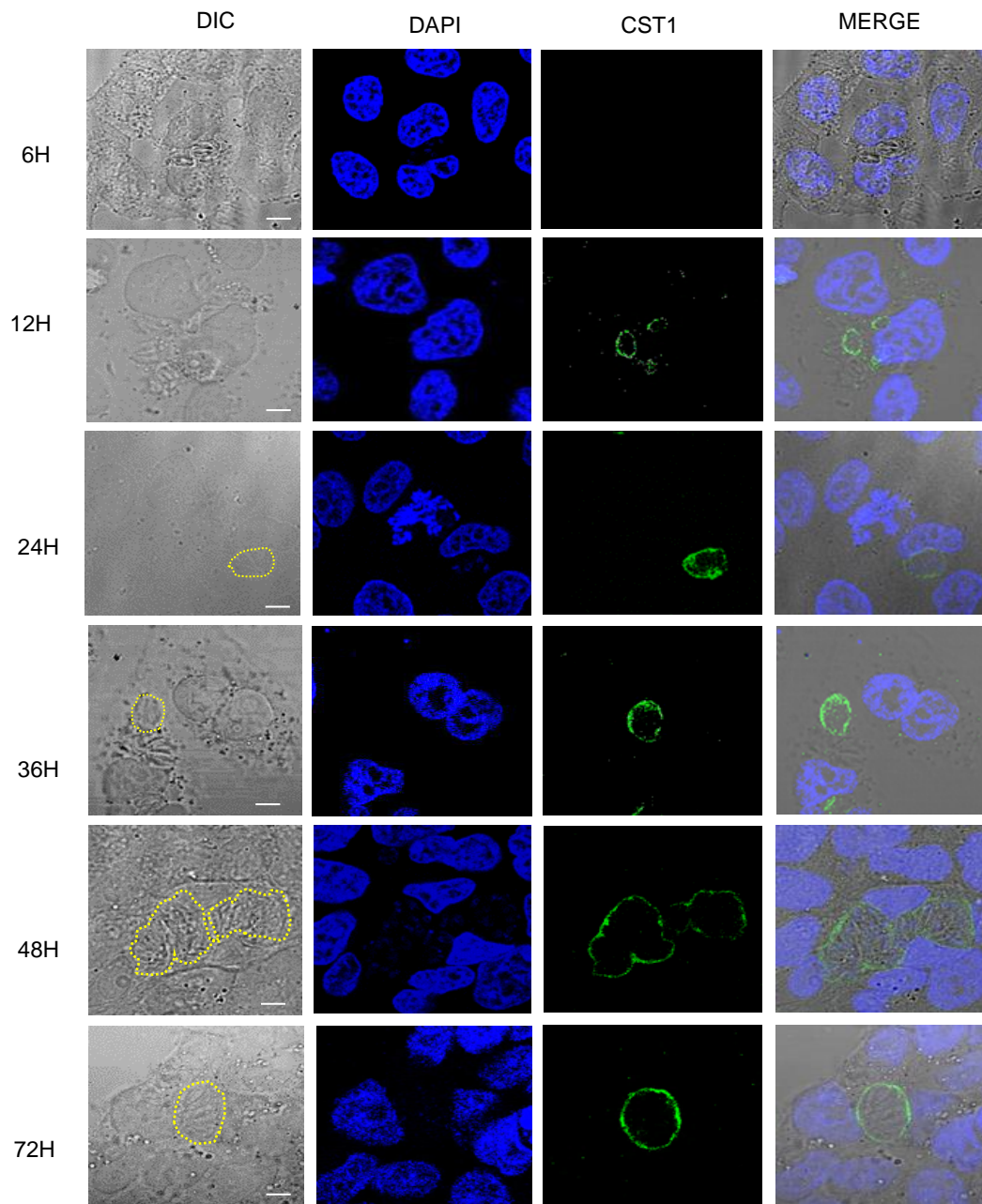


Figura 18. Expresión de CST1 en células expuestas a 500 U/mL de IFN- γ . Contraste diferencial interferencial (DIC), CST1, marcaje con la lectina *D. biflorus*-FITC, DAPI, núcleos. Merge indica la presentación de la fluorescencia de DAPI y de la lectina en la misma imagen. Escala= 5 μ m. n=5.

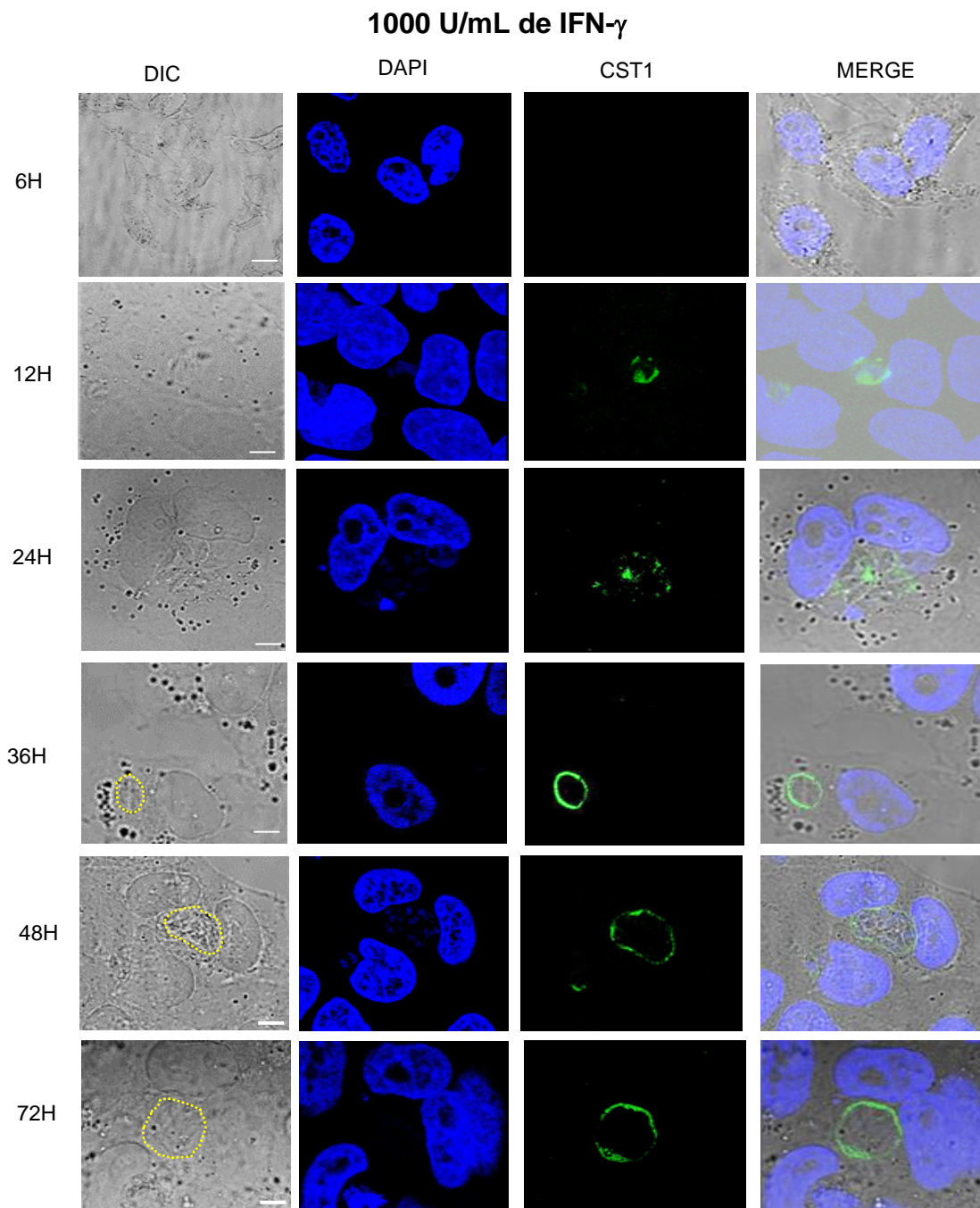


Figura 19. Expresión de CST1 en células expuestas a 1000 U/mL de IFN- γ . Contraste diferencial interferencial (DIC), CST1, marcaje con la lectina *D. biflorus*-FITC, DAPI, núcleos. Merge indica la presentación de la fluorescencia de DAPI y de la lectina en la misma imagen. Escala= 5 μ m. n=5

Se realizaron cortes ópticos de las células tratadas con IFN- γ a las 48 h y las fotografías se tomaron a baja amplificación, con el objetivo de 40x. En la Figura 20 se muestra que la inducción de la cystogénesis no es un evento aislado y que se presenta en varias células de un mismo campo óptico.

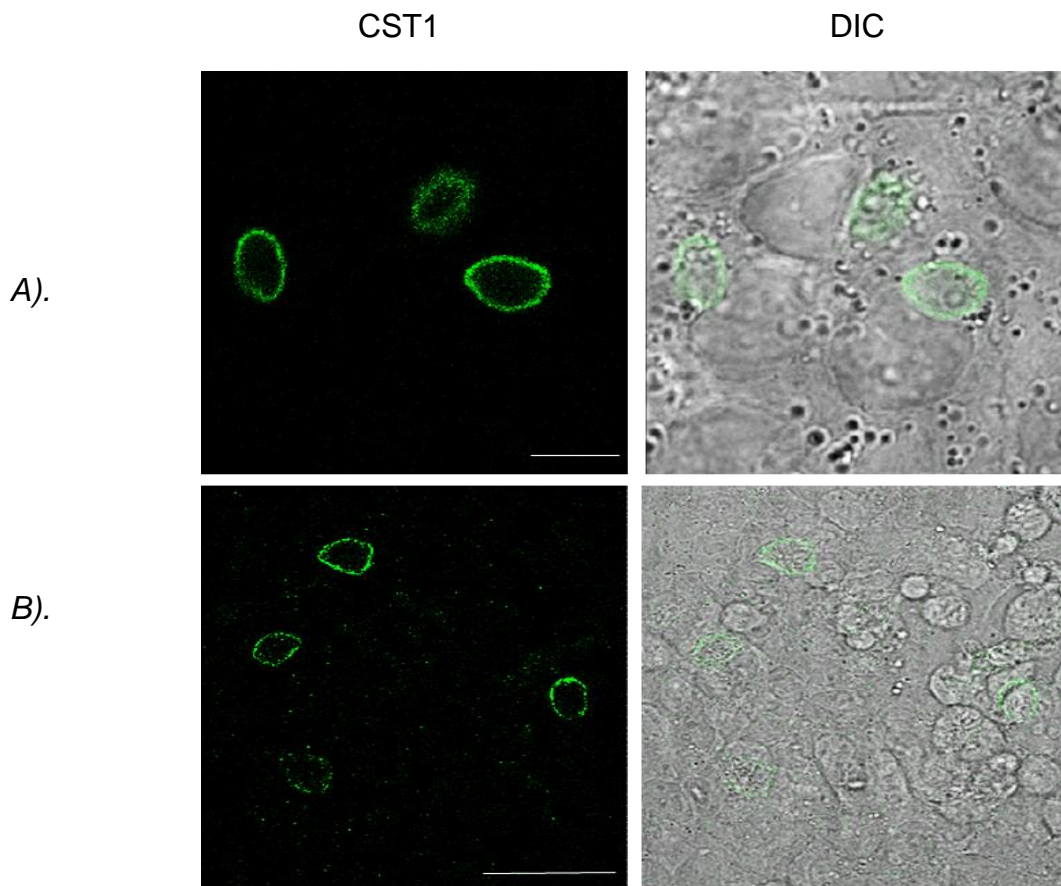


Figura 20. Micrografías de baja amplificación de la expresión de CST1 marcada con lectina de *D. biflorus*. Las células HEP-2 invadidas por cepa RH y tratadas con de IFN- γ a 200 U/mL por 48 h se tiñeron con lectina. DIC, contraste de interferencia diferencial. A) Escala = 15 μ m. B) Escala= 50 μ m. n=5.

Cuantificación de la cistogénesis en células HEP-2 invadidas con cepa RH de *T. gondii*

Con el fin de determinar la magnitud de la expresión de la CST1 en las células invadidas expuestas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, se cuantificó el número de VP's fluorescentes positivas a CST1 para cada una de las concentraciones en los diferentes tiempos estudiados.

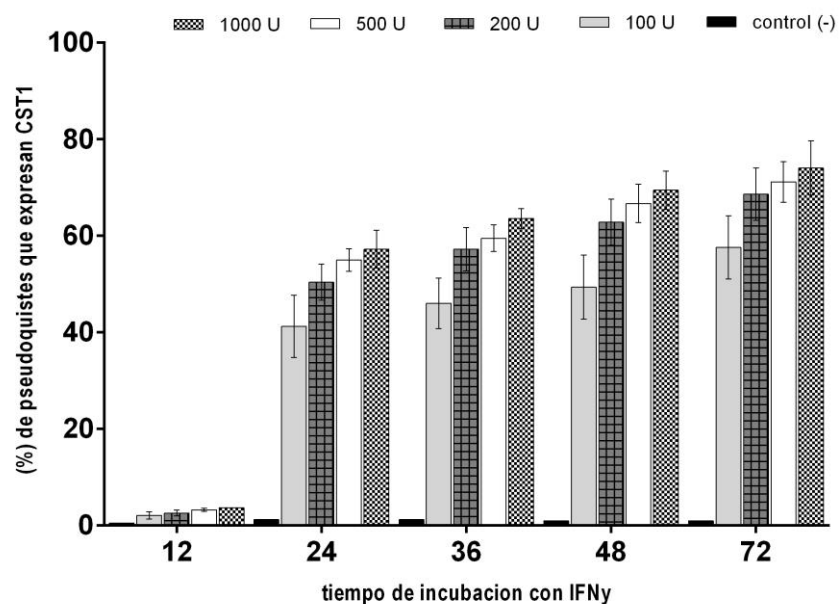


Figura 21. Cuantificación de VP's positivas a CST1 después del tratamiento con IFN- γ . Se infectaron células HEP-2 con taquizoítos de la cepa RH y se trataron con 100, 200, 500 y 1000 U/mL de IFN- γ incubados durante 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h y teñidos con lectina de *D. biflorus*. Se cuantificó arriba de 300 VP's por ensayo, determinando aquellas que mostraban fluorescencia evidente ya sea en su interior o asociada a la membrana vacuolar. *** $p = < 0.0001$ vs. control negativo de cada tiempo de incubación. Cada condición fue evaluada en cinco experimentos independientes y el análisis estadístico se obtuvo mediante la prueba estadística de ANOVA en una vía. $n=5$.

Los resultados se compararon mediante el método estadístico de ANOVA en una vía. Como se muestra en la Figura 21 los resultados muestran una diferencia significativa entre todas las concentraciones probadas y el control negativo (células sin tratamiento de IFN- γ y únicamente tratadas con MEM 8%) con una $p = < 0.0001$.

En una segunda aproximación estadística, se realizó la comparación de la frecuencia de células positivas a CST1 con respecto a la obtenida a la mínima concentración utilizada de IFN- γ de 100 U/mL. Los resultados mostraron diferencias significativas entre 100 U/ mL y las demás concentraciones. Lo cual indica que el efecto máximo de cistogénesis mediado por IFN- γ solo fue alcanzado a partir de la concentración de 200 U/mL (Figuras 22 - 23).

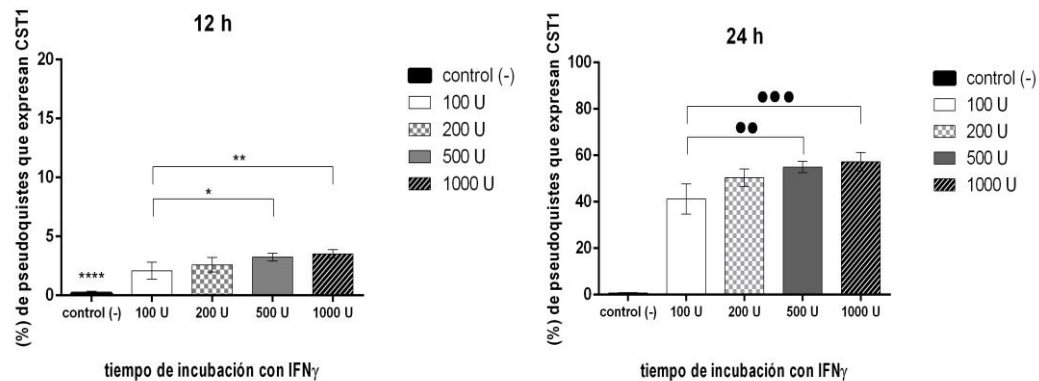


Figura 22. Efecto de IFN- γ en la inducción de la cistogénesis mediante exposición a IFN- γ por 12 y 24 h. El análisis estadístico se hizo por el método de ANOVA en una vía $**p = < 0.006$ y $*p = < 0.0286$. $*** p = < 0.0003$ $** p = < 0.0014$, con respecto a la concentración de 100 U/mL. $n=5$.

A las 12h de incubación con IFN- γ la concentración de 100 U/mL presentó diferencia significativa con respecto a 1000 U/mL $**p = < 0.006$ y a 500 U/mL $*p = < 0.0286$ como se muestra en la Figura 22. A las 24 h, la diferencia fue significativa con respecto a 1000 U/mL $***p = < 0.0003$ y a 500 U/mL $**p = < 0.0014$. Por otra parte, en estos mismos tiempos de incubación la concentración de 200 U/mL no presentó diferencia significativa con respecto a los tratamientos con mayor concentración de interferón IFN- γ (500 y 1000 U/mL), observándose un comportamiento similar en la inducción de la cigotogénesis mediada por IFN- γ (Figura 22).

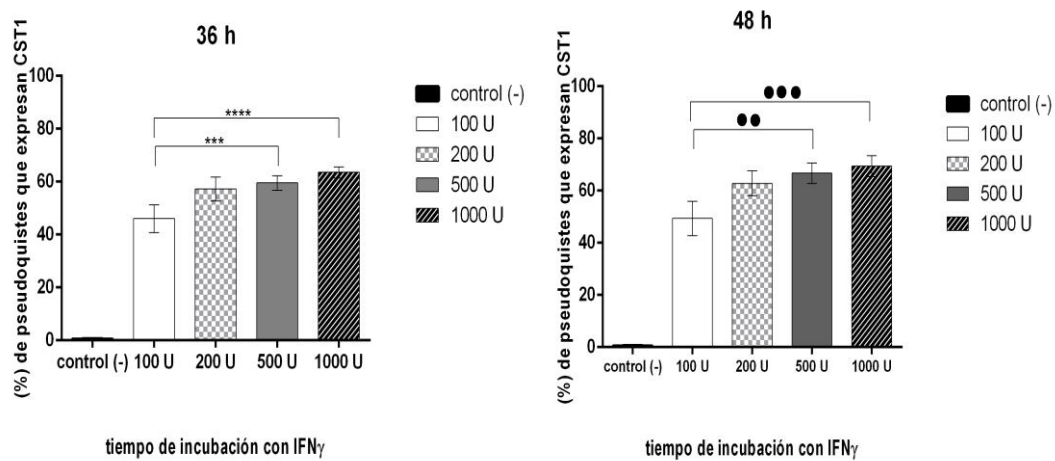


Figura 23. Efecto de IFN- γ en la inducción de la cigotogénesis mediante exposición a IFN- γ por 36 y 48 h. El análisis estadístico se hizo por el método de ANOVA en una vía. $**** p = < 0.0001$ $***p = 0.0005$ $•• p = 0.0050$ $••• p = 0.0001$ con respecto a la concentración de 100 U/mL.

A las 36 y 48 h de incubación con IFN- γ la concentración de 100 U/mL presentó diferencia significativa con respecto a 500 y 1000 U/mL como se muestra en la Figura 23.

También a las 72 h se presentó una diferencia significativa con respecto a 500 y 1000 U/mL (Figura 24). Por otra parte, en estos mismos tiempos de incubación la concentración de 200 U/mL (2.63×10^{-10} M) no presentó diferencia significativa con respecto a los tratamientos con mayor concentración de interferón IFN- γ (500 y 1000 U/mL), observándose un comportamiento similar en la inducción de la cistogénesis mediada por IFN- γ (Figura 21-24).

Lo que estos resultados indican, es que a partir de 200 U/mL, se logra la actividad máxima de los parásitos para inducir su diferenciación y un exceso de esta citocina, no incrementa o acelera el proceso de diferenciación. Esto podría estar relacionado a la existencia de un número definido de receptores R1IFN- γ para los cuales, probablemente se alcanzaría la saturación con la concentración usada de 200 U/mL.

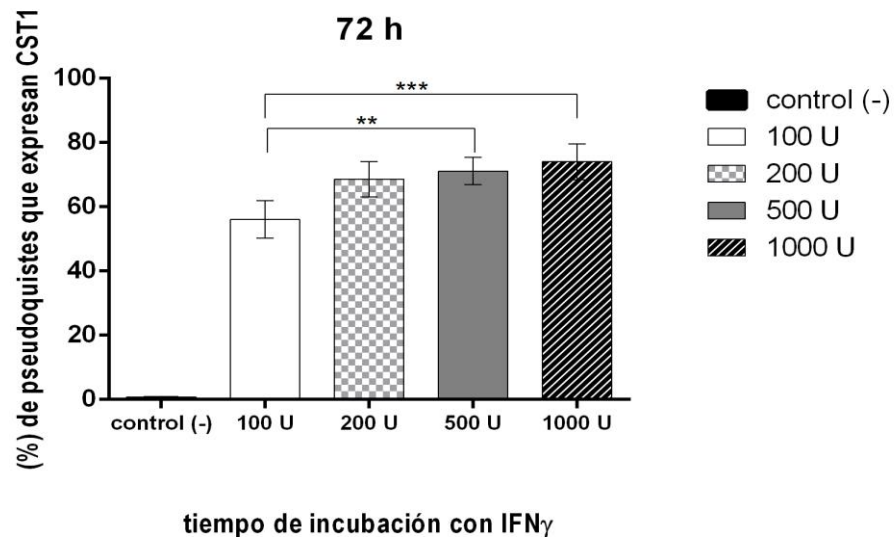


Figura 24. Efecto de IFN- γ en la inducción de la cistogénesis mediante exposición a IFN- γ por 72 h. El análisis estadístico se hizo por el método de ANOVA en una vía. $**p = < 0,0022$ y $*p = < 0,0433$ con respecto a la concentración de 100 U/mL.

Con base en los anteriores resultados, se decidió conocer el comportamiento de las células infectadas al adicionar concentraciones menores a las 200U/mL de IFN- γ . Para ello, se probaron concentraciones de 10 y 50 U/mL en los diferentes tiempos de incubación ya descritos. Este ensayo se realizó por triplicado obteniendo los siguientes resultados (Figura 25).

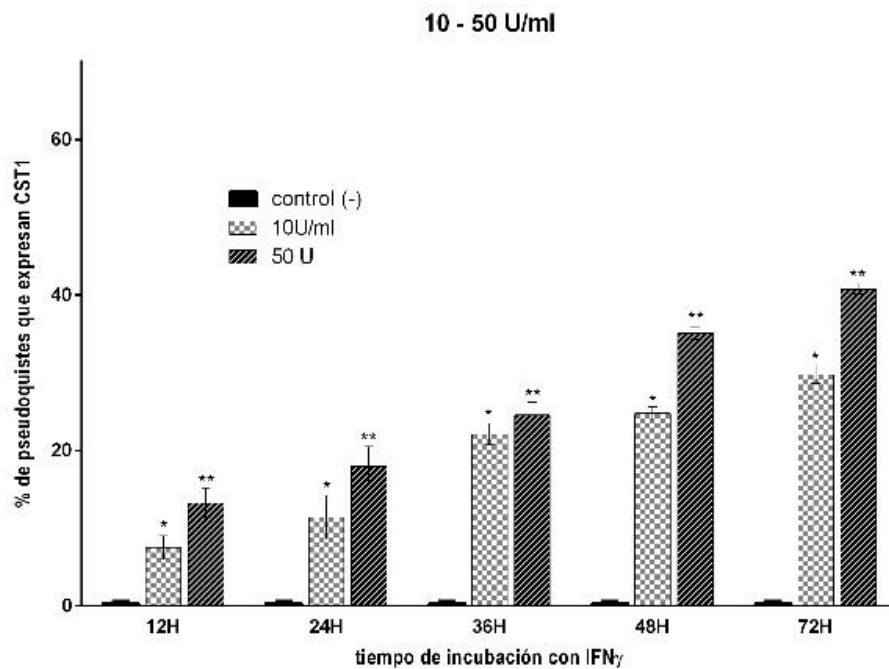


Figura 25. Evaluación del efecto de IFN- γ 10 y 50 U/mL en la inducción de la cistogénesis. El análisis estadístico se hizo por el método de ANOVA en una vía $**p = < 0,0012$ y $*p = < 0,0119$ vs. el control negativo de cada tiempo de incubación.

El análisis estadístico obtenido, mediante el uso del programa GraphPad Prism 6, mostró que ambas concentraciones presentan diferencias significativas respecto al control negativo (-) de cada tiempo de incubación. Lo cual indica que efectivamente, desde concentraciones bajas de la citocina se induce el enquistamiento de esta cepa.

Sin embargo, el número de vacuolas marcadas y que expresan la glicoproteína CST1 no se asemeja, ni alcanza la cantidad de vacuolas que expresan esta proteína mediante el tratamiento con concentraciones mayores a 200 U/mL (2.63×10^{-10} M) de IFN- γ , por el contrario el porcentaje de vacuolas que expresan CST1 es muy inferior a las reportadas por concentraciones mayores.

Esto sugiere que, a estas dos concentraciones no se ha alcanzado la saturación de los receptores y aún y cuando se logra la cistogénesis, la frecuencia en toda la población de células infectadas es menor que lo que se logra con 200U/mL. Este resultado, le daría más fuerza a 200U/mL como la concentración en la que, se ha alcanzado la activación de todos los receptores de la citocina.

Con base en los resultados previamente descritos, se decidió considerar la concentración de 200 U/mL de IFN- γ y el tiempo de incubación de 72 h como la condición estándar para inducir de forma óptima la cistogénesis. Es pertinente mencionar que la concentración de IFN- γ de 200 U/mL es muy cercana concentraciones en las cuales, se ha visto respuesta inmune a nivel fisiológico (250 U/mL) (Bocci, 1988; Nathan *et al.*, 1983), y sobrepasa la constante de afinidad para el receptor (1×10^{-9} M- 1×10^{-10} M) reportada previamente en células epiteliales (Van-Loon *et al.*, 1991).

Esto es consistente con la evidencia presente en trabajos previos (Nathan *et al.*, 1983) donde 200 U/mL, ha sido descrita como la concentración óptima para limitar la replicación del parásito de *T. gondii* hasta en un 42% en macrófagos de humano y en monocitos de humano.

Evaluación del efecto de IFN- γ en la inducción de la cistógnesis de la cepa RH de *T. gondii* en células HEp-2 mediante Western blot

Se hizo un análisis semi-cuantitativo de la expresión de CST1 durante el proceso de cistogénesis inducida por IFN- γ , mediante Western blot y análisis densitométrico. El análisis por densitometría se realizó empleando el programa Image J (Softonic®) obteniendo un área bajo la curva de la intensidad de las bandas. Se realizó la relación de las áreas obtenidas con vimentina (proteína de filamentos intermedios) como control de carga y con cada banda de expresión de la glicoproteína CST1 para poder obtener una gráfica representativa de la expresión de esta proteína conforme se incrementaba el tiempo de tratamiento con IFN- γ (Figura 26).

La detección de la glicoproteína CST1 por Western blot, confirmó los resultados descritos por fluorescencia. El análisis por densitometría de las bandas, hecho en el programa Image J, mostró en todos los tiempos de exposición a la citocina, un incremento gradual en la expresión de la glicoproteína CST1. Se detectó que el incremento en la expresión de CST1 a diferentes tiempos, con respecto a lo registrado a las 6 h de tratamiento, fue para 24 y 36 h, un aumento de 4 y 6 veces, con una $*p= 0.0367$ y 0.0156 respectivamente. En los tiempos de 48 y 72 h, se observó mayor expresión de CST1, con un incremento de 8 y 12 veces, con respecto a lo registrado a las 6 h, presentando una $**p= 0.0099$ y 0.0035 respectivamente. El análisis estadístico se obtuvo mediante el uso del programa GraphPad Prism 6.

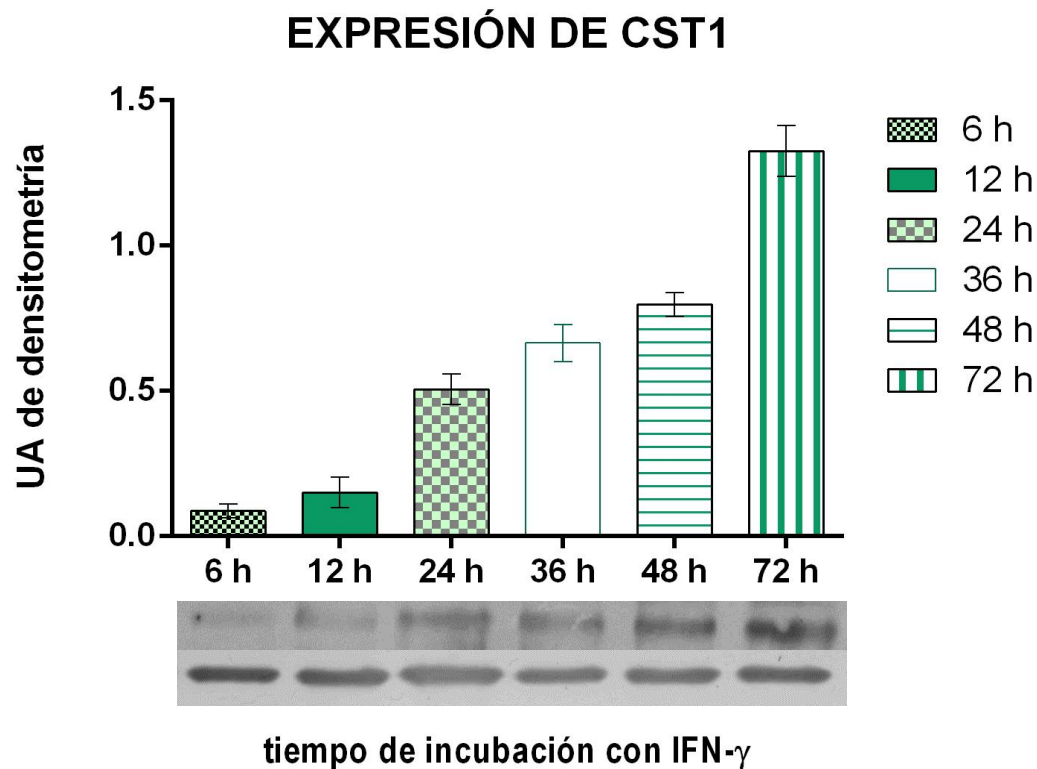


Figura 26. Expresión temporal de CST1 en cultivo celular infectado con taquizoítos de la cepa RH y tratados con 200 U/mL de IFN- γ . Se empleó como control de carga vimentina, la cual se reveló en la misma membrana que se empleó para detectar la expresión de CST1. La gráfica muestra la relación entre la expresión de CST1 y vimentina calculada a partir de *Western blots* como los presentados en la parte inferior. UA: unidades arbitrarias n=3. Imagen procesada en Image J y analizadas estadísticamente por ANOVA en una vía, con prueba estadística de Tukey.

Expresión de BAG-1 durante la cistogénesis inducida por IFN- γ .

Con base en los resultados obtenidos, se decidió determinar si el tratamiento con IFN- γ también inducía la diferenciación de los taquizoítos en bradizoítos que es la forma del parásito que se aloja dentro de los quistes tisulares.

Para ello se detectó la expresión de la proteína BAG1, una proteína heat shock citosólica de aproximadamente 25 kDa que se expresa específicamente en el estadio de bradizoíto del parásito, en las condiciones de inducción de la cistogénesis con 200 U/mL, (2.63×10^{-10} M) de IFN- γ y utilizando un anticuerpo específico contra BAG1 generado y validado previamente en nuestro laboratorio, mediante la inmunización de un péptido sintético específico. Se evaluaron tiempos desde las 6 h hasta las 72 h y se analizó en el microscopía confocal en co-tinción con CST1, a fin de determinar que ambas marcas correspondieran a la misma VP en transformación.

Los resultados mostraron que, tanto la expresión de BAG1 como de CST1 se presentaron de manera detectable a partir de las 12 h con una distribución intravacuolar para CST1 y en el citosol de los parásitos para BAG1 (Figura 27). No todas las VP fueron positivas a ambas marcas (flecha blanca en Figura 22 – 12 horas), y varias de las VP positivas mostraban diferentes grados de intensidad y distribución de las marcas lo cual indicaba diferentes estados de maduración de los pre-quistes en formación (flecha blanca en Figura 27- 24 horas). A partir de las 36 h de tratamiento con IFN- γ todas las VP's tenían morfología ovoide con una intensa marca para CST1 y una evidente presencia de la marca roja correspondiente a BAG1 confinada al citoplasma de los parásitos (flecha blanca en Figura 27 - 36 h). En todos los tiempos evaluados la marca de BAG1 fue citosólica en los parásitos. El marcaje para ambas molécula fue muy intenso a las 48 y 72 h (Figura 27).

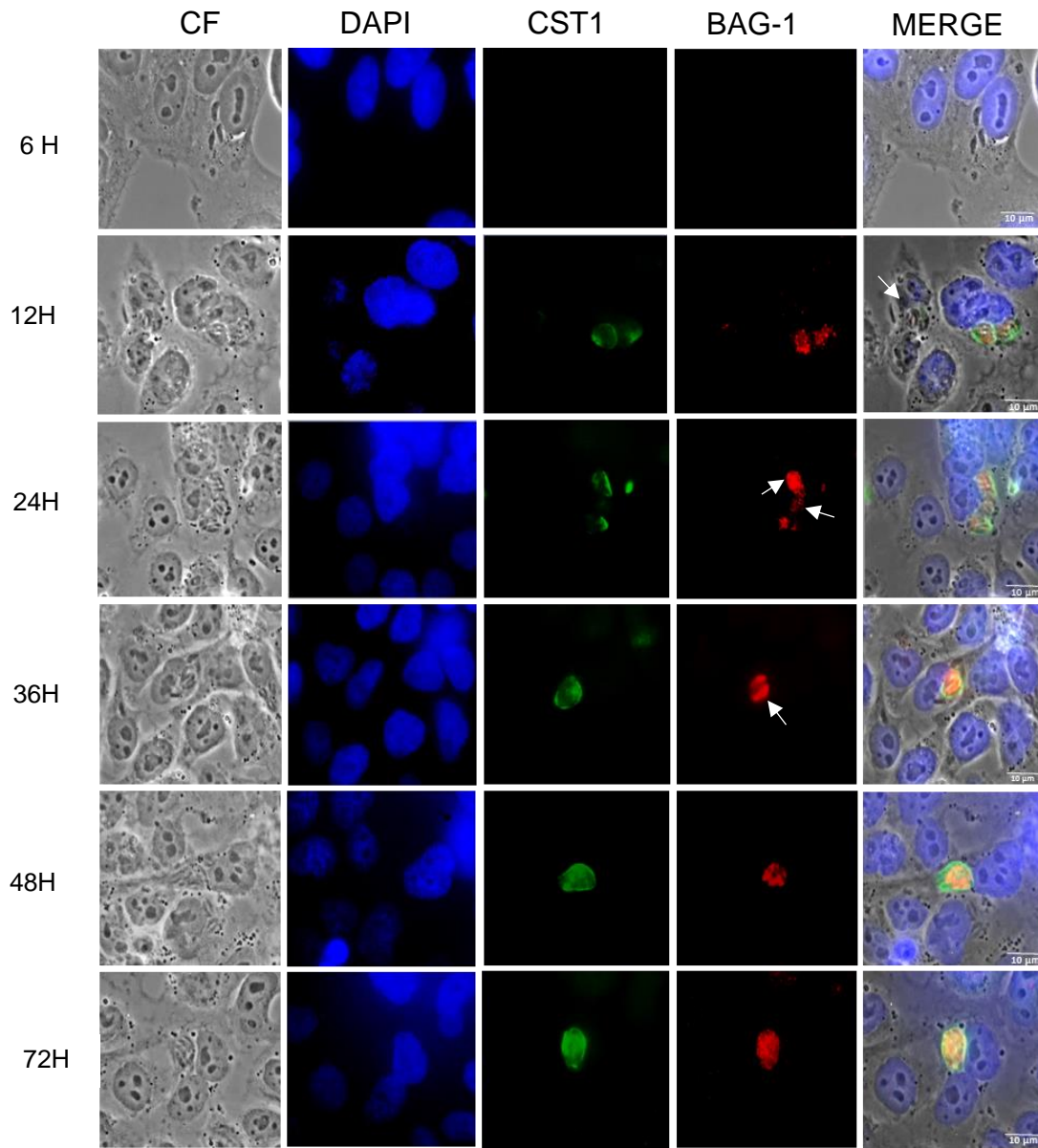


Figura 27. Co-expresión de CST1 y BAG1 durante el curso temporal de la cigotogénesis inducida por exposición a IFN- γ . Las células invadidas fueron expuestas a 200 U/mL de IFN- γ por 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h. Contraste de fase, CST1 marcado con lectina *D. biflorus*-FITC, BAG1-TRITC, Núcleos marcados con DAPI. Flecha blanca: proteína BAG en citoplasma de bradizoítos. Escala = 10 μ m. n=3

Estos resultados demuestran que, la exposición al IFN- γ indujo la biosíntesis tanto de la glicoproteína CST1 de pared quística con ubicación en la membrana de la VP, como de la proteína citosólica BAG1 propia de bradizoítos. Ambas características son evidencia de un proceso de diferenciación en estructuras quísticas, adicionalmente, se confirma que esta citocina activa mecanismos en el parásito que lo obligan a diferenciarse.

Una amplificación del marcaje a las 72 se observa en la Figura 28. El corte óptico muestra claramente la distribución citosólica de BAG1 en los parásitos intraquísticos, mientras CST1 estuvo confinada en la periferia del quiste en formación.

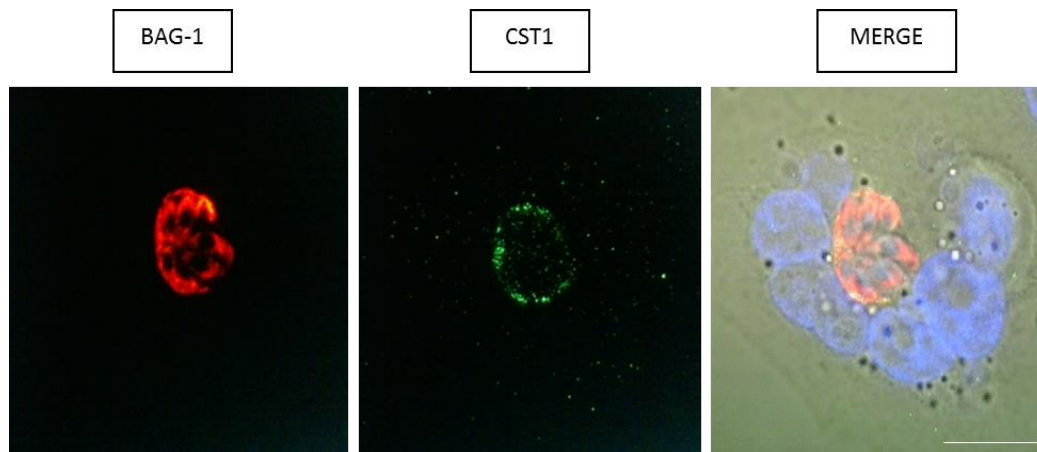


Figura 28. Co-marcaje de BAG-1 y CST1 después de 72 h de inducción de la cistogénesis con 200 U/mL de IFN- γ . Micrografiado en un microscopio confocal. FIT-C, CST1; TRITC, BAG1; núcleos marcados con DAPI. Escala = 15 μ m. n=3

Un aspecto interesante fue el observar, que todas las VP's positivas a CST1 y que tenían parásitos que expresaban BAG-1, presentaron una proliferación asincrónica, es decir con 3, 5, 7, etc., parásitos intravacuolares.

El número de parásitos no correspondió a una proliferación por endodiogenia, característico de los taquizoítos (de 2, 4, 8, 16, 32 etc. Cantidad de parásitos intravacuolares) y tampoco presentan la organización intravacuolar típica de roseta o racimo (Figura 29). La proliferación asincrónica se ha reportado como uno de los signos de el enquistamiento para cepas del tipo II y III (*Dzierszinski et al., 2004*).

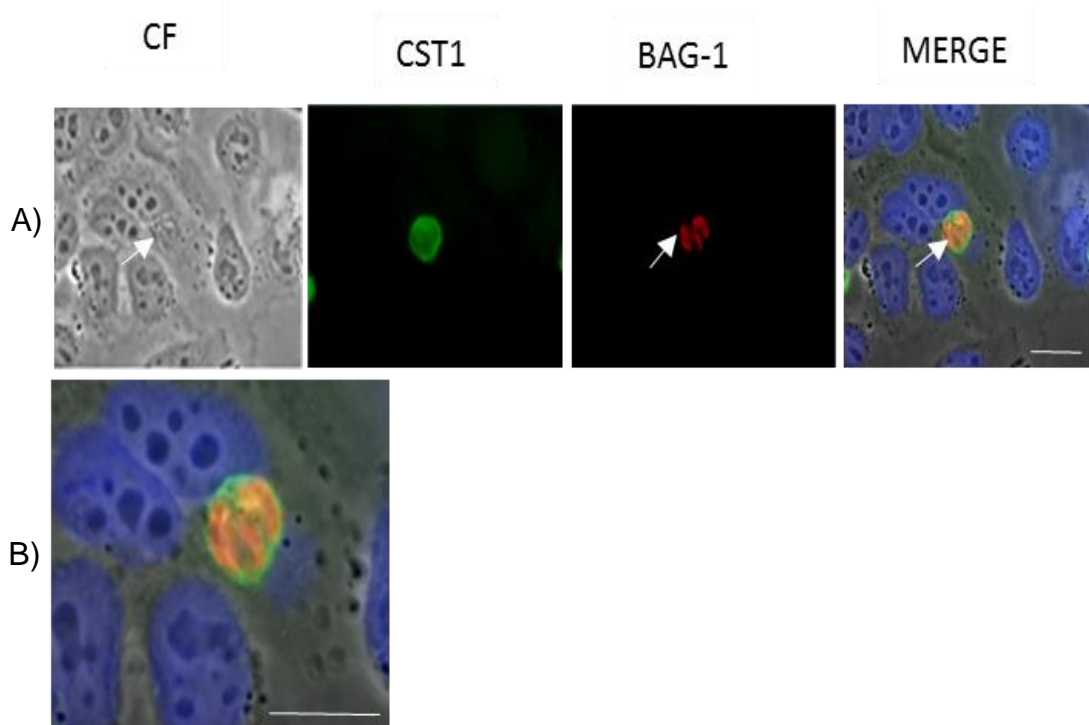


Figura 29. Proliferación asincrónica de los parásitos en proceso de diferenciación a quiste inducidos por exposición a IFN- γ . A). La flecha muestra una VP positiva a CST1 con parásitos positivos a BAG-1, B). Nótese la presencia de solo 3 parásitos dentro de la VP en amplificación del Merge. Escala = 10 μ m. n=3.

Cambios en la expresión de SAG1 en la cistogénesis inducida por IFN- γ .

Con el fin de evaluar la conversión del taquizoíto se decidió evaluar los cambios en la expresión de la proteína de taquizoítos SAG1, con respecto a la expresión de la glicoproteína CST1 de pared quística conforme evolucionaba la diferenciación a quiste tisular. Se observó a las 6 h del tratamiento, que la persistencia de marca de SAG1 específica de taquizoítos mientras que CST1 aún no era evidente, por lo que se puede sugerir que a este tiempo o aún no se está llevando a cabo el proceso de diferenciación de taquizoítos a bradizoítos o la cantidad de CST1 está por debajo de la sensibilidad del microscopio de fluorescencia (Figura 30).

A partir las 12 h se empezó a observar una marca tenue de CST1 en el espacio intravacuolar (flecha blanca en Figura 30 - 12 h CST1), coincidiendo con los resultados de fluorescencia antes mostrados en las Figuras 16-19, interesantemente, la marca de SAG1 se observó de forma discontinua en la membrana (flecha blanca en Figura 30 - 12 h SAG1). Esto parece indicar que los componentes que conforman la pared quística empiezan a expresarse cuando los parásitos, aún conservan la capacidad para expresar a SAG1, la principal proteína de superficie de taquizoítos. En la serie de las 24 h, hay tres VP's, de las cuales la única que es positiva a CST1 presenta a SAG1 por toda la VP y ya no está confinada a la membrana del parásito, las otras dos VP's que son negativas a CST1 expresaron SAG1 en la membrana de los taquizoítos (flechas blancas en Figura 30 – 24 h Merge). A las 36 h y 48 h, la expresión de SAG1 solo se observó en el citoplasma de uno, entre los varios parásitos ubicados en la misma VP y que fueron negativos para SAG1. (flechas blancas en 36 y 48 h). Esto sugiere que aquellos parásitos negativos a SAG1 podrían corresponder a bradizoítos. Finalmente a las 72h, la VP es una esfera positiva a CST1 y con parásitos completamente negativos a SAG1.

Por lo tanto en tan solo 72 h se han generado estructuras positivas a CST1 con una conformación esférica y sin la expresión de SAG1.

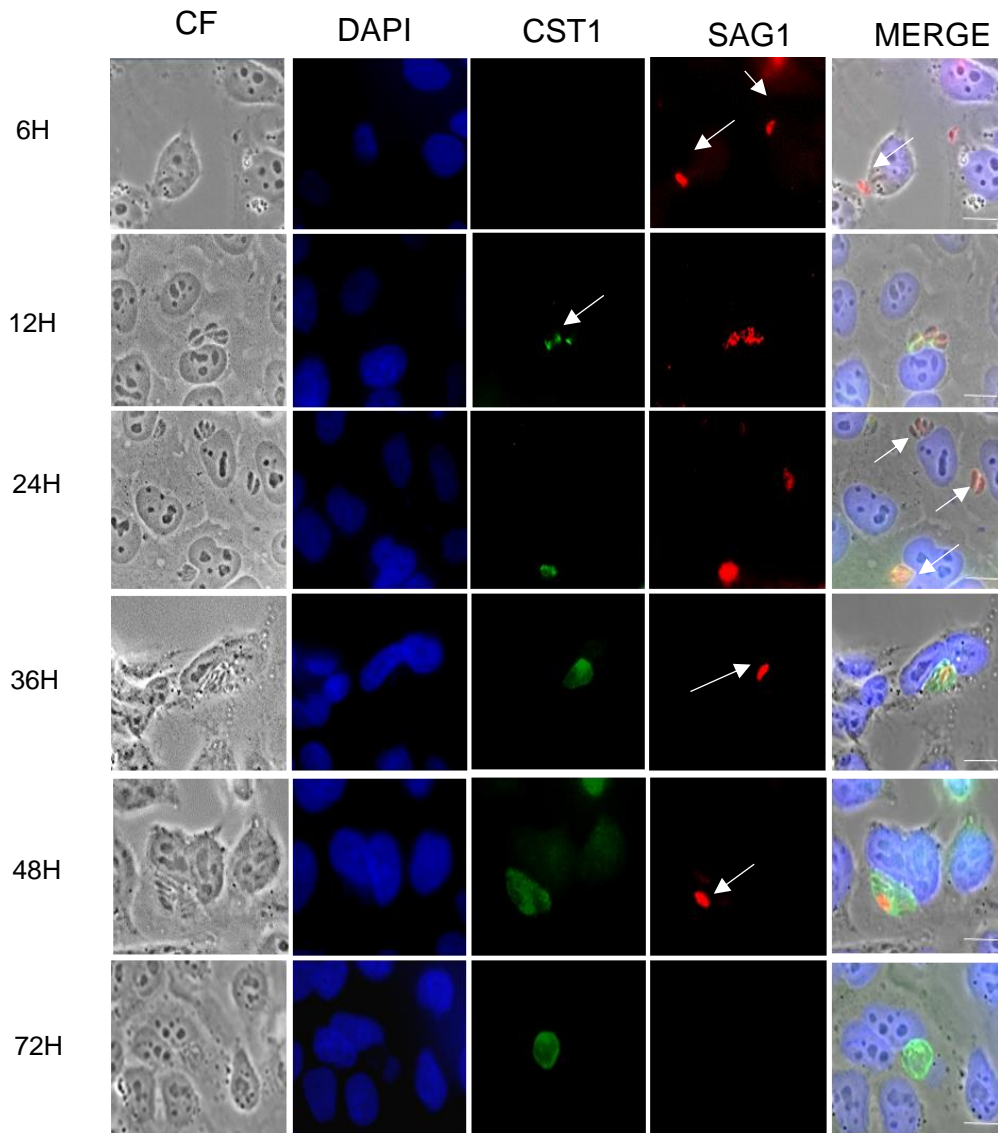


Figura 30. Cambios en la expresión de SAG-1 vs CST1 durante el curso temporal de cistogénesis inducida por exposición a IFN- γ . Las células HEp-2 invadidas con RH fueron expuestas a 200 U/mL de IFN- γ por 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h. C.F, Contraste de fases; CST1 marcado con lectina *D. biflorus*-FITC, SAG1-TRITC, Núcleos marcados con DAPI. Flecha blanca: proteína SAG1 en superficie de taquizoítos. Escala = 10 μ m, n=3.

Análisis por microscopia electrónica (barrido y transmisión) de células HEp-2 invadidas e inducidas a cistogénesis por IFN- γ

Con el fin de caracterizar las modificaciones ultraestructurales que ocurren en las células invadidas y en los parásitos durante la cistogénesis inducida por el IFN- γ , se procesaron células tratadas en las condiciones óptimas de cistogénesis para esta citocina (200 U/mL por 72 h y 10 días), para microscopia electrónica de barrido y transmisión.

Análisis por microscopia electrónica de barrido

Antes de revisar las células inducidas a cistogénesis, nos familiarizamos con la estructura de las células control invadidas y no invadidas a fin de poder determinar los cambios estructurales finos que ocurrieron durante la cistogénesis inducida. Las muestras control de células invadidas sin tratamiento con IFN- γ presentaron a los taquizoítos alojados en las VP's mostrando las organizaciones típicas a las descritas a las 72h, en estas muestras no se presentaron estructuras esferoidales como las encontradas en las muestras tratadas con IFN- γ Figura 30, lo que quiere decir que al no tratar las células con esta citocina, no se induce la formación de estas estructuras quísticas las cuales convencionalmente son esferoidales.

Los taquizoítos se presentaron adheridos entre sí y proliferando de forma sincrónica, lo cual se determina por el número de parásitos dentro de cada quiste. El arreglo intravacuolar mostrado en estas micrografías corresponden al de racimos.

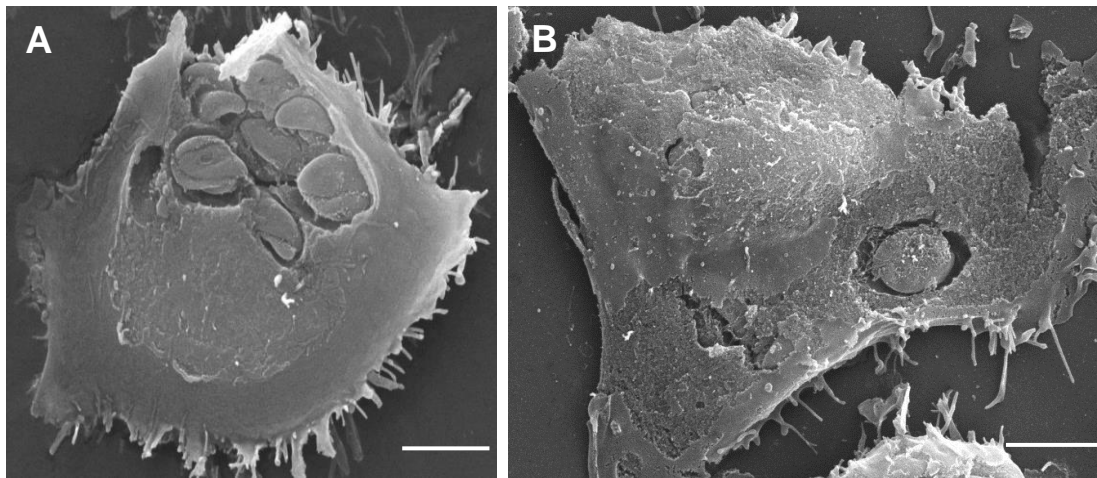


Figura 31. MEB de células HEp-2 invadidas sin tratamiento con IFN- γ . Las células invadidas se mantuvieron en el medio de cultivo sin IFN- γ por 72 h. Una vez procesadas para MEB, se les desprendió la cara apical de la membrana plasmática para evidenciar los parásitos intracelulares. (A) Célula multi-invasida con parásitos alojados en varias VP's en la misma célula; (B) Célula invadida mostrando una sola VP. Escala 5 μ m.

Ultraestructura de células invadidas inducidas a cistogénesis.

Con el fin de conocer la estructura de los pseudoquistes *in vitro* obtenidos bajo el tratamiento con IFN- γ en la cepa RH de *Toxoplasma* se procesó por microscopía electrónica de barrido (MEB) y por microscopía electrónica de transmisión (MET) las células de 72 h de tratamiento, bajo las condiciones óptimas en las que se obtuvo los mejores resultados para la inducción de la cistogénesis.

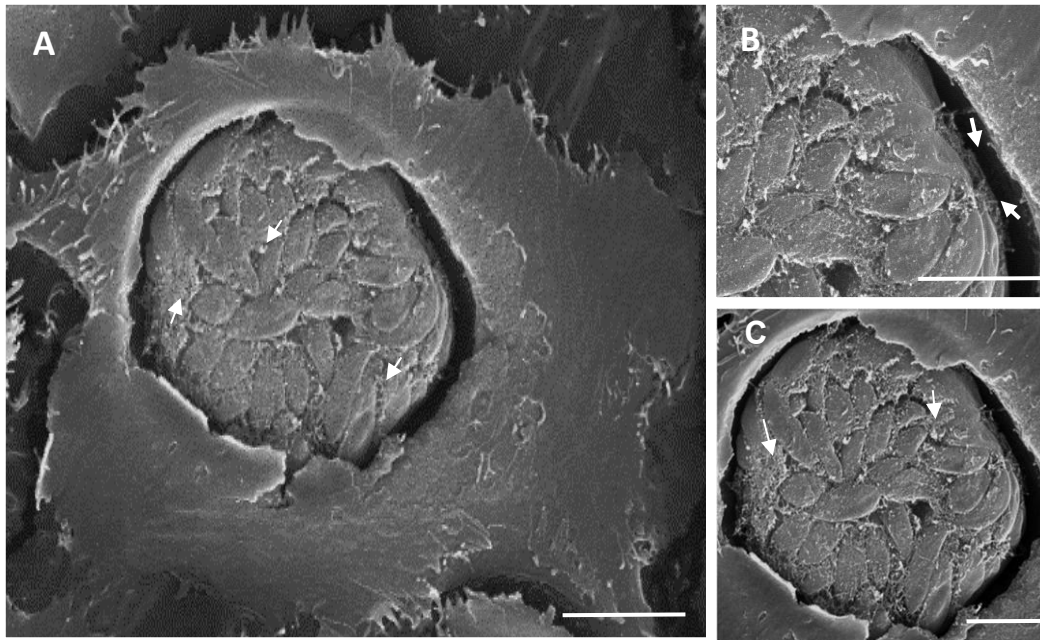


Figura 32. Estructuras prequísticas *in vitro* inducidas con 200 U/mL de IFN- γ en cepa RH de *T. gondii* observado por MEB. A, pseudoquiste A-C, micrografías a baja y alta amplificación de la superficie del quistes A. Escala 5 μ m.

Como resultado de la separación de la cara apical de la membrana celular, fue posible observar el interior de las VP's facilitándonos la caracterización estructural de los quistes en formación. Se observaron células conteniendo estructuras esféricas con diámetros entre 15 y 20 μ m que conforman un agregado esferoidal muy comprimido de parásitos (Figura 32). Se detectaron numerosas vesículas pequeñas de unos 200 nm asociadas a los bradizoítos las cuales podrían estar siendo liberadas por los bradizoítos desde su región posterior (flechas en C de Figura 32), se encontraron embebidos en una red fibrosa (flechas en A) diferente a la típica red vesículo tubular descrita en el interior de VP's conteniendo taquizoítos (Muñiz *et al.*, 2011) .

Los parásitos no presentan el arreglo típico de roseta o racimo, de hecho se observan desorganizados, típicamente como en un quiste. Adicionalmente presentaron una capa delgada en la periferia de la estructura (flechas en B de Figura 32), presumiblemente formaciones iniciales de la pared quística, que estaría empezando a generarse para recubrir y proteger el quiste posteriormente, una vez la estructura este madura y completamente formada.

Evaluación de la cystogénesis en tiempos prolongados de exposición a IFN- γ

Finalmente se quiso evaluar el progreso de dichas estructuras quísticas con mayor tiempo de maduración, sabiendo que la obtención de quistes que se ha realizado en estudios previos ha sido únicamente en cepas tipo II y durante meses de infección: Para ello se analizó la ultraestructura de los quistes a los 6 y 10 días de cultivo celular. Desde los 6 días se encontró que los quistes se desprenden de la monocapa celular y permanecen suspendidos en el caldo de cultivo, mientras que las células no infectadas, se deterioraron y murieron.

Para este procedimiento y con la ayuda de la QFB Sirenia González, jefe de la Unidad de Microscopía electrónica, se implementó una metodología nueva en el proceso de fijado de los quistes, debido a que en este tiempo (6-10 días) ya se encontraban en su mayoría en el sobrenadante del cultivo celular, así que, se decidió no solamente fijar los cubreobjetos con el material que permanecía integro (Figura 34), sino que además se fijó todo el material contenido en el sobrenadante del cultivo celular, haciéndolo pasar por filtros tipo GS marca Millipore (EE.UU) resistentes a etanol de 0.22 micras, desde el inicio del procesamiento, con el fin, de no perder muestra. Los filtros fueron procesados de manera cuidadosa de la misma forma en que se tratan los cubreobjetos comúnmente para esta técnica y se observaron al MEB.

Se realizó la técnica de Tanaka modificada en el laboratorio y por microscopia electrónica de barrido (Muñiz *et al.*, 2011) . Para esto se desprende la membrana apical de la estructura analizada para poder exhibir el interior. Los quistes se rompieron y se dejó al descubierto su interior, parásitos, vesículas, material filamentososo, granular y la red intraquística.

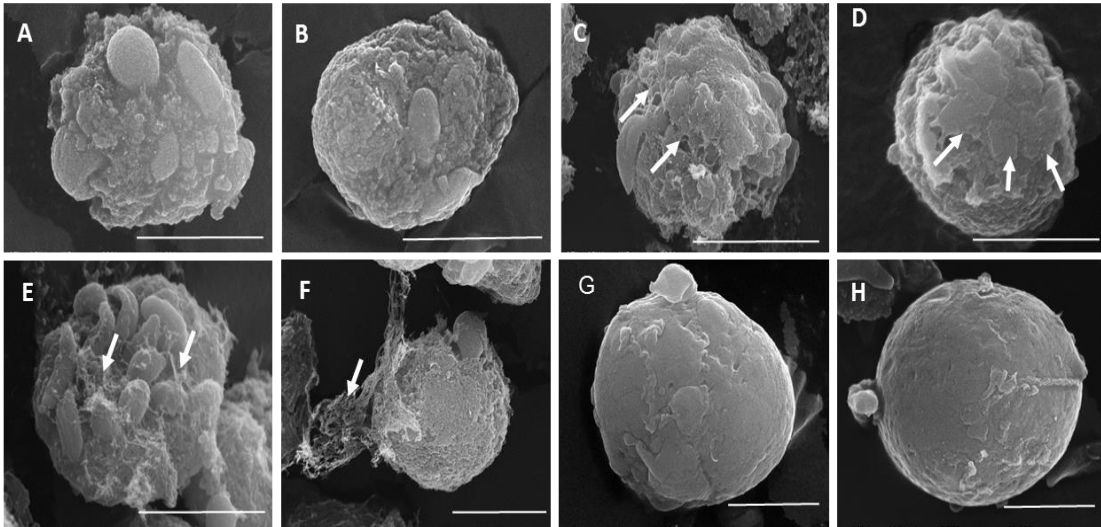


Figura 33. Estructuras prequísticas de 6 días, conformación de placas, red interna y externa y quistes de 10 días. Conformación de pared quística a los 10 días de tratamiento con 200 U/mL de IFN- γ en cepa RH de *T. gondii*. (A-B) quistes con 6 días de maduración. (C-D) formación de capas. (E-F) Presencia de red interna y externa que enreda y recubre a los bradizoítos y los quistes respectivamente. Escalas= 5 μ m.

Los resultados mostraron en las preparaciones de 6 días, la presencia de numerosas estructuras esferoidales con apariencia de quistes en formación que se han desprendido de su célula hospedera (Figura 33 A-B) y se hallaron suspendidas en sobrenadantes de cultivo celular.

Estas estructuras están compuestas de diferentes capas en forma de placas (flechas en Figura 33 C-D) que envuelven a los parásitos en su interior, muy probablemente estas son las primeras fases de formación de los quistes. Adicionalmente, en varias de las estructuras quísticas se observó una malla o red que entrelazaba a los parásitos y a estructuras vesiculares alojados al interior del quiste (flechas en Figura 32 E-F).

Estas micrografías resultan interesantes, debido a que nunca antes se ha reportado este tipo de red en quistes tisulares. A los 10 días de tratamiento (Figura G y H) se presentaron estructuras más maduras y esferoidales, con una pared quística desarrollada y completa presentando arreglos similares a los observados en quistes comúnmente extraídos y purificados de cerebro.

Análisis por microscopía electrónica de transmisión.

Inicialmente, en los cortes de muestras de control negativo (Figura 34), las cuales no fueron tratadas con IFN γ , se observa la conformación típica de vacuolas parasitóforas con taquizoítos, se presentó además la conformación típica de la red intravacuolar en células HEP-2 invadidas con la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Mostrando además, que en estos controles negativos, los taquizoítos no presentan abundante cantidad de gránulos de amilopectina, como si se presentan en las muestras tratadas con IFN γ (flechas blancas, Figura 35 – A).

Se procesaron los quistes presentes sobrenadantes del cultivo celular después de 3 días y 10 días de tratamiento para ultramicrotomía. Se observó en los cortes finos la presencia de estructuras esferoidales alojando parásitos presumiblemente bradizoítos (Figura 35).

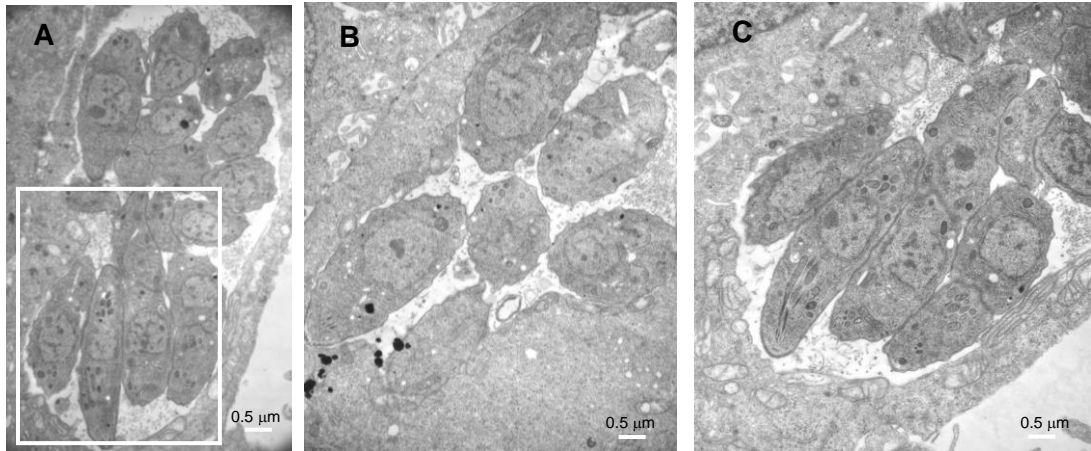


Figura 34. Estructuras de HEp-2 invadidas con cepa RH, sin tratamiento de IFN- γ como control negativo. A, corte fino de vacuola con organización en roseta intravacuolar.1 Escala=0.5 μm . B, roseta de taquizoítos sin gránulos de amilopectina, escala=0.5 μm . C, Ampliación de A. Escalas = 0.2 μm .

Los parásitos se encontraron al interior de la pared quística, completamente desorganizados y embebidos dentro de una matriz quística (Figura 35-B MQ). En ambos tiempos de incubación se observaron gránulos de amilopectina (vesículas de color blanco en flechas blancas) presentes en este estadio, lo cual confirma que se trata de bradizoítos, pues en los taquizoítos los gránulos de amilopectina están ausentes. Adicionalmente los bradizoítos presentaron como ya estaba descrito, una gran cantidad de micronemos localizados en el complejo apical del extremo anterior (flechas azules en Figura 35).

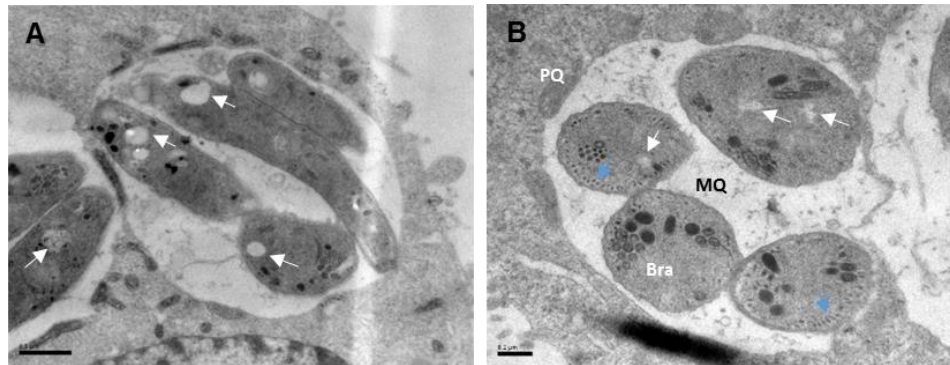


Figura 35. Gránulos de amilopectina y micronemos en bradizoítos de la cepa RH de *T. gondii* a los 10 días del proceso de cistogénesis. A, corte fino de quistes en con tratamiento de 200 U/mL de IFN γ , flechas blancas (gránulos de amilopectina). Escala=0.5 μ m. B, bradizoítos (Bra), matriz quística (MQ) y pared quística (PQ) y Micronemos (flechas azules). Escalas = 0.2 μ m.

Con el objetivo de observar cambios morfológicos de la célula y la vacuola parasitófora durante la formación de quistes tisulares como los previamente se observó por microscopia de barrido y Tanaka. En cuanto a la pared quística, presentó un grosor no uniforme de aproximadamente 100 nm, en el cual se encontraron una capa delgada interna (flecha en Figura 36 A) con apariencia fina. En la Figura 36 B. se observan mitocondrias se dispersaron en todo el citosol y se desprendieron de la membrana vacuolar quedando libre de estos organelos. En el recuadro (Figura 36 C) se observó como la red vesículo tubular esta polarizada a una región de la estructura prequísticas. Al parecer el tratamiento con esta citocina durante estos tiempos de incubación cambió el arreglo vacuolar de los parásitos, haciendo que esta cohesión se perdiera y ahora los parásitos se vean desordenados y con espacios entre ellos (en la Figura 36 D).

La célula adquiere una forma esferoidal. La VP se engrosa para dar forma a la pared quística y no se presentó el cuerpo residual como se observa en las acumulaciones de la (Figura 35 B). Además en la cara externa de la célula que ya presenta una estructura esferoidal se encontraron asociadas pequeñas vesículas de origen desconocidos de un tamaño promedio de 100 nm de diámetro (Figura 36 D),

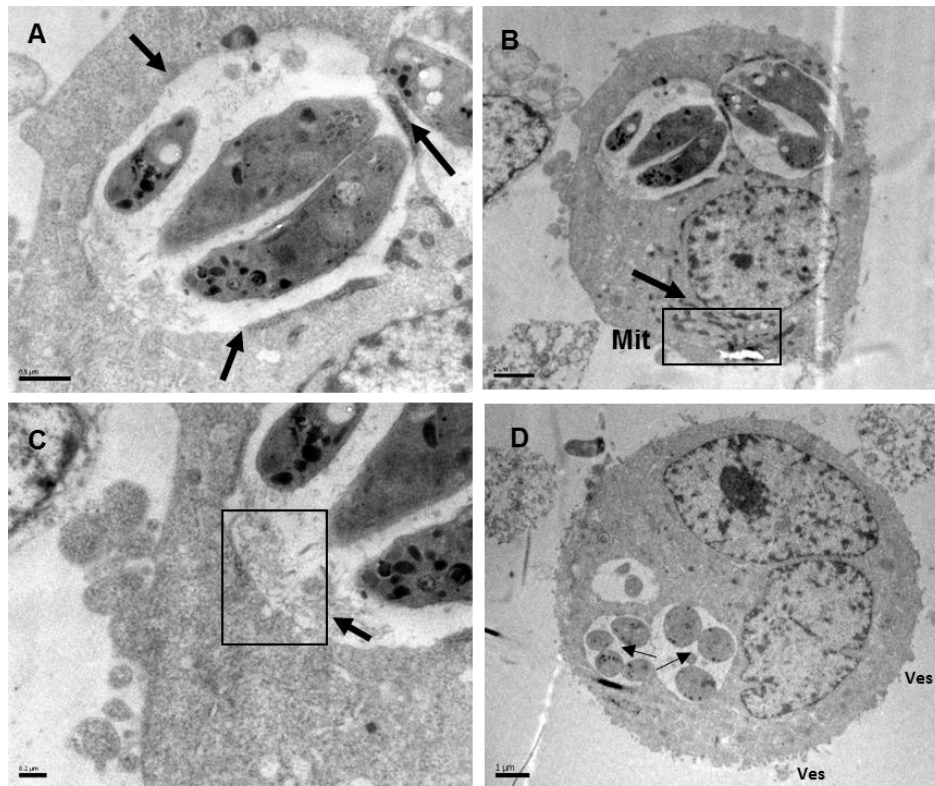


Figura 36. Formación de la pared quística, polarización de la red vesículo tubular, dispersión mitocondrial y desorden intravacuolar. Tratamiento con 200 U/mL de IFN γ por 3 y 10 días. A, Etapa temprana de la pared quística. Escala= 0.5 μ m. B, mitocondrias dispersas en citosol. Escala= 2 μ m. C, polarización de la red vesículo-tubular. Escala= 0.2 μ m. D, vesículas en cara externa de la membrana celular. Escala= 1 μ m.

X. DISCUSIÓN

La caracterización de los eventos celulares, bioquímicos y moleculares durante la cistogénesis de *Toxoplasma gondii* es una herramienta importante para la generación de posibles alternativas o tratamientos en contra de una enfermedad cuyos elevados índices de seroprevalencia a nivel mundial, presentan rangos de 10 a 50% en países desarrollados y del 80% en países en vía de desarrollo (Kaplan JE, 2009).

Inicialmente y con el objetivo de validar el modelo celular a trabajar se analizó la presencia del receptor de IFN- γ mediante ensayos de inmunofluorescencia y *Western blot*. Las células HEp-2 fueron seleccionadas como modelo debido a que en este linaje el parásito ha presentado un desarrollo normal y la conformación típica en sus etapas de replicación.

Las células HEp-2 presentaron el receptor a IFN- γ apreciándose una banda específica correspondiente al peso molecular de 40 kDa. Por lo tanto, el receptor de IFN- γ se encuentra en el modelo celular y se confirmó no solo su presencia en la membrana celular sino además el efecto de internalización de ligando IFN- γ mediada por receptor y ocurrido durante los primeros minutos de tratamiento con la citocina (Figuras 12 y 13) mismo efecto descrito previamente en (Kerr & Stark, 1991).

Adicionalmente, los videos en time lapse (Figura 14) permitieron apreciar la dinámica ocurrida en el citoplasma de células HEp-2 al ser tratadas con IFN- γ , esto debido a la formación de vesículas mediada por clatrina (Schmid, 1997), (Harvey *et al.*, 2000), en las cuales se transportan los receptores y las moléculas unidas específicamente, en este caso el IFN- γ .

Estos eventos no ocurrieron en los controles negativos, es decir, en las células HEp-2 perfundidas con MEM al 8%. Se concluyó que la citocina IFN- γ , sí estaba siendo internalizada en este linaje celular y adicionalmente estaba generando cambios al interaccionar con las células. Obtenidos estos resultados, se decidió determinar el efecto de esta citocina en la inducción de la cistogénesis, pues el linaje celular utilizado efectivamente mostró ser susceptible al tratamiento con IFN- γ .

En la inducción de la cistogénesis mediante el tratamiento con IFN- γ , se encontró, en primera instancia, la expresión de la glicoproteína CST1 hasta después de 12 h, muy probablemente porque tienen que presentarse varias divisiones celulares hasta que la célula haya alcanzado el proceso de diferenciación. Al parecer, la proteína migra del extremo posterior al cuerpo residual, en donde se presenta claramente a partir de las 24 h. Esto probablemente esté asociado a un proceso de migración molecular que el parásito inicia para la posterior conformación de barreras que lo puedan proteger como la pared quística.

Esta aseveración se relaciona con el confinamiento de la glicoproteína CST1 en la periferia de la VP a partir de las 36 h de tratamiento, que alcanza el máximo grado de expresión en la membrana de la VP a las 72 h de tratamiento, tiempo en el cual se evidenció la mayor cantidad de estructuras prequísticas bien formadas y aumentó la expresión de la glicoproteína CST1 en ensayos de *Western blot*. Estos eventos ocurrieron de manera similar en todos los tratamientos desde las 12 hasta las 36 horas de exposición a la citocina. De acuerdo con nuestros resultados, la cistogénesis representa un proceso que involucra la formación de estadios intermedios en donde la glicoproteína CST1 se expresa de manera progresiva y con diversos cambios que corresponden a cada ciclo celular.

Este hallazgo, se hace particularmente innovador, en el sentido que previamente no se había descrito la caracterización en la expresión diferencial de moléculas durante la cistogénesis inducida bajo diversas condiciones de estrés para el parásito y bajo el tratamiento con IFN- γ (Soete *et al.*, 1994) (Bohne, Heesemann, & Gross, 1993). Nuestro trabajo, a diferencia de los ya reportados ofrece una caracterización de la expresión molecular de algunas proteínas como CST1, BAG1 Y SAG1 durante el desarrollo de la cistogénesis en las distintas etapas de replicación del parásito.

La cuantificación de estas vacuolas y su respectivo análisis estadístico permitió determinar las condiciones óptimas (prueba tipo) para la inducción de la cistogénesis, las cuales fueron: 200 U/mL y 72 h de tratamiento con IFN- γ , concentración a la cual se había reportado un efecto toxoplásmico en trabajos anteriores (Nathan *et al.*, 1983).

Estas condiciones muestran mayor reactividad de CST1 en comparación con otras concentraciones probadas y aproximadamente el 70% de las VP's son positivas en la expresión CST1, indicando que efectivamente el IFN- γ activa el proceso de diferenciación y enquistamiento, los cuales probablemente ocurren debido a que el parásito podría estar censando los mecanismos que ponen en riesgo su supervivencia, como por ejemplo la inanición nutricional a la cual es expuesto cuando se activa la vía JAK – STAT1 por IFN- γ . (Pfefferkorn, 1984), (Pfefferkorn *et al.*, 1986) y por lo tanto, emprende su proceso de diferenciación.

La expresión de BAG-1, proteína de choque térmico citosólica y exclusiva de bradizoítos (Bohne W, Gross U, Ferguson DJ, & J., 1995) ocurrió después de la expresión de CST1, lo cual sugiere que la formación de la pared del quiste ocurre inclusive antes de que se inicie el proceso de diferenciación.

Esto constituiría un posible mecanismo que activa el parásito para protegerse de la acción de la citocina, formando una barrera física responsable de aislar a los bradizoítos, como se sugiere en trabajos previos (Lemgruber *et al.*, 2011). Los bradizoítos una vez que se encuentran protegidos por esta estructura empiezan su etapa lenta de replicación permaneciendo viables, (Weiss & Kim, 2000). Esto explicaría por qué la proteína CST1 se expresa antes que BAG1, asegurando así la resistencia del parásito a la respuesta inmune del hospedero.

Los ensayos de co-localización con CST1 y SAG1 nos permitieron dar más fuerza a esta interpretación, pues interesantemente, también se presentan etapas intermedias en donde SAG1 y CST1 coexisten, lo cual indica que la expresión de antígenos de superficie 1 típicos de taquizoítos no desaparece en cuanto empieza el proceso de diferenciación, es decir, se presentan estadios intermedios o híbridos, tal y como se describe en algunos ensayos previos, hechos en quistes de cerebro y pulmón de ratón (Lekutis, Ferguson, & Boothroyd, 2000).

La disminución considerable de SAG1 después de las 36 horas de tratamiento con IFN- γ desapareciendo prácticamente a las 72 h dentro de las vacuolas que presentaban la expresión de la glicoproteína CST1, puede tener relación directa con la expresión constitutiva de genes específicos para ambos estadios, como por ejemplo cuando se regula y limita la expresión de genes que codifican el antígeno de superficie 1 (SAG1) durante la diferenciación a bradizoíto (Bonhe, Wirsing, & Gross, 1997). Debido a que en las estructuras internas de la VP como el cuerpo residual se empieza a detectar la proteína

CST1, inclusive antes de que ocurra la diferenciación completa de taquizoíto a bradizoíto y que la expresión de SAG1 disminuya paulatinamente, mientras aumenta la de BAG1 durante el tratamiento con IFN- γ , se puede concluir, que tanto la VP como los parásitos están sujetos a cambios moleculares que soportan la posible formación de un quiste tisular.

En microscopia electrónica de barrido (SEM) y transmisión las formaciones prequísticas a las 72 h de tratamiento, aun encontradas al interior de la célula hospedera son efectivamente quistes tisulares en proceso de maduración, pues presentan cambios ultraestructurales ocurridos únicamente durante el proceso de enquistamiento tisular (Zadeh *et al.*, 2014).

En primera instancia, se encontraron estructuras esferoidales típicas de un quiste con tamaños que oscilan entre los 15 y 25 μm de diámetro. Se ha reportado en diferentes tejidos y órganos, que pueden llegar inclusive a medir 5 μm en estados inmaduros (Weiss & Kim, 2000) y aunque los quistes cerebrales normalmente presentan diámetros hasta de 70 μm (Dubey *et al.*, 1998), estos fueron inducidos en células de tejido epitelial HEP-2, por eso los tamaños no alcanzan diámetros tan grandes como los encontrados en cerebro.

Adicionalmente, las estructuras asociadas a la matriz quística, como pequeñas vesículas y redes fibrosas con tamaños que oscilan entre los 100 y 500 nm pueden estar formando parte del quiste tisular y siendo secretadas por los bradizoítos hacia la matriz quística para probablemente conformar la pared, como lo sugieren estudios previos (Lemgruber *et al.*, 2011) y en los cuales se describe un tamaño semejante a las vesículas encontradas en este estudio (100 nm).

Con el objetivo de caracterizar eventos morfológicos más detallados en etapas más maduras del quiste, los resultados obtenidos a los 6 y 10 días de tratamiento con IFN- γ , revelan que en estos tiempos de maduración el quiste al parecer se aísla ya de la célula hospedera indicando, que la pared quística deriva de la membrana de la VP y no de la membrana de la célula hospedera, que las redes internas favorecen la adhesión y cohesión de los bradizoítos a la matriz quística y que el tratamiento con la citocina durante tiempos prolongados, como 10 días (Figura 33) induce la formación de estructuras que ya presentan una pared quística bien definida y muy semejantes a la pared de los quistes obtenidos de extractos cerebrales (Lemgruber *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se presentaron redes que envuelven y recubren al quiste. A nivel morfológico estas estructuras aún no han sido descritas o predichas y al ser los quistes inmaduros la red podría estar dándole soporte y sirviendo de ancla para mantenerlos unidos a los tejidos que los rodean. La organización intravacuolar de los parásitos al interior de los quistes obtenidos después del tratamiento no presentó el arreglo común en forma de rosetas como previamente ha sido descrito (Muñiz *et al.*, 2011) para vacuolas que contienen únicamente el estadio de rápida replicación: taquizoítos.

Esto sugiere que en células tratadas con IFN- γ , los parásitos intravacuolares están completamente desorganizados, separados entre sí y con pérdida de la sincronía proliferativa, factores directamente relacionados con la formación de quistes tisulares (Chew, Wah, Ambu, & Segarra, 2012).

Por otra parte, la elevada presencia de gránulos de amilopectina (Figura 34), distinguibles por su falta de contraste bajo el microscopio electrónico y los cuales son característicos y abundantes en bradizoítos (Weiss & Kim, 2000) confirmó que estas estructuras no eran taquizoítos, debido a que estos gránulos están prácticamente ausentes este estadio (Guimaraes, de Carvalho, & Barbosa, 2003), siendo una evidencia más de conversión ocurrida bajo el tratamiento con IFN- γ . Así mismo se observó claramente una distribución polarizada (Figura 35) de la red vesículo tubular (Mercier *et al.*, 2002) y la dispersión de organelos citoplásmicos de la célula invadida como las mitocondrias. Esto evidencia un posible evento de transformación morfológica asociado al proceso de diferenciación, en el cual estas estructuras podrían estar contribuyendo al engrosamiento de la pared quística, un aspecto que tendría que investigarse en el futuro.

Interesantemente estas estructuras observadas después del tratamiento con IFN- γ , no son células que presenten formación de ampollas o “bebling” las cuales evidencian células en proceso de muerte programada (Nusbaum, Laine, Seveau, Lesavre, & Halbwachs, 2004).

Por el contrario, son estructuras celulares que en su interior presentan formaciones quísticas y además presentan características estructurales relacionadas con cambios en la membrana plasmática, así como una retracción del aparente quiste en formación para generar una separación de esta célula con respecto a las células vecinas. Estas estrategias nos permitieron observar los cambios paulatinos de las estructuras hasta alcanzar la madurez a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento con IFN- γ , objetivo que hasta el momento aún no han sido reportado ni caracterizado en

trabajos anteriores en los cuales se induce la cistogénesis bajo condiciones de estrés para el parásito como el pH alcalino, el estrés nutricional, el choque térmico, etc., pero no se evalúa el desarrollo del quiste tisular (Soete *et al.*, 1994). El efecto del IFN- γ , indica que esta citocina es importante, no solo en el control de la replicación e invasión del parásito, sino que además es un fuerte inmunomodulador que orquesta toda una serie mecanismos efectores inmunológicos o posibles señales que, favorecen de alguna manera el enquistamiento del parásito. Este hallazgo representa por primera vez una propuesta, en la cual se propone la participación y contribución de dicha molécula fisiológica, en la cistogénesis o formación de quiste tisular. Se considera que el método de inducción de la diferenciación a bradizoítos con el IFN- γ , facilitará en un futuro próximo la posibilidad de contar con preparaciones enriquecidas de bradizoítos para poder realizar el estudio del proteoma total de esta forma de diferenciación de *Toxoplasma* que está poco conocida. Así como, de los constituyentes del quiste mismo.

De igual manera, el estudio de la cepa RH, una cepa aparentemente no cistogénica según diversos autores (Lecomte *et al.*, 1992; Miranda *et al.*, 2015; Ninghan *et al.*, 2013), debido a su velocidad de replicación en comparación con otras cepas y la rápida diseminación (Chew *et al.*, 2012; Ferreira da Silva Mda *et al.*, 2008), constituye un importante aporte al conocimiento del linaje genotípico y también al estudio de posibles blancos terapéuticos inmunológicos en infecciones causadas por este tipo de cepas que se presentan con mayor frecuencia en la toxoplasmosis congénita humana (Fuentes, Rubio, Ramirez, & Alvar, 2001) y que en estudios anteriores ha presentado relación directa con la transmisión transplacentaria y con enfermedades oculares (Grigg M.E, Bonnefoy S., Hehl A.B. , Suzuki, & Boothroyd, 2001).

XI. CONCLUSIONES

1. Las células HEp-2 constituyen un buen modelo para la inducción de la cistogénesis mediada por IFN- γ , debido no solo a la presencia de su receptor, sino además al efecto de internalización de ligando ocurrido durante los primeros minutos de tratamiento con la citocina.
2. La máxima diferenciación a quistes ocurrió a las 72 horas de tratamiento con IFN- γ y se alcanzó con 200 U/mL de la citocina, de forma reproducible en una cepa que estaba descrita como no cistogénica.
3. Existe un estadio intermedio en el cual los parásitos expresan tanto SAG1 como BAG1 y CST1 (24h - 48h), el cual se correlaciona con cambios en la organización estructural de la VP y de los parásitos dando lugar a la formación de un quiste tisular.
4. El tratamiento con IFN- γ , modificó el arreglo intravacuolar con respecto a la organización típica de la proliferación sincrónica del parásito, hecho asociado a la formación de un quiste tisular.
5. Los cambios morfológicos observados después del tratamiento con IFN- γ presentaron características típicas de quistes tisulares en aparente proceso de maduración.
6. La estructura quística proviene de la VP y no de la membrana de la célula hospedera.

XII. PERSPECTIVAS

1. Se podrán confirmar los cambios en la organización de la VP que derivan en la formación del quiste tisular mediante la técnica de inmunocitoquímica usando anticuerpos peroxidados.
2. Determinar la expresión de la proteína de R1IFN- γ en taquizoítos extracelulares con el fin de determinar sí la citocina tiene una actividad directa sobre el parásito.
3. Estudiar signos de señalamiento intracelular como la vía JAK-STA1 o señalamiento bioquímico que se activen en el parásito y que estén involucrados en el fenómeno de enquistamiento.
4. Caracterizar por proteómica y genómica, moléculas propias del parásito que estén relacionadas con la inducción de la cistogénesis.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, L. B., J. B. Hibbs, Jr., R. R. Taintor and J. L. Krahenbuhl (1990). "Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine." J Immunol **144**(7): 2725-2729.
2. Behnke, M. S., A. Khan, J. C. Wootton, J. P. Dubey, K. Tang and L. D. Sibley (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.
3. Black, M. W. and J. C. Boothroyd (2000). "Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 607-623.
4. Bocci, V. (1988). "Roles of interferon produced in physiological conditions. A speculative review." Immunology **64**(1): 1-9.
5. Bohne W, Gross U, Ferguson DJ and H. J. (1995). "Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants." Mol Microbiol. **16**(6): 1221-1230.
6. Bohne, W., J. Heesemann and U. Gross (1993). "Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages." Infect Immun **61**(3): 1141-1145.
7. Bohne, W., M. Holpert and U. Gross (1999). "Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." Immunobiology. **201**(2): 248-254.
8. Bonhe, W., A. Wirsing and U. Gross (1997). "Bradyzoite-specific gene expression in *Toxoplasma gondii* requires minimal genomic elements." Molecular and Biochemical Parasitology **85** 89–98.
9. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
10. Briscoe, J., N. C. Rogers, B. A. Witthuhn, D. Watling, A. G. Harpur, A. F. Wilks, G. R. Stark, J. N. Ihle and I. M. Kerr (1996). "Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state." EMBO **15**: 799–809.
11. Cantell, K., H. Schellekens, L. Pyhala, S. Hirvonen, P. H. Van der Meide and A. De Reus (1986). "Pharmacokinetic studies with human and rat interferons-gamma in different species." J Interferon Res **6**(6): 671-675.
12. Castro E.K. (2012). "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." CINVESTAV San Pedro Zacatenco.
13. Castro, K. and R. Mondragón (2014). "Cistogénesis." Toxoplasmosis animal **ISBN: 978-607-8072-89-7**: 89-.

14. Celada, A., R. Allen, I. Esparza, P. W. Gray and R. D. Schreiber (1985). "Demonstration and partial characterization of the interferon-gamma receptor on human mononuclear phagocytes." J Clin Invest **76**(6): 2196-2205.
15. Celada, A. and R. D. Schreiber (1987). "Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling." J Immunol **139**(1): 147-153.
16. Chew, W. K., M. J. Wah, S. Ambu and I. Segarra (2012). "*Toxoplasma gondii*: determination of the onset of chronic infection in mice and the *in vitro* reactivation of brain cysts." Exp Parasitol **130**(1): 22-25.
17. Dubey, J. P. (1994). "Toxoplasmosis." J Am Vet Med Assoc **205**(11): 1593-1598.
18. Dubey, J. P. (1998). "Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **28**(7): 1019-1024.
19. Dubey, J. P., D. S. Lindsay and C. A. Speer (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." Clin Microbiol Rev **11**(2): 267-299.
20. Dzierszinski, F., M. Nishi, L. Ouko and D. S. Roos (2004). "Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation." Eukaryot Cell **3**(4): 992-1003.
21. Farrar, M. A. and R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." Annu Rev Immunol **11**: 571-611.
22. Ferguson, D. J. and W. M. Hutchison (1987). "The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice." Virchows Arch **411**: 39-43.
23. Ferreira da Silva Mda, F., H. S. Barbosa, U. Gross and C. G. Luder (2008). "Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*." Mol Biosyst **4**(8): 824-834.
24. Finbloom, D. S. (1988). "Internalization and degradation of human recombinant interferon-gamma in the human histiocytic lymphoma cell line, U937: relationship to Fc receptor enhancement and antiproliferation." Clin Immunol Immunopathol **47**(1): 93-105.
25. Fischer, D. Novick, P. Orchansky and M. Rubinstein (1988). "Two molecular forms of the human interferon-gamma receptor. Ligand binding, internalization, and down-regulation." J Biol Chem **263**(6): 2632-2637.
26. Fischer, B. Thoma, P. Scheurich and K. Pfizenmaier (1990). "Glycosylation of the human interferon-gamma receptor. N-linked carbohydrates contribute to structural heterogeneity and are required for ligand binding." J Biol Chem **265**(3): 1710-1717.
27. Frenkel JK, D. J., Miller NL. (1970). "*Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts." Science. **167**((3919)): 893-896.

28. Fuentes, I., J. M. Rubio, C. Ramirez and J. Alvar (2001). "Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples." J Clin Microbiol **39**(4): 1566-1570.
29. Gómez de L, C. and R. Mondragón (2014). "Morfología celular." Toxoplasmosis animal ISBN: 978-607-8072-89-7.
30. Gray, P. W. and D. V. Goeddel (1982). "Structure of the human immune interferon gene." Nature **298**(5877): 859-863.
31. Gray, P. W. and D. V. Goeddel (1983). "Cloning and expression of murine immune interferon cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(19): 5842-5846.
32. Gray, P. W., D. W. Leung, D. Pennica, E. Yelverton, R. Najarian, C. C. Simonsen, R. Derynck, P. J. Sherwood, D. M. Wallace, S. L. Berger, A. D. Levinson and D. V. Goeddel (1982). "Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells." Nature **295**(5849): 503-508.
33. Grigg M.E, Bonnefoy S., Hehl A.B. , Suzuki and J. Boothroyd (2001). "Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries."
34. Grzesiek, S., H. Dobei, R. Gentz, G. Garotta, A. M. Labhardt and A. Bax (1992). "¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma." Biochemistry **31**(35): 8180-8190.
35. Guimaraes, E. V., M. Acquarone, L. de Carvalho and H. S. Barbosa (2007). "Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and characterization." Micron **38**(6): 651-658.
36. Guimaraes, E. V., L. de Carvalho and H. S. Barbosa (2003). "An alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(7): 915-917.
37. Harvey, L., B. Arnold, Z. Lawrence, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell (2000). "Molecular Cell Biology; 2000. ." W. H. Freeman ISBN-10: 0-7167-3136-3: 7167-3136-7163.
38. Hernández Contreras, P. (2012). "Inducción de la cistogénesis de *Toxoplasma gondii* in vitro por inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa y caracterización de algunos eventos celulares y moleculares involucrados " Cinvestav San Pedro Zacatenco(Tesis de Maestría): 87.
39. Hershey, G. K. and R. D. Schreiber (1989). "Biosynthetic analysis of the human interferon-gamma receptor. Identification of N-linked glycosylation intermediates." J Biol Chem **264**(20): 11981-11988.
40. Hibbs JB Jr, V. Z., Taintor RR (1987). "L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells." J Immunol. **138**(2): 550-565.
41. Howe, D. K. and L. D. Sibley (1995). "*Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease." J Infect Dis **172**(6): 1561-1566.

42. Hsu, Y. R. and T. Arakawa (1985). "Structural studies on acid unfolding and refolding of recombinant human interferon gamma." Biochemistry **24**(27): 7959-7963.
43. Igarashi, K., G. Garotta, L. Ozmen, A. Ziemiecki, A. F. Wilks, A. G. Harpur, A. C. Lerner and D. S. Finbloom (1994). "Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor." J Biol Chem **269**(20): 14333-14336.
44. Jacobs, L., J. S. Remington and M. L. Melton (1960). "The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*." J Parasitol **46**: 11-21.
45. Johnson, K. P. and H. S. Panitch (1989). "Effects of experimental recombinant interferons on multiple sclerosis." Trans Am Clin Climatol Assoc **100**: 171-176.
46. Kaplan JE, B. C., Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H, *et al* (2009). "Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America." MMWR Recomm Rep **58**((RR-4)): 1–207.
47. Kelker, H. C., J. Le, B. Y. Rubin, Y. K. Yip, C. Nagler and J. Vilcek (1984). "Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody." J Biol Chem **259**(7): 4301-4304.
48. Kelker, H. C., Y. K. Yip, P. Anderson and J. Vilcek (1983). "Effects of glycosidase treatment on the physicochemical properties and biological activity of human interferon-gamma." J Biol Chem **258**(13): 8010-8013.
49. Kerr, I. M. and G. R. Stark (1991). "The control of interferon-inducible gene expression." FEBS Lett **285**(2): 194-198.
50. Kozak, C. A., M. Peyser, M. Krall, T. M. Mariano, C. S. Kumar, S. Pestka and B. A. Mock (1990). "Molecular genetic markers spanning mouse chromosome 10." Genomics **8**(3): 519-524.
51. Krause, C. D., E. Mei, J. Xie, Y. Jia, M. A. Bopp, R. M. Hochstrasser and S. Pestka (2002). "Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells." Mol Cell Proteomics **1**(10): 805-815.
52. Lane, A., M. Soete, J. F. Dubremetz and J. E. Smith (1996). "*Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*." Parasitol Res **82**(4): 340-346.
53. Lang, C., U. Gross and C. G. Luder (2007). "Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*." Parasitol Res **100**(2): 191-203.
54. Lecomte, V., B. F. Chumpitazi, B. Pasquier, P. Ambroise-Thomas, F. Santoro and G. Teyssier (1992). "Brain-tissue cysts in rats infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii*." Parasitol Res **78**(3): 267-269.

55. Lekutis, C., D. J. Ferguson and J. C. Boothroyd (2000). "*Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2." Exp Parasitol **96**(2): 89-96.
56. Lemgruber, L., P. Lupetti, E. S. Martins-Duarte, W. De Souza and R. C. Vommaro (2011). "The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form." Cell Microbiol **13**(12): 1920-1932.
57. Leriche, M. A. and J. F. Dubremetz (2012). "Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion." Exp Parasitol **130**(1): 1-5.
58. Lyons, R. E., R. McLeod and C. W. Roberts (2002). "*Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion." Trends Parasitol **18**(5): 198-201.
59. Mao, C., M. Aguet and G. Merlin (1989). "Molecular characterization of the human interferon-gamma receptor: analysis of polymorphism and glycosylation." J Interferon Res **9**(6): 659-669.
60. Martens, S., I. Parvanova, J. Zerrahn, G. Griffiths, G. Schell, G. Reichmann and J. C. Howard (2005). "Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases." PLoS Pathog **1**(3): e24.
61. Martín-Hernández, I. and S. M. García (2003). "Toxoplasmosis: infección oportunista en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida." Rev Biomed **14**: 101-111.
62. Martín Díaz, R. and R. Mondragón (2014). "Invasión Celular." Toxoplasmosis animal ISBN: 978-607-8072-89-7.
63. Melzer, T., A. Duffy, L. Weiss and S. Halonen (2008). "The gamma interferon (IFN- γ)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN- γ -stimulated astrocytes." Infect Immun **76**(11): 4883-4894.
64. Meraz, M. A., J. M. White, K. C. Sheehan, E. A. Bach, S. J. Rodig, A. S. Dighe, D. H. Kaplan, J. K. Riley, A. C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R. N. DuBois, R. Clark, M. Aguet and R. D. Schreiber (1996). "Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway." Cell **84**(3): 431-442.
65. Mercier, C., J. F. Dubremetz, B. Rauscher, L. Lecordier, L. D. Sibley and M. F. Cesbron-Delauw (2002). "Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins." Mol Biol Cell **13**(7): 2397-2409.
66. Miranda, F. J., D. B. Souza, E. Frazao-Teixeira, F. C. Oliveira, J. C. Melo, C. M. Mariano, A. P. Albernaz, E. C. Carvalho, F. C. Oliveira, W. Souza and R. A. DaMatta (2015). "Experimental infection with the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain in the Brazilian BR-1 mini pig is a suitable animal model for human toxoplasmosis." Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(1): 95-100.

67. Mondragón, R. (2014 a). "Ciclo de vida: ." Toxoplasmosis animal ISBN: 978-607-8072-89-7: 51-63.
68. Mondragón, R. (2014 b). "Migración Tisular." Toxoplasmosis animal ISBN: 978-607-8072-89-7: 111-118.
69. Montoya, J. G. and O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." Lancet 363(9425): 1965-1976.
70. Mulkerrin, M. G. and R. Wetzel (1989). "pH dependence of the reversible and irreversible thermal denaturation of gamma interferons." Biochemistry 28(16): 6556-6561.
71. Muñiz, S., M. González del C and R. Mondragón (2011). "Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole." Journal of biomedicine & biotechnology: 11.
72. Muñiz, S. and R. Mondragón (2009). "*Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente." Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)- IPN (México, DF.).
73. Nathan, C., H. Murray, M. Wiebe and B. Rubin (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." J Exp Med. 158(3): 670-689.
74. Ninghan, Y., F. Andrew, N. Wendy, M. Mariane, L. Diana, L. J., G. T., G. Marc-Jan and P. Jeroen (2013). "Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains." BMC Genomics 14: 467-486.
75. Nusbaum, P., C. Laine, S. Seveau, P. Lesavre and L. Halbwachs (2004). "Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization." Biochem Soc Trans 32(Pt3): 477-479.
76. 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.
77. Paludan, S. R. (1998). "Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship." Scand J Immunol 48(5): 459-468.
78. Patron, S. A., M. Mondragon, S. Gonzalez, J. R. Ambrosio, B. A. Guerrero and R. Mondragon (2005). "Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites." Int J Parasitol 35(8): 883-894.
79. Pfefferkorn, E. R. (1984). "Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan." Proc Natl Acad Sci U S A 81(3): 908-912.

80. Pfefferkorn, E. R., S. Rebhun and M. Eckel (1986). "Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts." J Interferon Res **6**(3): 267-279.
81. Popiel, I., M. C. Gold and K. S. Booth (1996). "Quantification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites." J Parasitol **82**(2): 330-332.
82. Ramakrishnan, S., M. D. Docampo, F. M. Pujol, C. F. Brooks, G. Vandooren, J. K. Hiltunen, A. J. Kastaniotis, M. J. McConville and B. Striepen (2012). "Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **287**(7): 4957-4971.
83. Ramana, C. V., M. Chatterjee-Kishore, H. Nguyen and G. R. Stark (2000). "Complex roles of Stat1 in regulating gene expression." Oncogene **19**(21): 2619-2627.
84. Rivera, N. and R. Mondragón (2010). "Cistogénesis de *Toxoplasma gondii*." REB(1): 2913-2918.
85. Rutenfranz, I. and H. Kirchner (1988). "Pharmacokinetics of recombinant murine interferon-gamma in mice." J Interferon Res **8**(5): 573-580.
86. Schmid, S. L. (1997). "Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process." Annu Rev Biochem **66**: 511-548.
87. Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-189.
88. Shuai, K., C. Schindler, V. R. Prezioso and J. E. Darnell, Jr. (1992). "Activation of transcription by IFN-g: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein." Science **258**(5089): 1808-1812.
89. Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992). "Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage." Nature **359**(6390): 82-85.
90. Sibley, L. D., J. L. Krahenbuhl, G. M. Adams and E. Weidner (1986). "*Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins." J Cell Biol **103**(3): 867-874.
91. Snapper, C. M. and W. E. Paul (1987). "Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production." Science **236**(4804): 944-947.
92. Soete, M., D. Camus and J. F. Dubremetz (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.
93. Soete, M. and J. F. Dubremetz (1996). "*Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*." Curr Top Microbiol Immunol **219**: 76-80.
94. Su, C., D. Evans, R. H. Cole, J. C. Kissinger, J. W. Ajioka and L. D. Sibley (2003). "Recent expansion of *Toxoplasma gondii* through enhanced oral transmission." Science. **299**: 414-416.

95. Sullivan, W. and V. Jeffers (2012). "Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency." FEMS Microbiol Rev **36**(3): 717-733.
96. Suzuki Y, Claflin J, Wang X and K. T. Lengi A (2005). "Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol. **(1)**: 83-90.
97. Suzuki, Y., Q. Sa, M. Gehman and E. Ochiai (2011). "Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain." Expert Rev Mol Med **13**: 31.
98. Taylor, W. and G. Feng (1991). "Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." FASEB **5**(11): 2516-2522.
99. Tenter, A. M., A. R. Heckerroth and L. M. Weiss (2000). "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans." Int J Parasitol **30**(12-13): 1217-1258.
100. Trent, J. M., S. Olson and R. M. Lawn (1982). "Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(24): 7809-7813.
101. Trinchieri, G. and B. Perussia (1985). "Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects." Immunol Today **6**(4): 131-136.
102. Van-Loon, A., L. Ozmen, M. Fountoulakis, K. Malgosia, M. Haiker and G. Garotta (1991). "High-Affinity Receptor for Interferon-Gamma (IFN-g), a Ubiquitous Protein Occurring in Different Molecular Forms on Human Cells: Blood Monocytes and Eleven Different Cell Lines Have the Same IFN-g Receptor Protein " Journal of Leukocyte Biology **49**: 462-473
103. Watling, D., D. Guschin, M. Muller, O. Silvennoinen, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, N. C. Rogers, C. Schindler, G. R. Stark, J. N. Ihle and *et al.* (1993). "Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway." Nature **366**(6451): 166-170.
104. Weiss, L. M. and K. Kim (2000). "The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*." Front Biosci **5**: D391-405.
105. Weiss, L. M., D. Laplace, P. M. Takvorian, H. B. Tanowitz, A. Cali and M. Wittner (1995). "A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites." J Eukaryot Microbiol **42**(2): 150-157.
106. White, M. W., J. R. Radke and J. B. Radke (2014). "Toxoplasma development - turn the switch on or off?" Cell Microbiol **16**(4): 466-472.
107. Wong, S. Y. and J. S. Remington (1993). "Biology of *Toxoplasma gondii*." AIDS **7**(3): 299-316.
108. Youngner, J. S. and S. B. Salvin (1973). "Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity." J Immunol **111**(6): 1914-1922.

109. Zadeh, A., T. Bamedi, S. Etemadi, M. Shahrakipour, K. Saryazdipour and M. Ebrahimi (2014). "Toxoplasmosis as a complication of transfusion in hemodialysis patients." Iran J Ped Hematol Oncol **4**(1): 22-25.
110. Zhang, Y. W., K. Kim, Y. F. Ma, M. Wittner, H. B. Tanowitz and L. M. Weiss (1999). "Disruption of the *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific gene BAG1 decreases in vivo cyst formation." Mol Microbiol **31**(2): 691-701.
111. (2015) "Uniprot." Uniprot.