

Toxoplasmosis Humana

GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz. PhD.
MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo. PhD.

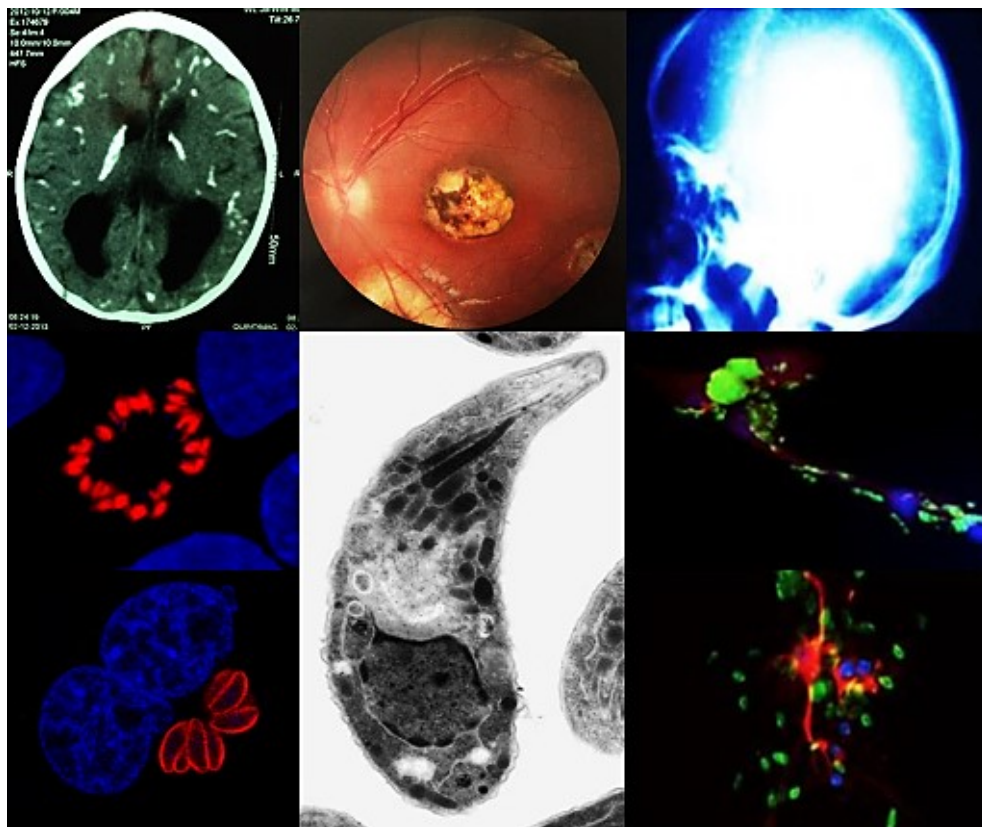
ECORFAN®

Toxoplasmosis Humana

Primera Edición

Galván-Ramírez, María de la Luz. PhD.
Mondragón-Flores, Ricardo. PhD.

Universidad de Guadalajara
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN



ECORFAN-México, S.C.

Toxoplasmosis Humana

Autores

GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz. PhD.
MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo. PhD.

Diseñador de Edición

VILCHIS-CONTRERAS, Efren. BsC.

Producción Tipográfica

TREJO-RAMOS, Iván. BsC.

Producción WEB

ESCAMILLA-BOUCHAN, Imelda. PhD.

Producción Digital

LUNA-SOTO, Vladimir. PhD.

Editora en Jefe

RAMOS-ESCAMILLA, María. PhD.

Ninguna parte de este escrito amparado por la Ley de Derechos de Autor, podrá ser reproducida, transmitida o utilizada en cualquier forma o medio, ya sea gráfico, electrónico o mecánico, incluyendo, pero sin limitarse a lo siguiente: Citas en artículos y comentarios bibliográficos, de compilación de datos periodísticos radiofónicos o electrónicos. Visite nuestro sitio WEB en: www.ecorfan.org

ISBN: 978-607-8324-30-2

Sello Editorial ECORFAN: 607-8324

Número de Control B: 2017-03

Clasificación B (2017): 200717-0103

A los efectos de los artículos 13, 162,163 fracción I, 164 fracción I, 168, 169,209, y otra fracción aplicable III de la Ley del Derecho de Autor.

Agradecimientos de GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz

A mis hijos Jesús Armando y Elizabeth por su comprensión y paciencia, para llegar al final de las metas trazadas, así mismo dedico a ellos y a mis nietos el esfuerzo que a mí correspondió por la realización de esta obra.

A todos los coautores por aceptar participar en los capítulos, los cuales enriquecieron ampliamente esta obra.

A la Dra. Rosa María Bernal Redondo por su entusiasta participación en la realización del prólogo de esta obra.

A la Dra. Carmen Oliver Romo, por la donación y selección de imágenes de casos clínicos de toxoplasmosis ocular.

Al Dr. Ramón Franco Topéte. Por la selección y donación de imágenes de casos clínicos de autopsias de pacientes con toxoplasmosis.

Al Dr. En Cs. Gustavo Salas. Por la donación de imágenes de *Toxoplasma* obtenidas en su laboratorio.

Expreso mi sincero aprecio y agradecimiento a todos los que han contribuido en el pasado y en el presente, para hacer posible la realización de esta obra.

Agradecimientos de MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo

Dedico con todo cariño la presente obra a la familia Mondragón González (Ricardo, Sirenia Lizbeth y Víctor Augusto) así como a mi esposa Sirenia y agradezco su gran apoyo moral durante el desarrollo de este libro.

Agradezco a la QFB Sirenia González Pozos por su muy valioso apoyo como experta en microscopía electrónica en los Laboratorios de Servicios Experimentales (LANSE) del CINVESTAV para la obtención de las imágenes incluidas en los capítulos: 2, 5, 6, 7 y 8.

Agradezco a mis estudiantes de doctorado que contribuyeron con gran compromiso y profesionalismo en la investigación bibliográfica de los diferentes capítulos referentes a la biología celular de *Toxoplasma*.

| Contenido | Pág. |
|--|-------------|
| Prólogo | 1 |
| Introducción | 2 |
| 1 Historia de la toxoplasmosis | 3 |
| 2 Morfología celular | 11 |
| 3 Ciclo de vida | 24 |
| 4 Química y metabolismo | 37 |
| 5 Citoesqueleto y motilidad | 49 |
| 6 Organelos de secreción e invasión celular | 68 |
| 7 Diseminación tisular | 90 |
| 8 Cistogénesis | 102 |
| 9 Respuesta inmune a la infección por <i>Toxoplasma gondii</i> | 117 |
| 10 Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis humana | 139 |
| 11 Patogenia y anatomía patológica | 163 |
| 12 Diagnóstico por métodos directos, inmunológicos y moleculares | 176 |
| 13 Tratamiento | 199 |
| 14 Epidemiología | 213 |
| Apéndice A. Consejo Editor ECORFAN | 227-229 |
| Apéndice B. Comité Arbitral ECORFAN | 230 |

Prólogo

En pleno siglo XXI, las enfermedades parasitarias ocupan los primeros lugares como problema de salud pública y en algunos países como causa de muerte; los esfuerzos por erradicarlas se han cumplido parcialmente, éstas prevalecen de manera importante en nuestras sociedades.

Los adelantos tecnológicos del siglo XX facilitaron ingresar a las filas de los agentes patógenos de enfermedades parasitarias a un buen número de protozoarios y helmintos, no conocidos en el siglo XIX. Dentro de los protozoarios se encuentra *Toxoplasma gondii*, Aplicomplexa-coccidia. Como en una película de largo metraje, la identificación, clasificación taxonómica, mecanismos de transmisión, patogenia, clínica y tratamiento se ha dado de 1908 a la fecha, en un siglo de investigaciones y reportes. *T. gondii* cierra con 108 años de conocimientos con su ubicación como un parásito emergente.

Por la importancia que ha cobrado en el mundo la atención por *T. gondii*, del gran número de trabajos publicados y de investigadores que han escogido a este protozoa como modelo de estudio, era necesario una monografía que nos diera, en un solo libro, la revisión de autores internacionales y en forma importante las contribuciones que sobre toxoplasmosis realizan investigadores nacionales.

La complejidad en el ciclo de vida de este parásito, la interacción con la diversidad de células huéspedes, las incógnitas en la relación huésped- parásito, las dificultades en el diagnóstico y la experimentación de tratamientos, permite hacer de *T. gondii* un modelo de estudio y un reto.

A nivel mundial se han logrado grandes avances en el conocimiento de *T. gondii* y de la toxoplasmosis. Sin embargo, son pocos los investigadores de nuestro país que se interesan en este parásito. Este libro Toxoplasmosis Humana: Generalidades y avances durante el siglo XXI, es el primero que reúne el trabajo científico de varios profesores mexicanos y extranjeros, sobre *T. gondii* y la toxoplasmosis. El nombre y las publicaciones de los autores presentan a la comunidad científica la calidad del texto publicado y además en este modelo de parásito intracelular.

Ojalá que este libro que muestra gran parte de la investigación nacional en toxoplasmosis motive a muchos otros grupos de trabajo a interesarse en este protozoario y sea el inicio de la integración de otros silenciosos biólogos, médicos, químicos, epidemiólogos e inmunólogos para que den a conocer sus trabajos sobre *T. gondii*.

BERNAL-REDONDO, Rosa María

Introducción

El presente libro tiene la intención de mostrar conocimientos actualizados del protozooario intracelular *Toxoplasma gondii*, mediante una revisión de los acontecimientos científicos, ya que, en las últimas dos décadas, se dieron a conocer adelantos muy importantes, los cuales aportaron quizá más del conocimiento generado durante los primeros ochenta años desde su descubrimiento en 1908.

Desde las últimas tres décadas del siglo XX, mediante estudios de bioquímica y de biología celular existieron grandes avances a nivel internacional sobre el conocimiento de la biología de *Toxoplasma gondii*. A pesar de conocerse los grandes daños en Sistema Nervioso Central por encefalitis en las formas congénitas de toxoplasmosis, al surgir el SIDA aumento de manera importante el número de casos por encefalitis toxoplasmaica que lleva a la muerte a estos pacientes considerándose uno de los principales oportunistas, este hecho aceleró la producción de nuevas investigaciones sobre los mecanismos de la respuesta de inmunidad celular y la generación de fármacos y combinaciones de estos. Los avances en el campo del diagnóstico también han sido exitosos, aportando nuevos métodos de diagnóstico. La biología del diagnóstico ha llevado al conocimiento del genoma de *T. gondii*, esto también ha aportado una herramienta mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa y otras variantes.

Las aportaciones científicas a nivel internacional y la experiencia de los autores y coautores en diversas investigaciones básicas y clínicas sobre toxoplasmosis y su agente causal, permiten la actualización de profesionales como son: Biólogos, Parasitólogos, Químicos Fármaco biólogos, Médicos generales así como de los especialistas en Infectología, Pediatría, Oftalmología y Gineco-Obstetricia quienes en su trabajo diario tienen la misión de diagnosticar y tratar pacientes con diversas formas de toxoplasmosis.

BERNAL-REDONDO, Rosa María

1 Historia de la toxoplasmosis

GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz

Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

1 Resumen

Toxoplasma gondii un parásito descubierto hace 109 años. En este capítulo se describen los acontecimientos más importantes que han marcado la historia de este parásito, desde su descubrimiento hasta los avances más importantes como son: el ciclo de vida, su reproducción sexual que da lugar a los ooquistes y asexual de donde surgen los taquizoítos y quistes. Los mecanismos de transmisión que utiliza para penetrar a la célula huésped. Los mecanismos de transmisión congénita y adquirida. Los primeros casos clínicos que se dieron a conocer y donde se observó la capacidad de daño que *Toxoplasma gondii* causa a sus huéspedes intermediarios “el ser Humano” tanto a nivel ocular como en el Sistema Nervioso Central. El daño que causa en recién nacidos y pacientes con inmunosupresión. El estudio de proteínas específicas como marcadores de diagnóstico. El descubrimiento del genoma de este parásito que ha dado lugar a una gran cantidad de conocimiento para su estudio y diagnóstico como son la genotipificación de cepas tipo I II y III, las cuales tienen una distribución diferente a nivel mundial y su patogenicidad también es diferente.

En 1908, Charles Nicolle y Manceaux, aislaron al parásito *Toxoplasma gondii* de un roedor llamado *Ctenodactylus gondii*^{1,2,3} en ese mismo año Splendore detectó la presencia de *T. gondii*² en un conejo en su laboratorio de São Paulo en Brasil², Mello en 1910 describió la enfermedad por primera vez en un perro³.

En 1923 Janku encontró el parásito en el ojo humano mediante necropsia en un niño con hidrocefalia⁴, Wolf y Cowen en 1923 documentaron por vez primera el mecanismo de transmisión congénita en humanos⁵. En 1940 Pinkerton y Weinman reportaron los primeros casos mortales por toxoplasmosis en adultos⁶. En 1948 Sabin y Feldman desarrollan la prueba de “Colorante de azul de metileno”⁷ y en 1954 Weinman y Chaulder sugirieron que la transmisión ocurre por la ingestión de carne mal cocida⁸; Sin embargo, en 1959 Rawal demostró que la seroprevalencia a *T. gondii* en vegetarianos⁹ es semejante a la de poblaciones no vegetarianas.

Posteriormente Jacobs y Cols., en 1960 caracterizaron los quistes en tejidos animales demostrando resistencia a enzimas proteolíticas y una supervivencia por largos periodos en el hospedero¹⁰. En 1965 Desmonts y cols., demostraron el aumento de seroprevalencia del 10 al 50% en una población, y 100% posteriormente después de ingerir carne mal cocida¹¹. Kean en 1969 describió un cuadro de toxoplasmosis en estudiantes que ingerían carne cruda¹² y Wallance y Cols., en 1972 demostraron en una población parisina un 80% de seroprevalencia a *T. gondii*, lo cual se asoció con la costumbre de consumir carne cruda o mal cocida entre los jóvenes y adultos¹³.

Hutchinson en 1965 describió por vez primera la existencia de ooquistes de *T. gondii* en las heces de gatos, reconociendo una transmisión fecal¹⁴. Fue hasta en 1970 que Frenkel describió el ciclo de vida de *T. gondii* que incluye la fase de reproducción sexual en el intestino delgado del gato, mediante gametogonia¹⁵. En 1972 Dubey y Frenkel describieron y caracterizaron biológica y morfológicamente 5 formas de diferenciación de *T. gondii* en el epitelio intestinal del gato¹⁶ y en 1973 Frenkel utilizó el término bradizoíto para definir al organismo que se multiplica en quistes tisulares¹⁷. Marshall en 1957, Beverley en 1961, Dubey 1986 y 1990, Dubey y Beattie 1988 publicaron que la toxoplasmosis animal es la causa de aborto y muerte neonatal en cerdos y cabras^{18, 19, 20, 21, 22}.

En 1960 se desarrollaron pruebas serológicas apropiadas para la detección de la infección en mujeres embarazadas que ayudaron a prevenir la transmisión de la infección congénita, se desarrollaron pruebas diagnósticas para toxoplasmosis asintomática aguda y en infección crónica, las cuales estuvieron basadas en la inmunidad humoral mediante la detección de anticuerpos IgM, en la respuesta primaria y de IgG en respuesta a una toxoplasmosis crónica o pasada^{23, 24}. En 1976 Ruskin y Remington describieron casos de encefalitis en personas inmunocomprometidas con cáncer y trasplantados²⁵.

En 1983 Johnson demostró experimentalmente que ciertos antígenos de *Toxoplasma* conferían protección mediante transferencia pasiva de la inmunidad²⁶, hecho que fue respaldado por Sharma en 1984 al utilizar anticuerpos monoclonales contra los antígenos de 35 y 14 kDa²⁷. Araujo y Remington en el mismo año utilizando antígenos de 54 y 28 kDa²⁸. Nichols y cols en 1983 reportaron antígenos de excreción y secreción de *T. gondii* procedentes de organelos secretores de taquizoítos como: Roptría, micronemos y gránulos densos algunos de cuyos componentes son altamente inmunogénicos y son secretados intra y extracelularmente por el parásito²⁹. Sadak en 1986 llevó a cabo la caracterización molecular y funcional de proteínas contenidas en el organelo apical de *T. gondii*³⁰.

Vollmer en 1987 reportó que las células T cooperadoras facilitan la muerte del parásito por macrófagos, en donde el interferón gamma cumple un papel preponderante al activar a células citotóxicas. Mediante la administración de anticuerpos monoclonales anti-CD4 en ratones crónicamente infectados, se observó una disminución de células T, disminución de quistes, y una limitada proliferación de los taquizoítos³¹. En 1989 Luft demostró un incremento de los cuadros de encefalitis por *Toxoplasma* en pacientes con SIDA, la cual sucedía después de la disminución de CD4+. Por este hecho, *T. gondii* fue considerado dentro del grupo de **patógenos oportunistas**³².

Durante el periodo de 1970 a 1992 se llevaron a cabo numerosas investigaciones sobre aspectos bioquímicos de *T. gondii* donde resalta la caracterización de la molécula de Glycosilfosfatoinsitol (GPI) que juega un papel importante en el anclaje de proteínas de membrana del taquizoíto³³.

En relación a los mecanismos de invasión del parásito, Werk (1985) reportó el mecanismo de penetración de *T. gondii* a la célula hospedera³⁴; Sibley y Kranhenbulhl en 1988³⁵, Cesbron en 1989³⁶ y Charif en 1990³⁷, demostraron que los componentes de los gránulos densos (conocidos como proteínas GRA) se detectan en forma soluble en el espacio intravacuolar así como proteínas transmembranales tanto en la membrana de la vacuola parasitófora (VP) como en la membranas de la red vesículo-tubular intravacuolar. La presencia de estas proteínas GRA se relacionó con la maduración de la VP y en el comportamiento funcional metabólico del taquizoíto³⁷. Achbarau en 1991 demostró que tres proteínas de micronemos posiblemente están involucradas en el reconocimiento y unión a la célula hospedero³⁸. Leriche y Dubremetz en 1990 y 1991 caracterizaron a las proteínas de las roptría (Proteínas ROP)^{39,40}.

Saffer y Schwartzman 1991 demostraron la participación de la fosfolipasa A2 (PLA2) en la invasión celular y que posiblemente actúa de manera conjunta con la secreción de la proteína ROP1 de las roptría^{41,42}.

Mediante el análisis molecular, Osorio 1991 describió el genoma de *T. gondii*⁴³, y se identificaron genes involucrados en importantes funciones bioquímicas y biológicas^{36,44-48}.

En los años 80's, Jonhson, Sharma, Araujo y Remington determinaron que los antígenos de 14, 28, 35 y 54 kDa de *T. gondii* conferirían inmunidad pasiva, adicionalmente mediante el uso de anticuerpos monoclonales se realizó su localización topográfica en el taquizoíto^{26,28,49}. En 1991 Saavedra y cols., reportaron una proteína de 54 kDa que confirió inmunidad contra los tres estadios de *T. gondii* proponiéndose su uso para el desarrollo de una vacuna para la toxoplasmosis humana⁵⁰.

En 1994 Mondragón y Frixione describieron el papel de los cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ en la motilidad de *T. gondii*, y en 1995 la importancia de la extrusión del conoide en el proceso de invasividad caracterizando el papel de calcio intracelular como el disparador de dicho proceso dinámico^{51,52}. Adicionalmente esclarecieron las rutas de señalamiento involucradas en la extrusión del conoide⁵³

De 1997 a la fecha se ha visto un gran avance mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa respecto al diagnóstico, con la demostración de la presencia de DNA de *T. gondii*, sin embargo, hace falta aún consolidar la correlación entre las manifestaciones clínicas de los pacientes con los resultados positivos de esta prueba^{54,55}.

Toxoplasma gondii posee un genoma de 61, 6 megabases y 592 cM, constituido en unidades genéticas de 104 kb/cM y 14 cromosomas. El genoma es haploide para la mayoría de los estadios, excepto por una breve fase diploide en el intestino del gato antes de la meiosis⁵⁶⁻⁵⁷

Los avances científicos del siglo XX y XXI nos han permitido conocer más sobre el *Toxoplasma gondii* y la toxoplasmosis, sin embargo, aún existen grandes interrogantes que, mediante la inmunología, genética y biología molecular y la proteómica, nos ayudarán a obtener mayores conocimientos de la relación hospedero-parásito.

1.1 Referencias

1. Nichole C. & Manceaux. Sur une infection á corpus de Leishman (ous organisme voisins) Du Gondii. C.R. Acad. Dci. (Paris).1908, 147:763-766.
2. Splendore A. Un nuovo protozoo parasita del conigli. Rev. Soc. Sci. (Sao Paulo) 1908, 3:109-112.
3. Mello U. Un cas de toxoplasmosse de chien observé a Turin. Bull Soc. Path. Exot. 1910, 3:359-363.
4. Janku J. Pathogenesa a pothologicka anatomie tak nazvaného vrozeného koloboomu zluté skvmy v oku normalne velikem a mikrophtalmickém nalazemparsitu v sitnici. Casopis Lekaruv 1923, 62:1021-1027.
5. Wolf A. Human toxoplasmosis occurrence in infants as an encephalomyelitis. Verification by transmission to animals. Science. 1929, 89:226-227.
6. Pinkerton H. & Weinman D. Toxoplasmosis infection in man. Arch. Pth. 1940, 30:374-392.
7. Sabin AB. & Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science.1948, 108:660-663.
8. Weinman D y Chandler. AH. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. Proc. Soc. Exper. Biol. Med.1954, 87:211-216.
9. Rawal BD. Toxoplasmosis. A dye test survey on sera from vegetarians in meat eaters in Bombay. Tyr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1957, 53:61-63.
10. Jacobs L., Remington JS. & Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 1960, 11:21.
11. Desmots G., Courver J., Allinson F., Baudelto J; Gebreaux Y. & Lelong M. Étude épidémiologique sur la toxoplasmosse; de l'influence de la emission desviandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. Rev. Franc. Clin. Biol. 1965, 22:11-12.
12. Kean BH, Kimball AG. & Christenson WN. An epidemic of acute toxoplasmosis. JAMA 1969, 208:1002-1004.
13. Wallace GD., Marshall L. & Marshall M. Cats, rats, and toxoplasmosis on a small Pacific island. Am. J. Epidemiol. 1972, 95:475-482.
14. Hutchinson WN. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature. 1965, 106:961-962.
15. Frenkel JK. , Dubey JP. & Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as Coccidian Oocysts. Science. 1970,167:893-896.

16. Dubey JP. , Miller N. & Frenkel JK. Characterization of the fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1970, 56:447-456.
17. Frenkel JK. Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology. In: The Coccidia. Edited by Hammond DM. Long. PL. Baltimore University Park Press. 1973, 343-410.
18. Marshall SC. & Pillenger R. The concentration of antigen for the complement fixation test for toxoplasmosis. *J. Clin. Path.* 1956, 9:76-77.
19. Beverley JK. , Watson WA. & Payne JM. The pathology of the placenta in ovine abortion due to toxoplasmosis. *Vet. Rec.* 1971, 88:124-128.
20. Dubey JP., Murrell KD., Fayer R. & Schad GA. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J. Am. Met. Med. Assoc.* 1986, 188:1035-1035.
21. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol* 1998, 28:1019-1024.
22. Dubey JP. & Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press. Inc., Boca raton, Fl.1988.
23. Garin JP., Ambroise TP., Cornet AM., Dien-Truong T. & Despeinges J. Interet de la fluorecence et de l'innmofluorecence dans le diagnostic Parasitologique et serologique de la Toxoplasmosis. *Revue de l' Institut Pasteur de Lyon.* 1967, 68:179-205.
24. Voller A., Bidwell DE. , Balett A., Fleck DG. , Perkins M., & Oladehin B. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J. Clin. Pathol.* 1976, 29:150-153.
25. Ruskin J. & Remington JS. Toxoplasmosis in the compromise host. *Ann Intern. Med.* 1976, 84:193-199.
26. Johnson AM., Llana S., McDonald PJ. & Asai T. Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the nucleoside triphosphhate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *Gene.* 1989, 85:215-220.
27. Sharma SD., Araujo FG. & Remington JS. *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody proteins mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1984, 133; 2818-2820.
28. Araujo FG. & Remington JS. Partially purified antigen preparations of *Toxoplasma gondii* protect against lethal infection in mice. *Infec. Immun.* 1984, 45:122-126.
29. Nichols BA., Chiappino ML. & O'Connor GR. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 1983, 83:85-98.
30. Sadak A., Taghy Z., Fortier B. & Dubremetz JF. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* . *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988, 29:203-211.
31. Vollmer TL. Depletion of T4 lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system; a model of superinfection in AIDS. *J. Immunol.* 1987, 138: 3737-3741.

32. Luft BJ. *Toxoplasma gondii* , in “Parasitic Infections in the compromised host” In Parasitic Infections in the Compromised Host. P.D. Walzer and R.M. Genta Eds, Marcel Dekker, New York.1989.
33. Mcleod R., Mack D. & Brown C. *Toxoplasma gondii* - new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* 1991, 72:109-121.
34. Werk R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cell? *Rev. Infect. Dis.* 1985, 7:449-457.
35. Sibley LD. & Krahenbuhl JL. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. *Eur. J. Cell Biol.* 1988; 47:81-87.
36. Cesbron-Delauw MF., Guy B., Torpier G., Pierce RJ., Lenzen G., Cesbron JY., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq JP., ET AL. Molecular characterization of 23 kilodalton mayor antigen secreted by *Toxoplasma gondii* . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989, 86:7537-41.
37. Charif H., Darcy F., Torpier G., Cesbron-Delauw MF. & Capron A. *Toxoplasma gondii* : Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 1990, 71:114-124.
38. Achbarou A., Mercerau-Puijalon O., Sadak A., ET AL. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorus vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 1991, 103:21-329.
39. Leriche MA. & Dubremetz JF. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorus vacuole after host cell invasion. *Parasite Res.* 1990, 76:559-562.
40. Leriche MA. & Dubremetz JF. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem, Parasitol.*1991, 45:249-260.
41. Saffer LD. & Schwartzman JD. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J. Protozool* 1991, 38:454-460.
42. Schwartzman JD. & Boothroyd JC. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 50:1-16.
43. Ossorio PN, Sibley LD, Boothroyd JC. A Mitochondrial-like DNA sequences flanked by direct and inverted repeats in the nuclear genome of *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 1991, 222:525-36.
44. Nagel SD. & Boothroyd JC. The mayor surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:5569-5574.
45. Burg JL., Perelman D., Kasper LH. , Ware PL. & Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene coding the mayor surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1988,141:3584-91.
46. Johnson AM., Dubey JP. & Dame JB. Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1986, 64:351-355.

47. Johnson AM., McDonald PJ. & Enoh SH. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protects mice from toxoplasmosis. *J. Protozool.* 1983, 30:351-356.
48. Price JB., Auer KL. , Huskinson J., Parmley SF., Araujo FG. & Remington JS. Cloning of cDNAs encoding expression, and cDNA sequence of surface antigen from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990, 43:97-106.
49. Sharma SD., Hofflin JM. & Remington JS. *In vivo* recombinant interleukin-2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1985,135:4160-4163.
50. Saavedra R., De Meuter F., Decourt JL. & Herion P. Human T-cell clone identifies a potentially protective 54 kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 1991, 147:1975-1982.
51. Mondragon R. & Frixione E. Divalent cation and ATP dependent motility of *Toxoplasma gondii* tachyzoites after mild treatment with trypsin. *J. Euk. Microbiol.* 1994, 41:330-337.
52. Mondragon R. & Frixione E. Ca-Dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Euk. Microbiol.* 1996, 43:120-127.
53. González M. Mondragón M. González S. and Mondragón R. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 2009, 11:967-982.
54. Cazenave J., Besieres MH., Sourrue D., Cheyrou A. & Begueret J. Detection de *Toxoplasme* par amplication d'ADN. *Rev. Fr. Lab.* 1990, 209:118-126.
55. Cazenave J., Forester F., Besieres MH., Broussin B. & Bergueret J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat. Diagn.* 1992,12:119-127.
56. Khan AS, Taylor CS. ET AL. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucl. Acids Res.* 2005, 33: 2980-2992. <http://toxomap.wustl.edu/>

2 Morfología celular

GÓMEZ-DE LEÓN, Carmen T. & MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo

Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, CDMX

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

2 Resumen

Toxoplasma muestra diversas formas celulares de diferenciación dependiendo de la etapa de su ciclo celular, mismas que tienen importancia desde el punto de vista de transmisión de la enfermedad y de los mecanismos de invasión por este organismo. En este capítulo estudiaremos las diferencias morfológicas que presenta cada estadio del parásito; para lo cual podemos entender dichas diferencias como una forma adaptativa debido a los diferentes ambientes a los que se encuentran expuestas; ya que se enfrenta a diferentes respuestas del sistema inmune dependiendo de si se encuentra en un hospedero definitivo o intermediario, así como la especie específica dentro de la cual se está alojando, las barreras que debe atravesar, etc., por lo cual no es de extrañarse que existan cambios morfológicos tanto en los parásitos como en su nicho intracelular, incluso entre los estadios de alta proliferación (taquizoítos) y baja proliferación (bradizoítos). Además, la capacidad que tiene el parásito para diferenciarse de un estadio a otro rápidamente y de manera reversible, causa un gran interés en el estudio de los mecanismos involucrados en este proceso que involucra tanto la expresión diferencial de proteínas, la remodelación de algunas estructuras específicas de cada estadio y la organización de algunos organelos.

Toxoplasma gondii es un protozooario intracelular obligado que se encuentra ubicado en el filo Apicomplexa, clase Esporozoa y Subclase Coccidia ¹. Algunos miembros del mismo orden incluyen *Isospora*, *Eimeria*, *Neospora* y *Sarcocystis*. *T. gondii* es la única especie del género *Toxoplasma*. El nombre del género se deriva de *taxón*, palabra griega que significa arco, y se refiere a la forma de media luna del taquizoíto extracelular cuando aparece *in vitro*. El nombre de la especie deriva del roedor *Ctenodactylus gondii*, del cual se aisló por primera vez.

Toxoplasma muestra diversas formas celulares de diferenciación dependiendo de la etapa de su ciclo celular, tales formas son: 1) Ooquistes 2) Taquizoíto 3) Bradizoíto 4) Esporozoíto y 5) Quiste tisular, mismas que tienen importancia desde el punto de vista de transmisión de la enfermedad y de los mecanismos de invasión por este organismo.

2.1 Ooquiste

Esta forma parasitaria, es el estado clave en la epidemiología de *Toxoplasma gondii*. Los ooquistes esporulados tienen una forma ovoide y miden aproximadamente de 10 a 12 μm . Estas son liberadas en las heces de los gatos al medio ambiente como ooquistes inmaduros no esporulados. Su maduración o esporulación produce ooquistes con 8 esporozoítos infecciosos¹. Los ooquistes pueden permanecer viables hasta por 18 meses dependiendo de las condiciones de humedad presentes²⁻⁶.

Los ooquistes están rodeados por un fino velo electrolúcido reticulado debajo electrodensa externa, una electrolúcida y una interna moderadamente electrodensa¹. Otros estudios han propuesto la existencia de 5 capas en la pared ooquistica, sin embargo, esto parece estar determinado por el estadio de maduración del ooquiste²⁻⁴.

Adicionalmente hay un micropilo localizado en la superficie de la pared. Esta es una depresión discoide constituida por tres capas, cada una de las cuales es continua con las tres capas del resto de la pared del ooquiste. Las capas externa e interna son delgadas mientras que la parte media es gruesa y tiene forma de copa.

Las funciones biológicas del micropilo son desconocidas, se ha observado que en la exquistación que es el rompimiento del ooquiste por efecto de las enzimas digestivas, se altera la integridad del micropilo permitiendo la liberación de las formas infecciosas^{3,4}. Se han observado estructuras similares a suturas en la superficie de los ooquistes. Durante la exquistación de *T. gondii*, se presenta una separación de la capa interna y las suturas¹. Los ooquistes se destruyen por la exposición a amoníaco (28%), a tintura concentrada de yodo (7% de yodo y 5% de yoduro de potasio) y en agua en ebullición⁴.

2.2 Taquizoítos

El taquizoíto es la forma infectiva asexual, tiene una apariencia arqueada, con un tamaño de 6 a 8 μm ⁵. El extremo anterior o apical termina en punta, mientras que el posterior es redondo (Figura 1). El parásito tiene un núcleo, una única mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, así como un apicoplasto. Adicionalmente, tiene una distribución polarizada hacia el extremo apical de varios organelos como el conoide, roptrías, gránulos densos y los micronemos, que parecen estar involucrados en los procesos de motilidad, secreción e invasión celular⁵.

Películo. Rodeando a todo el parásito está el películo, que está formado por la membrana plasmática y un conjunto de vesículas aplanadas conocidas como complejo membranal interno (CMI). Esta configuración le proporciona al parásito una corteza trimembranal que está relacionada con secreción, motilidad y evasión de la respuesta inmune⁶⁻⁹.



Figura 1 Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de un taquizoíta de *Toxoplasma gondii* (c) conoide; (r) roptrías; (g) gránulos densos; (N) núcleo; (M) mitocondria; (Mn) micronemos; Ap, apicoplasto. Escala = 1 micra.

Organelos secretores. Durante la invasión de la célula hospedera, así como durante la proliferación en una vacuola parasitófora, se secretan componentes provenientes de diversos organelos como son las roptrías, los gránulos densos y los micronemos.

Roptrías. Tienen forma de sáculos alargados que terminan en el extremo apical en un delgado ducto insertado en el límite inferior del conoide (Figura 1). El extremo anterior (cuello de las roptrías) es electrodenso, y la porción posterior o bulbo contiene componentes vesiculares^{6,10}. Se ha propuesto que el contenido de las roptrías es secretado para alterar la integridad de la membrana de la célula hospedera y facilitar la penetración celular^{11,12} (Figura 2).

Las roptrías contienen lípidos, así como proteínas denominadas RONs y ROPs, derivadas del cuello y del bulbo respectivamente¹³⁻¹⁶. Las proteínas RON son responsables del ensamblaje de la unión móvil, una unión transitoria entre las membranas plasmáticas del parásito y la célula hospedera, que es esencial en la primera etapa de la invasión activa, así como para la formación de la vacuola parasitófora (VP)¹⁷⁻¹⁹. Las proteínas ROP²⁰, participan durante la infección sobre diferentes blancos dentro de la célula hospedera²¹.

A partir de sobrenadantes de cultivos celulares infectados con *T. gondii*, se aisló un componente que se denominó factor estimulador de la penetración (PEF, penetración enhancing factor) proveniente aparentemente de las roptrías, con capacidad de lisar a la célula blanco^{12,22-24}. Se ha propuesto que ROP-1 sea el componente PEF o que ROP-1 interaccione con otras moléculas para inducir la actividad estimuladora de la penetración¹⁶, ya que anticuerpos específicos, bloquearon la acción lítica de este factor²⁵.

Aunque se conoce parcialmente la secuencia peptídica de ROP-1, no se han encontrado propiedades enzimáticas o proteolíticas de esta proteína que explique el fenómeno PEF¹⁶.

Micronemos. Son pequeñas estructuras ovoides de 30 nm de diámetro ubicadas en el extremo apical de los taquizoítos (Figura 1, Mn). Alojadas en su interior a un conjunto de proteínas adhesivas conocidas como MIC. Las proteínas MIC son secretadas por un proceso dependiente de calcio al inicio de la invasión para favorecer la adhesión y la motilidad del parásito sobre la membrana de la célula hospedera²⁶. Se han descrito al menos 20 proteínas MIC^{27,28}, que incluyen a proteínas solubles y transmembranales, que expresan diferentes dominios de adhesión. Se ha propuesto que estas proteínas son exocitadas a la superficie del parásito y translocadas por un movimiento basado en actina desde el extremo anterior hacia el posterior y eventualmente liberadas incorporadas en vesículas a través de un proceso de capping²⁹⁻³¹.

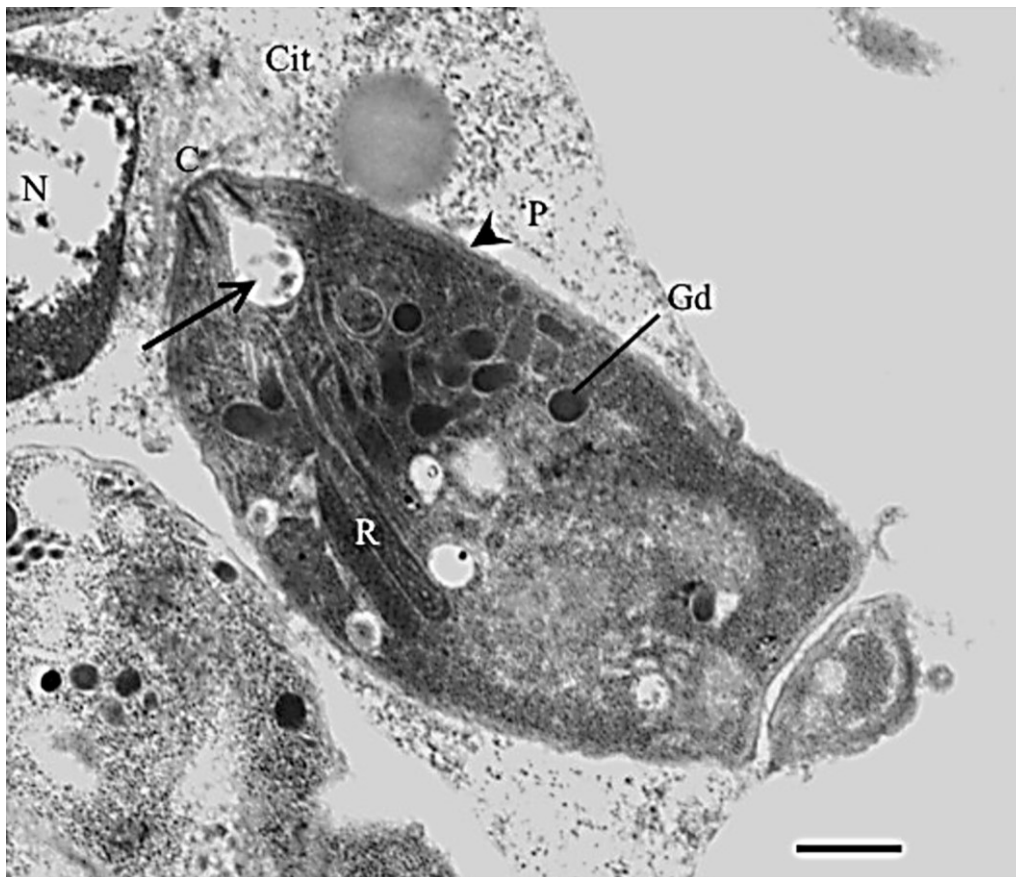


Figura 2 Micrografía de taquizoíto de *T. gondii* durante la invasión de macrófagos de ratón. En la internalización, el contenido de las roptrías es secretado quedando la vacuola vacía (flecha) pero sin perder su forma. (N) núcleo de la célula hospedera; (Cit) citoplasma de la célula hospedera; (R) roptrías; (C) conoide; (Gd) gránulos densos; (P), películo. Escala= 0.5 µm.

Gránulos densos. Son estructuras esféricas de unos 200 nm de diámetro, rodeados por una membrana única y que están ubicados por todo el cuerpo del parásito (Figura 1, Gd). Se han identificado al menos 25 proteínas de gránulos densos conocidas como GRA 1-25³²⁻³⁴. Su contenido es secretado aproximadamente veinte minutos después de la invasión³⁵, los productos liberados son usados para construir una red vesículo-tubular intravacuolar y la membrana de la vacuola parasitófora (MVP), la cual impide la fusión lisosomal, protegiendo a los parásitos de los mecanismos intracelulares de defensa³⁶⁻⁴⁰.

2.3 Apicoplasto

En varios miembros del filo Apicomplexa ha sido encontrado un organelo multimembranal conocida como “apicoplasto” (Figura 1, Ap). Es un organelo que se formó como resultado de una endosimbiosis primitiva secundaria, por la cual un eucarionte primitivo heterotrófico fue engullido y retenido en un eucarionte protosintético, resultando en un plástido con más de dos membranas⁴¹⁻⁴⁵. Tiene su propio genoma, un DNA circular de 35 kb^{42, 46}. El apicoplasto es esencial para la supervivencia del parásito, aunque sus funciones precisas se desconocen⁴⁷⁻⁵¹, codifica un limitado repertorio de proteínas⁵², que son sintetizadas en ribosomas citoplásmicos e importadas postraduccionalmente; además participa en el metabolismo de lípidos⁵³. El apicoplasto tiene 4 membranas⁴², las dos membranas internas provienen del endosimbionte primario, mientras que la tercera membrana es la membrana plasmática de un endosimbionte secundario y la membrana más externa parece estar conectada con el sistema endomembranoso del hospedero primitivo.

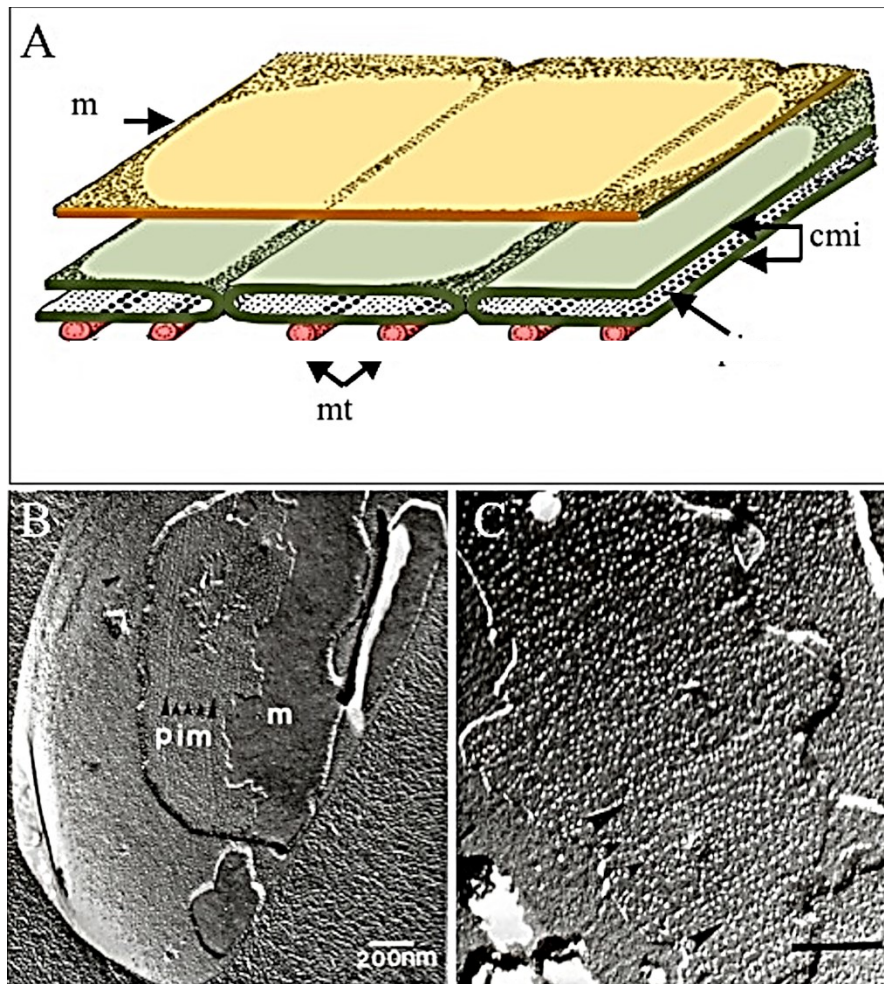


Figura 3 Estructura del películo. A) Diagrama del películo; (m) membrana plasmática; (cmi) complejo membranal interno; (mt), microtúbulos; (pim) partículas intramembranales. B y C corresponden a micrografías de replicas de criofractura del películo de *T. gondii*, arreglo doble de partículas (cabezas de flecha grandes); arreglo sencillo de partículas (cabezas de flecha chicas). Escalas= 0.2 μm .

2.4 Citoesqueleto

Toxoplasma tiene un citoesqueleto submembranal que además de definir su forma, también es esencial para motilidad, invasión celular y proliferación intracelular (Figura 3). Está constituido por el complejo apical, los microtúbulos subpeliculares, el complejo membranal interno, una red de citoesqueleto formada por filamentos entrecruzados con distribución subpelicular y el anillo polar posterior⁷. Debido a su importancia, dichas estructuras, así como su composición bioquímica y sus respectivas funciones, serán revisadas a detalle en el capítulo de citoesqueleto y motilidad.

2.5 Bradizoítos y esporozoítos

Estas dos formas del parásito son estructuralmente similares a los taquizoítos y sólo difieren en términos de ciertos organelos y de cuerpos de inclusión. Todos los zoítos poseen sistemas Golgi, RE y apicoplastos ⁴². En cuanto a micronemos, los taquizoítos tienen un bajo número de estos organelos, los esporozoítos tienen un número intermedio y los bradizoítos un alto número, así como gránulos de amilopectina. Los gránulos densos son numerosos en los esporozoítos y taquizoítos, pero limitados en los bradizoítos. Los gránulos de amilopectina son numerosos y relativamente grandes en esporozoítos y bradizoítos, pero limitados y pequeños o aún ausentes en los taquizoítos. Los tres tipos de zoítos tienen un número parecido de roptrías ¹.

2.6 Quistes tisulares

La mayoría de las infecciones por *Toxoplasma* son adquiridas después del nacimiento, ya sea por la ingestión de quistes tisulares presentes en la carne, o por ooquistes provenientes de las heces de gatos infectados ⁵⁴.

Los quistes tienen tamaños de aproximadamente 10-100 μm , y pueden contener varios miles de bradizoítos (Figura 4). Estos persisten en los tejidos del hospedero durante toda su vida. Se ha reportado que bradizoítos individuales pueden escapar de los quistes sin ruptura completa de la pared. Dichos bradizoítos pueden proceder a invadir células contiguas y con ello dar como resultado los quistes hijos comúnmente observados en ratones infectados en forma crónica ⁵⁵⁻⁵⁷.

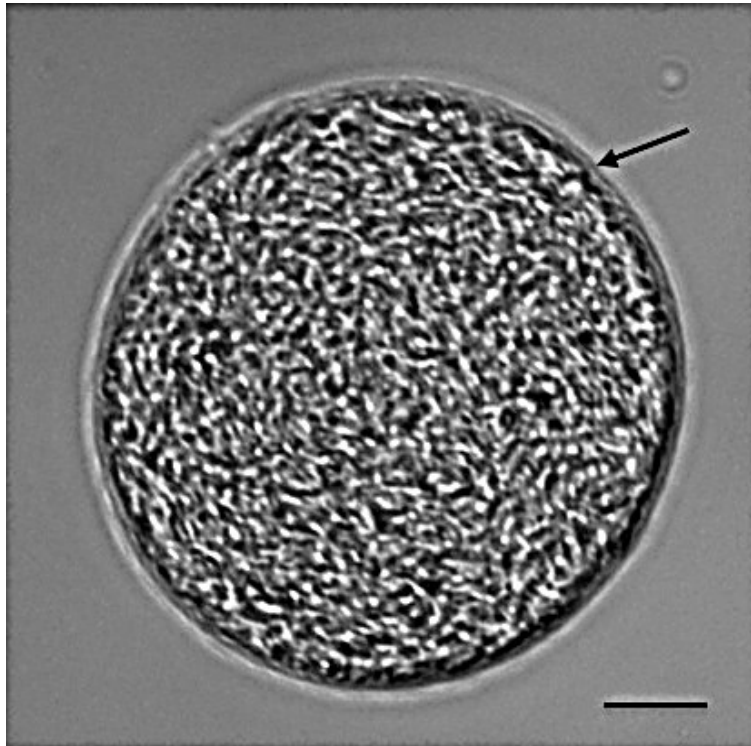


Figura 4 Quiste tisular de *Toxoplasma*, a) Contraste de fases de un quiste tisular; la pared del quiste está indicada por la flecha. Escala= 5 micras.

Los quistes tisulares pueden detectarse en animales de laboratorio desde el sexto día post-infección y son demostrables en el miocardio, músculos estriados y SNC⁶⁷⁻⁷¹. Los quistes contenidos en los tejidos pueden perder su infectividad por irradiación con rayos gamma, temperaturas mayores a 61°C o congelación-descongelación^{56,57}.

El estudio de las características bioquímicas del quiste tisular tendrá una importante repercusión en el diseño de vacunas y tratamientos farmacológicos a futuro.

2.7 Agradecimientos

La presente investigación se realizó con apoyo de la Fundación Miguel Alemán A.C. otorgado a Ricardo Mondragón Flores. Agradecemos el apoyo de la QFB Sirenia González P. de la Unidad de Microscopia LANSE-CINVESTAV.

2.8 Referencias

1. Speer, C.A., Clark, S., & Dubey, J.P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1998, 84:3 505-512.
2. Ferguson, D.J., Hutchinson, W.M. & Siim, J.C. The structural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1975, 83:491-505.
3. Ferguson, D.J., Birch-Andersen, A., Siim, J.C. & Hutchinson, W.M. An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1979, 87:277-283.
4. Chrisitie, E., Pappas, P.W. & Dubey, J.P. Ultrastructure of excystement of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozoology.* 1978, 25:438-443.
5. Kasper L.H. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infec. Immu.* 1989, 57:668-572.
6. Chobotar, B. & Schotyseck, E. Ultraestructure. In, *The Biology of the Coccidia. P.L. Long De. Univ Park Press Baltimore.* 1982, 101-165.
7. Nichols, B.A. & Chiappino, M.L. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 1987, 34:217-226.
8. Jensen, J.B. & Edgar, S.A. Effect of antiphagocytic agents on penetration of *Eimeria magna* sporozoites into cultured cells. *J. Parasitol.* 1976, 62:203-206.
9. Russell, D.G. & Sinden, R.E. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J. Cell. Sci.* 1981, 50:345.349.
10. Porchet-Hennere, E. & Nicholas, G. Are rhoptries of coccidian really extrusomes? *J. Ultrastruct. Res.* 1983, 84:194-203.

11. Nichols, B.A., Chiappino, M.L. & O'Connor, G.R. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 1983, 83:85-98.
12. Lycke, E. & Norrby, R. Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured host cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 1966, 47:248-256.
13. Besteiro S, Bertrand-Michel J, Lebrun M, Vial H, Dubremetz JF. Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites rhoptries: further insights into the role of cholesterol. *Biochem. J.* 2008, 415(1):87-96.
14. Leriche, M.A. & Dubremetz, J.F. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granule of *Toxoplasma gondii* tachyzoite by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991, 45:249-260.
15. Schwartzman, J.D. & Krug, E.C. *Toxoplasma gondii* characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. *Exp. Parasitol.* 1989, 68:74-82.
16. Ossorio, P.N., Schwartzman, J.D. & Boothroyd, J.C. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 50:1.16.
17. Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathogens.* 2005, 1(2): e17.
18. Foussard, F., Leriche, M.A. & Dubremetz, J.F. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitol.* 1991, 102:367-370.
19. Joiner, K.A., Beckers, J.M., Bermudes, D., Ossorio, P.N., Schwab, J.C. & Dubremetz, J.F. Structure and function of the parasitophorous vacuole membrane surrounding *Toxoplasma gondii*. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1995, 1-6.
20. Chang S, Shan X, Li X, Fan W, Zhang SQ, Zhang J, Jiang N, Ma D, Mao Z. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein ROP16 Mediates Partially SH-SY5Y Cells Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Directing Ser15/37 Phosphorylation of p53. *Int. J. Biol. Sci.* 2015, 11(10):1215-25.
21. Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr. Op. Microbiol.* 2007, 10(6):582-7.
22. Sadak A., Taghy Z., Fortier B. & Dubremetz J.F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988, 29:203-211.
23. Nichols B.A. & O'Connor G.R. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab. Invest.* 1981, 44: 324-335.
24. Lycke E., Carlberg R. & Remington J.S. Penetration enhancing factor extracted from *Toxoplasma gondii* which increases its virulence for mice. *J. Bacteriology.* 1968, 96: 785-78.

25. Lycke E., Carlberg R. & Norrby R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: Function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 1975, 11:853-861.
26. Schwartzman, J.D. Inhibition of penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect. Immun.* 1986, 51:760-764.
27. Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European J. Cell Biol.* 1997, 73:114-23.
28. Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini F, Jemmely N, Friedrich N, Ward GE, Soldati-Favre D. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Mol. Microbiol.* 2010, 77:912-29.
29. Li W, Liu J, Wang J, Fu Y, Nan H, Liu Q. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 2015, 114:2893-902.
30. Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *TRENDS in Cell Biology.* 2004, 14:528-532.
31. Rugarabamu G, Marq JB, Guérin A, Lebrun M, Soldati-Favre D. Distinct contribution of *Toxoplasma gondii* rhomboid proteases 4 and 5 to micronemal protein protease 1 activity during invasion. *Mol. Microbiol.* 2015; 97:244-62.
32. Achbarou, A., Mercereau-Piujalon, O., Utheman, J.M., Forter, B., Camus, D. & Dubremetz, J.F. Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991, 47:223-232.
33. Leriche, M.A. & Dubremetz, J.F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol. Res.* 1990, 76:559-562.
34. Ho-Woo Nam. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *The Korean J. Parasitol.* 2009, 47: S29-37.
35. Shastri AJ, Marino ND, Franco M, Lodoen MB, Boothroyd JC. GRA25 is a novel virulence factor of *Toxoplasma gondii* and influences the host immune response. *Infect Immun.* 2014, 82:2595-605.
36. Chaturvedi S, Qi H, Coleman D, Rodriguez A, Hanson PI, Striepen B, Roos DS, Joiner KA. Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J. Biol. Chem.* 1999, 274:2424-31.
37. Magno RC, Lemgruber L, Vommaro RC, De Souza W, Attias M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* 2005, 67:45-52.
38. Magno RC, Straker LC, De Souza W, Attias M. Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc. Microanal.* . 2005, 11:166-74.

39. Jones, T.C. & Hirsch, J.G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* 1972, 136:1173-1182.
40. Sibley, L.D., Weidner, E. & Krahenbuhl, J.L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 1985, 315:416-419.
41. Sibley, L.D. & Krahenbuhl, J.L. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. *Eur. J. Cell. Biol.* 1988, 47:81-87.
42. MC Fadden, G. I., Reith, M. E. Mulholland, J. and Lang-Unnasch, N. Plastid in human parasites. *Nature.* 1996, 381:482.
43. Kohler, S.C.F., Delwiche, P.W., Denny, L.G., Tilney, S., Webster, R.J., Wilson, J.D., Palmer, J. & Roos, D.S. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science.* 1997, 275: 1485-1489.
44. Lang-Unnasch, N., Reith, M.E. Munholland, J. & Barta, J.R. Plastids are widespread and ancient in parasites of the phylum Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 1998, 28:1743-1754.
45. Waller, R.F., Keeling, P.J., Donald, R.G., Striepen, B., Handman, E. Lang-Unnasch, N., Cowman, A.F., Besra, G.S., Roos, D.S., & MC Fadden, G. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1998, 95:12352-7.
46. Zhu, G., Marchewk, M. J. & Keithly, J. S. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology.* 2000, 146:315-321.
47. Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W. & Williamson, D. H. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 1996, 261:155-172.
48. Fichera, M. E. & Roos, D. S. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature.* 1997, 390:407-409.
49. Mc Conkey, G. A., Rogers, M. J. & Mc Cutchan, T. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:2046-2049.
50. Striepen, B., Crawford, M. J., Shaw, M. K., Tilney, L. G., Seeber, F. & Roos, D. S. The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J. Cell. Biol.* 2000, 151:1423-1434.
51. Soldati, D. The apicoplast as a potential therapeutic target in *Toxoplasma* and other apicomplexan parasites. *Parasitol Today.* 1999, 15:5-7.
52. Marechal, E., Cesbron, D.M.F. The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci.* 2001, 6:200-205.

53. Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr. Op. Microbiol.* 1999, 2:426-32.
54. Speer, C.A. & Dubey, J.P. Ultrastructure of sporozoites and zoites of *Hamondia beydormi* in cell cultures. *J. Protozool.* 1989, 36: 488-493.
55. Cawthoen, R.J. & Speer, C.A. *Sarcocystis*: Infection and disease of human livestock wildlife and other hosts. In Coccidiosis of man and domestic animals, O.L. Long (de) CRC Press Inc. Boca Raton Florida. 1990, 91-120.
56. Concely, F.K. & Jenkins, k.a. Immunohistological Study of the anatomic relationship of *Toxoplasma* antigens to the inflammatory response in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 1981, 31.1184-1192.
57. Dubey, J.P., Kotula, A., Sharar, A., Andrews, C.D. & Lindsay, D.S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J. Parasitol.* 1990, 76,201-204.

3 Ciclo de vida

SANDOVAL-RODRÍGUEZ, Francisco Ernesto & MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo

Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, CDMX

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

3 Resumen

Toxoplasma gondii es un patógeno que se desarrolla al interior de las células nucleadas de todos los hospederos de sangre caliente. Su ciclo de vida involucra dos condiciones de diferenciación dependiendo del tipo de hospedero infectado. Cuando el hospedero es un felino (hospedero definitivo), se lleva a cabo el ciclo sexual de reproducción y cuando el hospedero no es felino (hospedero intermediario), el parásito se desarrolla proliferando asexualmente. Las condiciones particulares de cada hospedero para determinar la reproducción sexual o asexual son desconocidas a la fecha. Otro aspecto importante en el ciclo de vida de este parásito es que se han detectado varias formas de diferenciación, una de ellas es la del taquizoíto que es la forma altamente virulenta y reproductiva y que permanece multiplicándose activamente en todas las células del organismo y la causante de la sintomatología de la toxoplasmosis. El parásito en forma de bradizoíto también se aloja en un quiste tisular que lo protege de moléculas y células de la respuesta inmune, así como de fármacos antiparasitarios. Los quistes tisulares son una fuente importante de transmisión entre otros hospederos intermediarios y definitivos. El conocimiento detallado del ciclo de vida de este importante patógeno humano y de interés veterinario permitirá diseñar estrategias para limitar su crecimiento y eliminarlo del hospedero infectado.

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito unicelular e intracelular obligado considerado como uno de los parásitos más exitoso debido a su alta capacidad de infectar a una gran cantidad de organismos, más de 3000 especies de mamíferos, 30 especies de aves e incluso animales acuáticos^{1,2}. También debe destacarse las diversas zonas geográficas en donde se le ha aislado, como son zonas rurales, ciudades, islas, desiertos y regiones polares árticas³. La Organización Mundial de la Salud estima que más del 25% de la población humana está infectada por este parásito⁴. Los mecanismos por los cuales pueden ser infectados una gran variedad de organismos se explican por el ciclo de vida de *T. gondii*, el cual se compone por diversos estadios y fases de proliferación (Figura 5). En el ciclo de vida intervienen hospederos intermediarios y hospederos definitivos. Los miembros de la familia *Felidae*, incluyendo al gato doméstico, son los hospederos definitivos, en donde ocurre el ciclo sexual de reproducción y en donde se generan las diversas cepas del parásito⁵⁻⁷. Entre los hospederos intermediarios incluyen a todos los animales de sangre caliente en donde ocurre el ciclo asexual de proliferación.

3.1 Ciclo de Reproducción Sexual

El ciclo inicia cuando los hospederos definitivos como son los felinos (como el gato doméstico en los ambientes urbanos) ingieren mediante carnivorismo presas infectadas en cuyos tejidos se encuentran alojadas las formas infecciosas conocidas como quistes tisulares. Estas son estructuras con una pared rica en glicoproteínas y con alta resistencia a factores externos y que alojan en su interior a la forma de lenta proliferación conocida como bradizoítos de *T. gondii*, y que se han encontrado en los estados crónicos de la enfermedad y se caracterizan por tener una tasa de proliferación menor en comparación a la de los taquizoítos (Figura 5)^{8,9}.

En el tracto gastrointestinal del gato se liberan los bradizoítos del quiste tisular por la acción de las enzimas digestivas intestinales. Los bradizoítos invaden a los enterocitos del intestino delgado del gato, generando una vacuola parasitófora intracelular (VP)^{10,11}. La VP dentro de los enterocitos invadidos resguarda a los bradizoítos los cuales al proliferar se diferencian secuencialmente en cinco formas asexuales del parásito, es decir con formación de merozoítos y esquizontes, morfológicamente diferentes entre sí para terminar con dos formas sexuales o diploides del parásito, el macrogametocito o célula femenina y el microgametocito o célula masculina que es biflagelado^{12, 13}. A este proceso de diferenciación se le denomina gametogonia.

El microgametocito es altamente motil, con la capacidad de desplazarse sobre el epitelio intestinal y de invadir al enterocito que aloja en su interior al macrogametocito, fertilizándolo. La fertilización y los mecanismos moleculares que conducen a la diferenciación a estas formas sexuales no está comprendido en su totalidad, y se tiene escasa información acerca de las propiedades bioquímicas de las dos formas sexuales del parásito. La fertilización del macrogametocito da como resultado la formación del cigoto, en el que se formará una cubierta quística rígida para dar lugar al ooquiste (Figura 5).

El ooquiste inmaduro, es excretado en las heces del felino contaminando fuentes de agua y hortalizas. El ooquiste inmaduro esporula en 2-3 días bajo condiciones de humedad y temperatura adecuados, generándose un ooquiste maduro que contiene en su interior dos sáculos conocidos como esporoblastos que contienen cada uno a 4 esporozoítos infectivos (Figura 5). La ingesta de los ooquistes maduros infectivos por los hospederos intermediarios como animales de granja y el humano, representa una ruta de transmisión de gran importancia para esta parasitosis¹⁴.

CICLO DE VIDA de *Toxoplasma gondii*

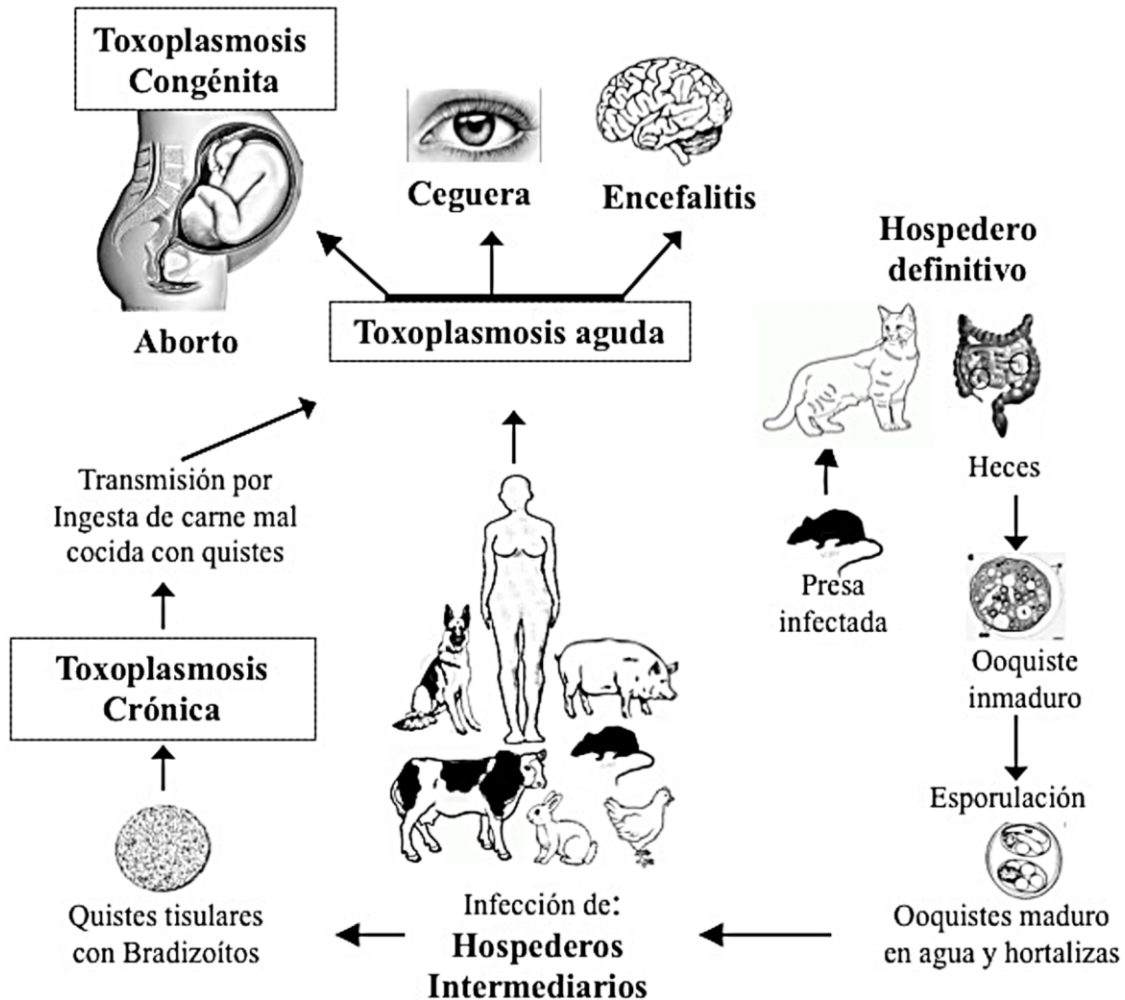


Figura 5 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Un gato infectado puede excretar varios millones de oocistos, contaminando así el suelo, hortalizas, jardines y zonas de recreo en donde las personas y animales domésticos se infectan^{6, 14-16}. La excreción de los oocistos inmaduros ocurre de 3 a 10 días después de la ingestión de los bradizoítos presentes en los quistes tisulares. Los oocistos son muy resistentes, ya que llegan a permanecer infecciosos hasta veinticuatro meses en agua salada y durante años en agua dulce¹⁷⁻¹⁹.

Los gatos también pueden autoinfectarse mediante la ingestión de sus propios oocistos esporulados dando como resultado un nuevo ciclo de infección^{20,21}.

Los gatos infectados de esta forma liberan ooquistes en un periodo de 18 días. A diferencia de otras coccidias, los ooquistes de *T. gondii* son menos infectivos y menos patógenos en el hospedero definitivo (el gato) comparado con los hospederos intermediarios (ratón, cerdo, humanos, etc.). Un aspecto interesante es que los gatos infectados liberan ooquistes solo en una etapa de su vida, y aparentemente infecciones posteriores generan la excreción de un número mucho menor de ooquistes^{6, 22}. Se ha propuesto que después que un felino ingiere ooquistes esporulados, los esporozoítos se diferencian a nivel intestinal en taquizoítos por lo cual se puede considerar también como un hospedero intermediario del parásito²³⁻²⁵. Los taquizoítos se diseminan por todo el organismo e invade muchos tejidos de los gatos formando quistes tisulares conteniendo bradizoítos.

3.2 Ciclo de reproducción asexual

La reproducción asexual de *Toxoplasma* ocurre en los hospederos intermediarios que incluye a todos los organismos homeotermos incluyendo animales de granja (res, cerdo, aves, cerdo, etc.) y al humano. Los hospederos intermediarios se infectan por la ingestión de ooquistes maduros presentes en las fuentes de agua o de hortalizas contaminadas¹³ (Figura 5). En el intestino se liberan los esporozoítos de los ooquistes. Los esporozoítos invaden el epitelio intestinal alojándose en una VP y posteriormente se diferencian al estadio de taquizoítos, los cuales proliferan rápidamente al interior de una VP en el epitelio intestinal. Los taquizoítos destruyen los epitelios y atraviesan la lámina basal alcanzando el sistema sanguíneo. Una vez en sangre, se distribuyen por todo el organismo en forma libre o dentro de macrófagos. La proliferación y diseminación tisular con destrucción tisular producen la sintomatología característica de la toxoplasmosis aguda que incluye, dolor muscular, dolor de cabeza, fiebre, etc. y que desaparecen después de 1-2 semanas confundiendo los síntomas con los de una gripe común.

Durante la infección del parásito, se activa el sistema inmune generándose anticuerpos de los isotipos IgM, IgA e IgG que, aunque son útiles para el diagnóstico de la parasitosis, no son neutralizantes del parásito. En pacientes inmunocompetentes, se activa la respuesta inmune celular, que incluye a los macrófagos y linfocitos, con la liberación de diversas citocinas, la más importante para el ciclo de vida del parásito es el interferón gamma (IFN- γ) así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- γ). Por razones que se desconocen, el IFN- α en forma sinérgica con TNF α , induce la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto con formación de un quiste tisular²⁶. Los mecanismos involucrados en la formación del quiste tisular se desconocen, pero el quiste formado permanece en los tejidos por muchos años e incluso el resto de la vida del hospedero. Los bradizoítos intraquísticos aparentemente tienen una proliferación muy lenta y son la forma de cronicidad de la toxoplasmosis en un individuo inmunocompetente. Aunque se ha planteado la reactivación de los quistes tisulares, es decir la salida del parásito del quiste para llevar a cabo la infección y diseminación del parásito en el hospedero, se desconocen los mecanismos involucrados en la activación y regulación de este proceso.

En el caso del hombre, la infección también puede ser por la ingesta de verduras y agua contaminada con ooquistes maduros, así como por consumo de carne mal cocida de animales de granja (res, cerdo, aves, cerdo, etc.) infectados y que alojan quistes tisulares en sus tejidos. La ingestión de carne mal cocida, contaminada por quistes tisulares toxoplásmicos representa la segunda ruta más importante de transmisión de la enfermedad (Figura 5). Los quistes pueden permanecer por un largo periodo de tiempo en órganos como músculo, corazón, ojo y cerebro, de esta manera ser fuentes de transmisión de la enfermedad, al ser consumidos por otros hospederos²⁷.

Una vez consumidos, los ooquistes o los quistes tisulares, ya sea por el hospedero intermediario o el definitivo (por autoinfección), se liberan los esporozoítos o los bradizoítos respectivamente por acción enzimática y por el pH intestinal, para invadir de inmediato a los enterocitos. Los esporozoítos y bradizoítos resisten el pH ácido y a la acción de enzimas proteolíticas como tripsina¹⁰. Ambos estadios celulares (esporozoítos y bradizoítos) se diferencian a nivel intracelular para dar lugar a los taquizoítos, que son formas del parásito altamente motil e invasivas²⁸ y con una gran capacidad para migrar eficientemente a través el epitelio intestinal y de barreras biológicas distribuyéndose por vía linfática y sanguínea por todo el organismo. Además, el taquizoíto es el estadio responsable de la diseminación y destrucción tisular de órganos privilegiados como el cerebro y el ojo y en mujeres embarazadas, la placenta con destrucción del feto²⁹.

Toxoplasma puede interiorizarse en las células a través de su fagocitosis particularmente en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas o a través de la invasión activa por el parásito en células no fagocíticas³⁰. Se ha planteado que los macrófagos y neutrófilos actúan como transportadores del parásito diseminándolo por todo el cuerpo. Una vez dentro de la célula hospedero, el parásito se aloja en una VP e inicia un proceso de división conocido como endodiogenia por el que se generan dos parásitos en el interior de una célula madre. La VP tiene dos principales funciones, proporciona acceso a los nutrientes (incluyendo aquellos obtenidos desde la vacuola endocítica de la célula hospedera) y evita la fusión de la VP con endosomas o lisosomas³¹.

En el espacio intravacuolar se genera una red vesículo-tubular que aparentemente sirve de contacto entre el organismo y el citoplasma de la célula blanco^{30, 32}. Ante la acumulación de parásitos dentro de la VP, el *T. gondii* sale de la célula hospedera destruyéndola. El parásito una vez fuera de la célula invaden rápidamente a la célula vecina, para así iniciar la formación de una nueva VP, completando así el ciclo lítico³³.

Durante la infección con el parásito, las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos liberan IL-12, la cual es necesaria para estimular la producción de IFN- γ por las células T y asesinas naturales (NK)³⁴. El IFN- γ representa una molécula efectora crucial en la activación de macrófagos para la destrucción de los parásitos intracelulares.

La persistencia de IFN- γ y TNF α en el hospedero infectado produce en el parásito intracelular la activación del proceso de diferenciación que conduce al taquizoíto en su transformación a un bradizoíto y modificación de la VP en un quiste tisular. El tratamiento con IFN- γ no induce a bradizoítos en cultivos de fibroblastos humanos³⁵; sin embargo, en otros cultivos y otras cepas si es capaz de inducirlos, por ejemplo, si se inducen en macrófagos murinos, debido al estímulo por NO²⁶. En la cepa RH de *T. gondii* que aparentemente no forma quiste, se logró su inducción *in vitro* con IFN- γ ³⁶. Los quistes tisulares pueden perdurar en los tejidos por varios años en forma inactiva gracias a la vigilancia del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, en casos de inmunosupresión, los parásitos reemergen del quiste e inician su diseminación tisular alcanzando incluso órganos privilegiados y separados por barreras biológicas del resto del organismo como el cerebro, separado por la barrera hemato-encefálica e incluso invaden al feto debido a la capacidad del taquizoíto de atravesar la placenta como barrera biológica³⁷ (Figura 5)

El proceso destructivo causado por *T. gondii* puede detenerse mediante la activación de la inmunidad celular y la formación de anticuerpos circulantes que neutralizan al parásito solo cuando se encuentra fuera de la célula. La acción de los anticuerpos está limitada en tejidos poco accesibles, como el sistema nervioso central y el ojo (Figura 5).

Ante una primo infección, se genera una toxoplasmosis aguda, la cual cuando se presenta en individuos y animales inmunocompetentes ocurre de forma asintomática y aparentemente autolimitada. Después de la inducción de la síntesis y liberación de IFN- γ por células del sistema inmune, los taquizoítos se transforman en bradizoítos alojados en un quiste tisular que puede permanecer por toda la vida en los tejidos del individuo dando como resultado la toxoplasmosis crónica (Figura 5).

La toxoplasmosis congénita ocurre en mujeres embarazadas, ya sea por el consumo de ooquistes o de quistes tisulares presentes en alimentos contaminados, o cuando la mujer embarazada se encuentra previamente en un estado de toxoplasmosis crónica, en donde el parásito por razones desconocidas sale de los quistes tisulares e inicia la invasión y la diseminación tisular atravesando la barrera placentaria y alojándose en el feto. La mujer que se infecta durante la gravidez puede transmitir el parásito al embrión, generando así cuadros graves en el feto y en el recién nacido como la encefalitis toxoplásmica, la coriorretinitis y el aborto³⁸, (Figura 5). Actualmente se encuentran disponibles en el mercado, reactivos para el tamizaje neonatal que detectan la presencia de anticuerpos IgG contra el parásito³⁹.

La caracterización de las diferentes etapas que constituyen el ciclo asexual de *Toxoplasma* se ha realizado en el modelo murino de infección y en cultivo celular^{13, 40, 41}. En zonas árticas como Rusia se detectaron renos infectados con *T. gondii* por transmisión lateral. Se detectaron taquizoítos en fluidos corporales, tales como, saliva y fluido lagrimal, por lo cual podrían servir como vehículo para infectar a otros renos a través de las membranas mucosas. Este hallazgo considera la toxoplasmosis como una posible enfermedad de transmisión sexual⁴².

3.3 Dinámica de infección y diseminación de *Toxoplasma*

El estudio de la distribución de los parásitos durante la infección ha sido posible mediante el uso de estrategias de infección en modelo animales de experimentación mediante la inoculación intratecal de ooquistes purificados a partir de heces de gatos infectados en el laboratorio o por la alimentación con macerados de cerebros de ratones infectados y conteniendo quistes tisulares. Los gatos infectados por inoculación ya sea con ooquistes o con quistes tisulares, pueden permanecer asintomáticos. En contraste, la infección de ratones produce cuadros severos con la muerte del animal por toxoplasmosis⁴³. En el modelo murino, después de treinta minutos post-infección oral con ooquistes maduros, se liberan los esporozoítos e invaden de inmediato los enterocitos del intestino delgado alojándose dentro de una VP. Después de dos horas de la infección, la mayoría de los esporozoítos invaden a los enterocitos, mientras que algunos atraviesan la lámina propia. A las 6 horas post-infección, los esporozoítos se encuentran principalmente en la lámina propia y en el tejido conectivo, y muchos de ellos se detectan en proceso de diferenciación de esporozoítos a taquizoítos en la VP. Por lo cual desde este momento se detectan taquizoítos invadiendo a endotelios vasculares, macrófagos, células plasmáticas, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células del músculo liso y fibroblastos^{24, 40, 41}. La mayoría de los esporozoítos se diferencian a taquizoítos en la lámina propia en un período de 12 a 18 horas. La parasitemia se puede detectar en los ratones desde las 4 horas post- ingestión. A partir de tres días después de la infección se detectan taquizoítos en diversos órganos extra intestinales.

Dependiendo de las dosis y de las cepas inoculadas de *T. gondii*, los ratones infectados con ooquistes mueren de enteritis durante la primera semana, de neumonía durante la segunda y encefalitis en la tercera semana. La encefalitis es la principal lesión en ratones que mueren a las 4 semanas después de la ingestión de los ooquistes^{12, 40, 44-46}.

3.4 Infección con quistes tisulares en el ratón

En comparación con las infecciones inducidas con ooquistes, la infección con quistes tisulares es menos eficiente y menos virulenta en ratones infectados por vía oral, así como por inoculación intraperitoneal. En ratones alimentados a partir de 1000 bradizoítos se obtienen infecciones consistentes. Los bradizoítos viables logran invadir a los enterocitos del hospedero, y se diferencian en un período de 18 horas a taquizoítos a nivel de la lámina propia del intestino delgado. Los taquizoítos son la única forma capaz de migrar hacia los órganos extraintestinales a diferencia de los bradizoítos. La parasitemia solo se detecta hasta las 24 horas⁴⁶.

3.5 Persistencia de los quistes tisulares en los tejidos

Las formas de bradizoítos en el interior de un quiste tisular son una parte importante en el ciclo de vida y en la transmisión de la toxoplasmosis. En organismos inmunocompetentes los quistes tisulares predominan durante la infección crónica; sin embargo, estos son producidos tempranamente en la infección. En ratón, los quistes tisulares se forman de 2 ó 3 días después de la inoculación parenteral de taquizoítos^{45, 46}. La formación de los bradizoítos es tardía después de la ingestión oral de ooquistes. Los quistes tisulares se forman entre los días 5 y 6 después de la ingestión de bradizoítos⁴⁷, y entre el día 6 y 7 después de la ingestión de ooquistes^{48, 49}.

Desde el punto de vista funcional y estructural, los quistes tisulares son más susceptibles a la digestión por jugo gástrico, no obstante, el bradizoíto es capaz de invadir a los enterocitos bajo estas condiciones de pH y soportando enzimas digestivas como tripsina. En quistes tisulares jóvenes (pequeños), los bradizoítos están más empaquetados en comparación con quistes viejos o de mayor tamaño. La localización y el número de quistes tisulares en animales es diferente dependiendo de las cepas de *T. gondii*. En ratas y ratones, el mayor número de quistes tisulares se encuentra en el cerebro más que en los tejidos viscerales. Sin embargo, en mamíferos mayores (ganado, gatos, ovejas, chivos) los quistes tisulares poseen un tropismo particular por tejidos musculares más que en el cerebro⁴⁶. Una vez formados, los quistes tisulares persisten por un largo tiempo, quizás durante la vida del hospedero. Se ha sugerido que ocasionalmente ocurre la ruptura de los quistes tisulares con la liberación de los bradizoítos. Estos bradizoítos son destruidos cuando el hospedero es inmunocompetente.

3.6 Toxoplasmosis y cambio neurológicos en personas inmunocompetentes e inmunosuprimidas

Por otro lado, en investigaciones recientes en individuos inmunocompetentes infectados con *T. gondii* se ha asociado un daño neuronal con trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, epilepsia, dolor de cabeza y migraña, intento de suicidio, riesgo de accidentes automovilísticos⁵⁰⁻⁵². Sin embargo, en hospederos inmunocomprometidos, como ocurre con los enfermos de SIDA o en pacientes con cáncer, los bradizoítos liberados de los quistes tisulares, pueden multiplicarse localmente y diseminarse por los órganos, por lo cual se considera al parásito como un patógeno oportunista. En paciente con SIDA e infectados con *T. gondii* se produce encefalitis, considerada como la manifestación clínica y se ha considerado que se debe a la reactivación de infecciones latentes^{53, 54}.

En enfermos con SIDA ocurre un mecanismo de reactivación que es desconocido y no se sabe si los bradizoítos de quistes viejos pueden dar lugar a nuevos quistes o tienen que pasar previamente por un estadio de taquizoíto. Los bradizoítos son menos susceptibles a la quimioterapia que los taquizoítos por lo que los estudios tendrán que considerar estas diferencias para la elaboración tanto de métodos profilácticos, así como el desarrollo de vacunas^{47, 53}.

Otras fuentes de infección en humanos incluyen las transfusiones sanguíneas, órganos transplantados a receptores que antes no estaban infectados, manejadores de carne como tablajeros y trabajadores del rastro que manejan carne cruda infectada^{44, 55-62}.

3.7 Agradecimientos

La presente investigación se realizó con apoyo de la Fundación Miguel Alemán A.C otorgado a Ricardo Mondragón Flores y la beca CONACYT otorgada a Francisco Ernesto Sandoval Rodríguez con número de registro 297768.

3.8 Referencias

1. Dubey JP., Morales JA., Sundar N., Velmurugan GV., Gonzalez-Barrientos CR., Hernandez-Mora G. & Su C. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *J. Parasitol.* 2007, 93:710-1.
2. Mazzillo FF., Shapiro K. & Silver MW. A new pathogen transmission mechanism in the ocean: the case of sea otter exposure to the land-parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.* 2013, 8:e82477.
3. Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans, second edition. *Boca Raton: CRC Press.* 2010, 313.
4. Joynson DH. & Wreghitt TJ., Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide, Cambridge University Press, 2005, 412.
5. Dubey JP. & Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 1972, 19:155-77.
6. Dubey JP. & Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.* 1976, 23:537-46.
7. Fux B., Nawas J., Khan A., Gill DB., Su C. & Sibley LD. *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation. *Infect. Immun.* 2007, 75:2580-90.
8. Radke JR., Guerini MN., Jerome M. & White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 131:119-27.
9. Dzierszinski F., Nishi M., Ouko L. & Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot. Cell.* 2004, 3:992-1003.
10. Makioka A., Suzuki Y. & Kobayashi A. Recognition of tachyzoite and bradyzoite antigens of *Toxoplasma gondii* by infected hosts. *Infect. Immun.* 1991, 59:2763-6.
11. Mordue DG., Hakansson S., Niesman I. & Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp. Parasitol.* 1999, 92:87-99.

12. Speer CA. & Dubey JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int. J. Parasitol.* 2005, 35:193-206.
13. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 1998, 28:1019-24.
14. Frenkel JK., Dubey JP. & Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970, 167:893-6.
15. Hutchison WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 1965, 206:961-2.
16. Frenkel JK, Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology. In the Coccidia, Edited by Hammond DM, Long PL. Baltimore: University Park Press, 1973, 343-410.
17. Dabritz HA., Miller MA., Atwill ER., Gardner IA., Leutenegger CM., Melli AC. & Conrad PA. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007, 231:1676-84.
18. Dumetre A. & Darde ML. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev.* 2003, 27:651-61.
19. Lindsay DS. & Dubey JP. Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J. Parasitol.* 2009, 95:1019-20.
20. Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.* 1996, 82:957-61.
21. Dubey JP., Lunney JK., Shen SK., Kwok OC., Ashford DA. & Thulliez P. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J. Parasitol.* 1996, 82:438-43.
22. Dubey JP. Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 2009, 164:89-103.
23. Dubey JP., Lindsay DS. & Lappin MR. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2009, 39:1009-34.
24. Dubey JP., Lindsay DS. & Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11:267-99.
25. Nagel SS., Williams JH. & Schoeman JP. Fatal disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent cat. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 2013, 84:E1-6.
26. Bohne W., Heesemann J. & Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 1994, 62:1761-7.
27. Katris NJ., van Dooren GG., McMillan PJ., Hanssen E., Tilley L. & Waller RF. The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog.* 2014, 10:e1004074.

28. Carruthers V. & Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007, 10:83-9.
29. Toulah FH., Sayed Al-Ahl SA., Amin DM. & Hamouda MH. *Toxoplasma gondii*: Ultrastructure study of the entry of tachyzoites into mammalian cells. *Saudi. J. Biol. Sci.* 2011, 18:151-6.
30. Sibley LD., Krahenbuhl JL., Adams GM. & Weidner E. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell Biol.* 1986, 103:867-74.
31. Subauste CS. Autophagy in immunity against *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009, 335:251-65.
32. Muniz-Hernandez S., Carmen MG., Mondragon M., Mercier C., Cesbron MF., Mondragon-Gonzalez SL., Gonzalez S. & Mondragon R. Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 2011:473983.
33. Black MW. & Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64:607-23.
34. Sturge CR. & Yarovinsky F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 2014, 82:3090-7.
35. Soete M., Camus D. & Dubremetz JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 1994, 78:361-70.
36. Ospina Riaño A., Inducción y caracterización de la cistogénesis inducida por interferón gamma en la cepa RH de *Toxoplasma gondii* *in vitro*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Ciudad de México, 2015, 107.
37. Jones J., Lopez A. & Wilson M. Congenital toxoplasmosis. *Am. Fam. Physician.* 2003, 67:2131-8.
38. Mwambe B., Mshana SE., Kidenya BR., Massinde AN., Mazigo HD., Michael D., Majinge C. & Gross U. Sero-prevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women attending antenatal care in Mwanza, Tanzania. *Parasit. Vectors.* 2013, 6:222.
39. Neto EC., Rubin R., Schulte J. & Giugliani R. Newborn screening for congenital infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, 10:1068-73.
40. Dubey JP., Speer CA., Shen SK., Kwok OC. & Blixt JA. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 1997, 83:870-82.

41. Dubey JP., Ferreira LR., Martins J. & McLeod R. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitol.* 2012, 139:1-13.
42. Prestrud KW. ÅK, Oksanen A., Anu Näreaho A., and Jokelainen P. *Toxoplasma gondii* in the Subarctic and Arctic. *Acta Vet. Scand.* 2010, 52(Suppl 1): S7.
43. Dubey JP. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet. Parasitol.* 2006, 140:69-75.
44. Speer CA. & Dubey JP. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitol.* 1998, 116 (Pt 1):35-42.
45. Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1997, 44:592-602.
46. Dubey JP. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitol.* 1997, 115 (Pt 1):15-20.
47. Bertoli F., Espino M., Arosemena JRt., Fishback JL. & Frenkel JK. A spectrum in the pathology of toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1995, 119:214-24.
48. Luft BJ. & Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1992, 15:211-22.
49. Kean BH., Kimball AC. & Christenson WN. An epidemic of acute toxoplasmosis. *JAMA.* 1969, 208:1002-4.
50. Vyas A., Kim SK. & Sapolsky RM. The effects of *Toxoplasma* infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neurosci.* 2007, 148:342-8.
51. Hsu PC., Groer M. & Beckie T. New findings: depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. *J. Am. Assoc. Nurse Pract.* 2014, 26:629-37.
52. Dalimi A. & Abdoli A. Latent toxoplasmosis and human. *Iran J. Parasitol.* 2012, 7:1-17.
53. De La Paz R & Enzmann D, Neuroradiology of acquired immunodeficiency syndrome. In AIDS and the Nervous System. Edited by Rosenblum ML. New York. Raven. Press, 1998, 121-154.
54. Jacobs L. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs, and man. *Pub. Health Rep.* 1957, 72:872-82.
55. Dubey JP., Murrell KD., Fayer R. & Schad GA. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1986, 188:1035-7.
56. Jacobs L., Remington JS. & Melton ML. A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.* 1960, 46:23-8.

57. Dubey JP. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *J. Parasitol.* 1992, 78:151-3.
58. Miller NL., Frenkel JK. & Dubey JP. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* 1972, 58:928-37.
58. Benenson MW., Takafuji ET., Lemon SM., Greenup RL. & Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.* 1982, 307:666-9.
60. Siegel SE., Lunde MN., Gelderman AH., Halterman RH., Brown JA., Levine AS. & Graw RGJ. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood.* 1971, 37:388-94.
61. Galvan Ramirez ML., Castillo-de-Leon Y., Espinoza-Oliva M., Bojorques-Ramos MC., Rodriguez-Perez LR., Bernal Redondo R., Canedo-Solares I., Espinoza Lopez L. & Correa D. Acute infection of *Toxoplasma gondii* and cytomegalovirus reactivation in a pediatric patient receiving liver transplant. *Transpl. Infect. Dis.* 2006, 8:233-6.
62. Ryning FW., McLeod R., Maddox JC., Hunt S. & Remington JS. Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. *Ann. Intern. Med.* 1979, 90:47-9.

4 Química y metabolismo

GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz

Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

4 Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito complejo el cual tiene una estructura química con una gran cantidad de componentes, en este capítulo se abordan tales sustancias como: Mucopéptidos, glucosamina, aminoácidos y citocromos, polisacáridos, glucolípidos dentro de los cuales destaca el glucosil-fosfatidil-inositol (GFI) el cual participa de manera conjunta a la proteína P-30, formando el complejo P30-GFI en la membrana del taquízoito, jugando un papel importante en la infectividad del parásito en la célula del huésped. Se aborda la biosíntesis de las púrinas de la célula huésped y su importancia en la supervivencia de este parásito que le da la característica de intracelular obligado. Se describe la participación de la actina en los procesos de motilidad de *Toxoplasma* y en la invasión de células. Se considera que *Toxoplasma gondii* posee más de 1000 proteínas, sin embargo, solo unas cuantas se han estudiado de las formas de taquízoítos, bradizoítos y esporozoítos y de éstas se describe su principales características y utilización tanto en el diagnóstico como su estudio en modelos *in vivo*.

Toxoplasma gondii es un complejo parásito, que no obstante a las numerosas investigaciones sobre este, a la fecha solo se conoce parcialmente su composición química. La membrana del *Toxoplasma* contiene mucopéptidos, glucosamina, aminoácidos y citocromos. Por medio de síntesis de las sustancias químicas se encontraron hidrogenasas y reductasas, además Gutiérrez y Del Rey Calero en 1966 indicaron la presencia de proteínas y volutina; Roch, Varela y Vázquez en 1953 demostraron la presencia de polisacáridos usando "azul alciano 8GN 50" (Clorometilcuprophthalciamina)¹. Recientemente se ha descrito una familia de cuatro glucolípidos que comparten propiedades con la molécula glucosil-fosfatidil-inositol (GFI), que asociada a la proteína P30 constituye un complejo de anclaje a la membrana del taquízoito, éste complejo P30-GFI parece jugar un importante papel en la infectividad que *Toxoplasma gondii* realiza en la célula parasitada².

4.1 Metabolismo del parásito dentro de la célula hospedera

No obstante *T. gondii* posee organelos que son necesarios para existir de manera independiente, el crecimiento y la reproducción sólo se lleva a cabo en el ambiente intracelular de la célula hospedera y dentro de una vacuola parasitófora. El intercambio de moléculas entre el parásito y la célula hospedera es a través de la membrana de la vacuola parasitófora y es probable que la red vesículo tubular intravacuolar desempeñe un papel importante^{2,3,4}. Todas las formas de diferenciación del parásito contienen mitocondrias funcionales capaces de producir energía para apoyar el crecimiento⁵. En forma similar, el parásito no es dependiente completamente de la síntesis de proteínas⁶, el DNA^{7,8}, o las pirimidinas de la célula hospedera⁹. La ruta para la biosíntesis de purinas de la célula hospedera es la única vía bioquímica identificada de la cual depende el parásito para su supervivencia, por lo que se explica la necesidad de *T. gondii* de ubicarse en un hábitat intracelular^{5,10,11}. Esta dependencia metabólica se ha utilizado con éxito en el diseño de estrategias terapéuticas enfocadas a la búsqueda de inhibidores específicos y a su vez explica la actividad tóxica específica para *Toxoplasma gondii* de los inhibidores de metabolismo de folatos¹².

4.2 Proteínas

Mediante el marcaje con yodo radiactivo de la superficie celular de los taquizoítos, seguida del isoelectroenfoque de las proteínas solubilizadas de la membrana, se ha demostrado la existencia de cuatro proteínas principales cuyos pesos moleculares son de 43, 35, 30 y 22 kDa^{13,14}. Estas proteínas han sido estudiadas como candidatos para una vacuna y como reactivos para serología de diagnóstico.

La proteína de superficie más abundante, la p30, constituye el 5% del total de las proteínas del taquizoíto con un peso molecular es de 30-35 kDa en condiciones de reducción y 27-28 kDa en condiciones no reductoras. Esta proteína es exclusiva de taquizoítos y no se expresa en bradizoítos o en esporozoítos^{13,14,15}. La secuenciación del gen de p30 ha mostrado que se encuentra conservado en su secuencia en parásitos de las tres poblaciones genotípicas¹⁶. El p30 es altamente inmunogénico y es uno de los antígenos reconocidos con métodos inmunodiagnósticos en sueros de pacientes convalecientes y pacientes en etapa aguda de la toxoplasmosis¹⁸. Esta proteína induce la producción de anticuerpos IgG^{14,19}, IgM²⁰⁻²² e IgA²¹⁻²⁴. Se le ha utilizado con éxito para el inmunodiagnóstico de toxoplasmosis aguda en adultos e infantes infectados congénitamente²⁵⁻²⁷. Potasman y Cols., demostraron que los sueros de individuos no infectados reaccionaban con la proteína de 30 kDa con el método de Western-blot sugiriendo la presencia de anticuerpos que ocurren naturalmente, o de una reacción cruzada²¹. Un estudio posterior demostró que la intensidad de esta banda, aumentaba después de que se había infectado con *T. gondii*²⁰. Además, p30 estimula las células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSP) de los individuos seropositivos para que secreten IFN- γ ²¹, una de las principales citocinas mediadoras de resistencia contra la infección causada por *T. gondii*²⁷.

La inmunización de ratones con p30 estimuló la producción de títulos altos de anticuerpos IgG e IgM, los cuales, en combinación con el complemento del suero, fueron tóxicos en taquizoítos *in vitro*¹⁸. La inmunización con esta proteína indujo la producción de células T citotóxicas CD8+ contra *T. gondii*²⁹ y cuando se usaron en combinación, ya sea con Quil A o liposomas, indujeron una inmunidad protectora en los ratones¹⁸. Estos resultados contrastan con información anterior de Kasper y Cols., donde informaron que los ratones inmunizados con p30 y el adyuvante completo de Freund sufrieron una mortalidad significativamente más alta que la infección causada en los ratones no inmunizados²⁸. Estos estudios demostraron que el tipo de adyuvante utilizado en la inmunización, la ruta de inmunización y la ruta de administración de la infección causada, son consideraciones importantes para evaluar los estudios sobre vacunas en modelos animales.

Otra importante proteína de superficie de los taquizoítos es el antígeno p22, cuyo gen se ha clonado y expresado, empleándose con éxito la proteína de fusión recombinante para detectar IgG en inmunoblots y en el ensayo inmunoenzimático (ELISA) en sueros de pacientes con toxoplasmosis aguda^{14,16,28}. Su sensibilidad menor para la detección de anticuerpos IgA e IgM^{29,30}, sugiere que la producción de anticuerpos correspondientes a p22 puede servir como un marcador de una infección pasada (o estadio crónico).

Los taquizoítos en cultivos de tejidos o cultivados en un medio libre de células excretan y secretan antígenos. Éstos antígenos de excreción/secreción (ESA) constituyen el 90% del antígeno de *Toxoplasma* que circula en el hospedero³¹⁻³⁴. El papel de los ESA en la respuesta inmune del hospedero ha generado interés, ya que son altamente inmunogénicos al producir tanto anticuerpos, como respuestas inmunes protectoras mediadas por células T^{33,35-36}. De los ESA, se han estudiado más ampliamente las proteínas p28 y p23; p28 es un antígeno intracelular presente en los gránulos densos y es secretada por los taquizoítos^{35,37-39}, esta proteína, también es un componente menor de la red reticular rica en proteínas secretada por el parásito en la vacuola parasitófora. La transferencia pasiva del antisuero monoclonal F3G3 específico contra p28 y a otro antígeno citoplásmico de peso molecular aparente de 58 kDa, generó una protección importante contra la exposición al parásito. Además, la inmunización de ratones con el antígeno purificado en columnas de afinidad también indujo una protección significativa³⁷. Se ha demostrado que la proteína recombinante de este antígeno es reconocida por los sueros de humanos infectados con *T. gondii*.

Por otra parte, el antígeno p23 es una proteína de gránulos densos, tanto de taquizoítos como de bradizoítos y que se secreta en la red vesículo-tubular que se encuentra al interior de la vacuola parasitófora³⁸⁻⁴¹. La proteína recombinante es reconocida fácilmente por los sueros de pacientes con infección crónica, pero con menos facilidad en aquéllos con infección aguda⁴¹.

Otra proteína interesante aislada de los taquizoítos es el factor estimulador de la penetración (FEP), cuya ubicación probablemente sea dentro de las roptria⁴¹. La molécula FEP se ha propuesto que corresponde a la proteína de roptria ROP1, la cual se ha secuenciado y clonado. La proteína recombinante respectiva tiene un peso molecular aparente de 75 kDa, mientras que la forma nativa en el lisado de *T. gondii* es de 60 kDa⁴². Como lo sugiere su nombre, la entrada del parásito en las células hospedero, se intensifica después de la incubación con ésta proteína⁴¹⁻⁴⁴. En concentraciones altas, esta proteína también rompe la integridad de la membrana de la célula hospedera⁴⁴. También una proteína de 60 kDa del taquizoíto de *T. gondii* es reconocida con alta frecuencia por los anticuerpos IgM presentes en sueros de pacientes con infección aguda y otra proteína de 12 kDa reconocida por anticuerpos IgG en fase crónica, además una de 66 kDa que es la más frecuentemente reconocida, tanto en pacientes crónicos como agudos; actualmente se realizan estudios adicionales para su posible uso como marcador de infección aguda⁴⁵.

Otras proteínas interesantes incluyen una proteína de membrana de 54 kDa potencialmente protectora y que es identificada por células T humanas⁴⁶; se han reportado antígenos de esporozoíto y ooquistes de específicas de estadio de diferenciación⁴⁷⁻⁴⁸, proteínas de gránulos densos⁴⁹⁻⁵¹, proteínas de micronemos⁵² y la familia de proteínas de roptria^{42,53}.

Mediante estudios inmunquímicos, se identificaron proteínas de taquizoítos de *T. gondii* cultivados en células Vero y en ratones. Los principales componentes de ambas preparaciones demostraron ser proteínas con pesos moleculares de 47, 34, 24, y 22 kDa⁵³.

Los mecanismos moleculares precisos que se llevan a cabo durante el proceso de diferenciación de taquizoíta a bradizoíta y las adaptaciones metabólicas que ocurren durante esta etapa de conversión, son poco conocidos. Se ha encontrado que inhibidores de la respiración mitocondrial inducen la diferenciación de taquizoíta a bradizoíta.

Adicionalmente se han descrito algunos de los componentes que participan en el metabolismo de carbohidratos. Se ha descrito una enolasa ENO1 específica de bradizoíta, así como una enolasa ENO2 que es específica de taquizoítos. El análisis por Western blot utilizando anticuerpos policlonales generados contra las enzimas recombinantes respectivas, reveló que las enolasas nativas de taquizoíta y de bradizoíta son antigénicamente distintas⁵⁴.

Mediante inmunofluorescencia y crio-microscopía electrónica se demostró que la proteína B10 que contiene 318 aminoácidos y tiene un peso molecular de 41 kDa, es una nueva proteína de los gránulos densos, llamada GR9. GRA9, y otras proteínas como GRA2, GRA4 y GRA6, se asocian con la red vesículo-tubular conectados a la vacuola parasitófora. Al igual que las otras proteínas, GRA9 se secreta en la vacuola desde el extremo anterior del parásito, existiendo tanto en una forma soluble como una insoluble. Las propiedades duales de GRA9 se deben a la presencia de hélices alfa anfipáticas hidrófobas y por la presencia de regiones hidrófilas⁵⁵.

La reestructuración de la cromatina en *Toxoplasma* precede a eventos estrictamente regulados, como la transcripción del ADN, la replicación y la reparación. Un tipo de remodelación de la cromatina implica la modificación covalente de los nucleosomas mediante complejos de histona acetiltransferasa (HAT). Se ha identificado una partícula GNAT de *T. gondii* y otra llamada MYST (por los miembros MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60) presentes en apicomplexa (TgMYST -A y -B). El locus genómico de TgMYST-A es singular y genera una transcripción de aproximadamente 3,5 kb que puede codificar dos proteínas de 411 y 471 aminoácidos. El mRNA de TgMYST-B es de aproximadamente 7,0 kb y codifica un segundo homólogo MYST. Con un anticuerpo anti-TgMYST se reveló que tanto las formas larga y corta del TgMYST-A (esta última predominante) están presentes en el núcleo, así como en el citoplasma. El análisis bioinformático del genoma de *Toxoplasma* reveló numerosos homólogos que operan en los complejos MYST nativos. La caracterización de TgMYST representa otro paso importante hacia la comprensión de la regulación de la expresión génica en protozoarios patógenos y da una idea de la evolución en la forma en que estos procesos operan en células eucariotas en general⁵⁶.

En los genomas nucleares de parásitos apicomplexas, se encontraron dos genes que codifican para dos subunidades de citocromo c oxidasa, Cox2a y Cox2b. Se exploró su distribución en el parásito utilizando para ello anticuerpos generados contra un péptido sintético de 14 residuos de la COX2A y contra una proteína recombinante COX2B con una etiqueta de 6 histidinas. El análisis inmunocitoquímico demostró que las proteínas COX2A y COX2B se localizaban en la mitocondria del parásito. Una fracción enriquecida en mitocondrias exhibió una captación de oxígeno sensible al cianuro en la presencia de succinato. Las mitocondrias de *T. gondii* se solubilizaron y sometieron a electroforesis en geles de 2D, las manchas de proteínas seleccionadas se sometieron a análisis de espectrometría de masas y se identificaron polipéptidos de complejos mitocondriales III, IV y V. Las subunidades COX2A y COX2B co-migraron con el complejo IV, por lo tanto, son subunidades de la citocromo c oxidasa del parásito⁵⁷.

La motilidad de parásitos como *Toxoplasma* está basada en la actina para la invasión de células, sin embargo, la actina convencional no parece ser necesaria para la división celular en estos parásitos. Los Apicomplexas también contienen una variedad de proteínas relacionadas a actina (ARPS). Recientemente se identificó una molécula de esta familia de la actina conocida como la proteína 1, (ALP1), que desempeña un papel en el montaje de componentes vesiculares reclutados para el complejo membranal interno (IMC) de las células hijas durante la división celular y se localiza en todo el citoplasma⁵⁸.

Los esfingolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares eucariotas, en particular de la membrana plasmática y están involucrados en una serie diversa de vías de transducción. Los mamíferos producen esfingomiélin (SM) como el esfingolípido complejo primario a través de la SM sintasa. Se estudió la ruta de biosíntesis de los esfingolípidos, el análisis bioinformático indicó la presencia de ortólogo de la sintasa putativo SM en *Plasmodium falciparum* (el agente causante de la malaria) similar a la encontrada en *T. gondii* (TgSLS). Posteriormente, se demostró que en cepas KO para la TgSLS, la complementación con un ortólogo funcional de la levadura IPC sintasa (AUR1p) restauró la función y le otorgó resistencia a la inhibidor aureobasidina AUR1p A. *In vitro*, los recombinantes TgSLS mostraron actividad de la IPC sintasa y, por primera vez, se demostró la presencia de IPC en los extractos de lípidos de *T. gondii* por espectrometría de masas⁵⁹.

La unión del parásito a la célula hospedera es un requisito previo para la invasión y es probable que requiera el reconocimiento de moléculas en la superficie de la célula hospedera. Se ha informado de que la adhesión de taquizoítos a la célula hospedera puede ser inhibida por una variedad de glicosaminoglicanos sulfatados solubles (GAG), tales como sulfato de heparán.

Mediante el uso de zeolitas acopladas a heparina en la ausencia de las células hospedera y observación por microscopía de fuerza atómica y microscopía confocal, se detectaron sitios de unión a heparina en la superficie de los taquizoítos. Adicionalmente, se encontró que las proteínas ROP2 y ROP4 de roptrias y GRA2 de gránulos densos y SAG1 se asocian a la membrana de la célula hospedera a través de los GAGs. Estos estudios sugieren que las interacciones entre los GAGs sulfatados y los antígenos de superficie del parásito *T. gondii* contribuyen a la adhesión del parásito con la célula hospedera, a fin de iniciar el proceso de invasión. Los componentes de roptrias y granulos densos pueden desempeñar un papel importante durante el establecimiento de la infección y durante la vida del parásito dentro de la vacuola^{60,61}. Otras proteínas como la calmodulina, actina, miosina y algunos cationes como el calcio y otras moléculas, se describen en los capítulos de invasión celular y cigogénesis de *T. gondii*.

4.3 Variantes genotípicas de *Toxoplasma gondii*

Las diferencias en la virulencia y en el tiempo de generación en el cultivo, fueron indicios experimentales que sugirieron la existencia de variantes genotípicas en las diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*⁶². Estas pruebas se correlacionaron con el tiempo del cultivo de tejidos^{63,64}. Se ha observado también un aumento en la virulencia de una cepa dada de *Toxoplasma* después de evaluaciones repetidas en ratones^{65,66}. Las explicaciones que se han dado a éstas diferencias en virulencia, son referentes a la estructura proteica/antigénica en las diferentes cepas estudiadas mediante el uso de electroforesis bidimensional demostrándose que cepas de *Toxoplasma* que difieren marcadamente en su virulencia en los ratones, muestran patrones casi idénticos de proteínas de la membrana⁶⁷. Esto amplió los hallazgos de un estudio anterior que comparó los estudios electroforéticos de diferentes cepas de *Toxoplasma* usando electroforesis en tubo⁶⁸. La primera prueba que indicó diferencias antigénicas en las cepas, la presentaron Suggs y Cols.⁶⁹, que demostraron que los anticuerpos de conejos inmunes a antígenos de cepas diferentes tuvieron distinta reactividad cruzada con *Besnoitia spp* usando análisis de proteínas en Western blot; otros investigadores demostraron que en diferentes cepas se compartían proteínas importantes, pero que existían antígenos específicos de cepa⁴⁸. Otros investigadores descubrieron con ayuda de un anticuerpo monoclonal, que el antígeno de membrana de 23 kDa, solo se expresaba en cepas virulentas⁷⁰.

Con el uso de isoenzimas también se caracterizaron diferencias entre las cepas de *T. gondii*. En tres cepas altamente patógenas que no produjeron quistes en los gatos, se presentó un patrón de isoenzimas que fue diferente al de las cepas no letales que producen ooquistes las cuales generaban dos patrones diferentes⁷¹.

La existencia de tres linajes clonales de *Toxoplasma* se demostró finalmente, a través del análisis genético de diferentes cepas de *Toxoplasma* realizados mediante la reacción de la cadena de la polimerasa y determinación de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (PCR/RFLP) para loci de diferentes genes, tales como *SAG1* y *SAG2*. El análisis de población genética indicó que la propagación de *T. gondii* es primariamente, aunque no exclusivamente, por reproducción asexual clonal o por una reproducción sexual uniparental resultando en una estructura poblacional inusual consistente en tres linajes predominantes que han sido designados como tipos I, II y III^{72, 73, 74}.

4.4 Referencias

1. Roch E. Compendio de toxoplasmosis. Ed. Patria 1971,17. México.
2. Mcleod R., Mack D., Brown C. *Toxoplasma gondii* - new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* 1991, 72:109-121.
3. Sibley LD. Active modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* . In *Intracellular Parasitism*. Edited by Moulder JW. Boca Raton: CRC Press Inc; 1989, 245-257.
4. Jones TC. & Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites *J. Exp. Med.* 1972, 136:1173-1194.
5. Silbey LD., Krahenbuhl JL., Adams GM., Weidner E., *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell. Biol.* 1986, 103:867-874.

6. Pfeferkorn ER. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In Modern Parasite Biology Cellular, Immunological, and Molecular Aspects. Edited by Wyler DJ. New York; WH Freeman and Company, 1990:26-50.
7. Pfefferkorn ER. & Pfefferkorn LC. *Toxoplasma gondii*: growth in the absence of host cell protein synthesis. *Exp. Parasitol.* 1981, 52:129-136.
8. Jones TC. Multiplication of *Toxoplasma* in nucleate fibroblasts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1973, 142:1268-1271.
9. Sethi KK., Pelster B., Piekarski G., Brandis H. Multiplication of *Toxoplasma gondii* in enucleated L Cells (Letter). *Nature. New. Biol.* 1973, 243:255-256.
10. Schwartzman JD. & Pfefferkorn ER. Pyrimidine synthesis by intracellular *Toxoplasma gondii* . *J. Parasitol.* 1981, 67:150-158.
11. Pfefferkorn Er. & Pfefferkorn LC. *Toxoplasma gondii* specific labeling of nucleic acids of intracellular parasites in Lesch-Nyhan cells. *Exp. Parasitol.* 1977, 41:95-104.
12. Schwartzman JD. & Pfefferkorn ER. *Toxoplasma gondii* purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp. Parasitol.* 1982, 53:77-86.
13. Handman E., Ghodring JW. , Remington JS. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1980, 124:2578-2583.
14. Kasper LH. , Crabb Jh., Pfefferkorn ER. Purification of major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1983, 130:2407-2412.
15. Sharma SD., Mullenax J., Araujo FG. , Erlich HA., Remington JS. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J. Immunol.* 1983, 11:977-983.
16. Burg L., Perelman D., Kasper L., Ware P., Boothroyd J. Molecular analysis of the gene encoding the mayor surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1988, 141:3584-3591.
17. Peinxw JB., Auer KL. , Huskinson J., Parmely SF., Araujo FG. , Remington JS. Cloning, expression and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii* . *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990, 43:97-106.
18. Kasper LH. , Currie KM., Bradley MS. An unexpected response to vaccination with a purified mayor membrane tachyzoite antigen P30 of *Toxoplasma gondii* . *J. Immunol.* 1985, 134:3426-3431.
19. Bulow R. & Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J. Immunol.* 1991, 147:3496-3500.
20. Potasman Y., Araujo F.G., Desmonts G., Reminton JS. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J. Infect. Dis.* 1986, 154:650-657.

21. Huskinson J., Stepick-Biek PN., Araujo FA., Thulliez P., Susuki Y., Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27:2031-2038.
22. Cesbron JY., Capron A., Oviaque G., Santoro F. Use of a monoclonal antibody in double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (p30). *J. Immunol. Meth.* 1985, 83:151-158.
23. Gross U., Roos T., Appoldt D., Heesemann J. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against p30 using the immunoblot technique. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30:1436-1441.
24. Decoster A., Caron A., Darcy F., Capron A. IgA antibodies against p30 as markers of congenital and acute Toxoplasmosis. *Lancet.* 1988, 2:1104-1106.
25. Decoster A., Darcy F., Caron A., Anti-p30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *Toxoplasma* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1992, 87:310-315.
26. Huskinson J., Thulliez P., Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by human immunoglobulin antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 1986, 24:1050-1054.
27. Khan IA., Eckel ME., Pfefferkorn ER., Kasper LH. Production of interferon gamma by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (p30) from *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 1988, 157:979-984.
28. Kasper L., Khan Y., Ely K Buelow R., Boothroyd J. Antigen specific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii* infected peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1992, 148:1493- 1498.
29. Couvreur G., Sadak A., Fortier B., Dubremetz JF. Surface antigens of *Toxoplasma gondii* . *Parasitol.* 1988, 97:1-10.
30. Parmely SF., Sgariato GD., Mark J., Prince JB., Remington JS. Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen p22 of *Toxoplasma gondii* . *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30:1127-1133
31. Hughes HP, Van Knapen F., Atkinson HJ. , Balfour AH., Lee DL. A new soluble antigen preparation of *Toxoplasma gondii* and its use in serological diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1982, 49:239-246.
32. Hughes HP., Connelly CA., Strangeways JE., Hudson L. Antigen-specific lymphocyte transformation induced by secreted antigens from *Toxoplasma gondii* . *Clin. Exp. Immunol.* 1984, 58:539-547.
33. Chumpitazi B., Ambroise TP., Cagnard M., Autheman JM. Isolation and characterization of *Toxoplasma* exo-antigens from *in vitro* culture in MRC5 and Vero cells. *Int. J. Parasitol.* 1987, 17: 829-834.

34. Darcy F., Deslee D., Santoro F., Capron A., Charif H., Auriau C., Decoster A., Duquesne U. Induction of protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite. Immunol.* 1988, 10:553-567.
35. Huges HP. & Van Knapen F. Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. *Int. J. Parasitol.* 1982, 12:433-437.
36. Decoster A., Darcy F., Capron A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis identification of makers of acute and chronic infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1988, 73:376-378.
37. Duquesne V., Auriau C., Darcy F., Devavel J-P., Capron A. Protein of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T cells. *Infect. Immun.* 1990, 58:2120-2126.
38. Sharma SH., Araujo FG., Remington JS. *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1984, 33:2812-2820.
39. Sibley LD. & Sharma SD. Ultrastructural localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 1990, 71:114-124.
40. Charif H., Darcy F., Torpier G., & Cesbron-Delauw MF., Capron A. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 1990, 71:114-124.
41. Cesbron-Delauw MF., Guy B., Torpier G., Pierce RJ., Lenzen G., Cesbron JP., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecoq JP., Capron A. Molecular characterization of a 23 kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1989, 86:7537-7541
42. Schwartzman JD. Inhibition of penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect. Immun.* 1986, 51:760-764.
43. Osorio PN., Schwartzman JD., Boothroyd JC. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 50:1-16.
44. Kimata Y. & Tanabe K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. *J. Cell. Sci.* 1987, 88:231-239.
45. Galvan R ML., Guillen VC., Saavedra DR., Islas RA. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998, 31; 3:271-277.
46. Saavedra DR., De Meuter F., Decourt JL. & Herion P. Human T. cell clone identifies a potentially protective 54 kilodalton protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 1991,147:1975-1982.

47. Lycke E., Carlberg K., Ferrerira R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: Function of the penetration - enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 1975, 11:853-861.
48. Kasper LH. & Ware PL. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J. Clin. Invest.* 1985, 75:1570-1577.
49. Chiappino ML., Nichols BA., O'Connor GR. Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii* parasite torsion and host-cell responses during invasion. *J. Protozool.* 1984, 31:288-292.
50. Kasper LH. , Bradley MS., Pfefferkorn ER. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1984, 132:443-449.
51. Achbarou A., Mercereau O., Sadak A. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 1991, 103:321-329.
52. Achbarou A., Mercereau-Piujalon O., Autheman JM, Forter B., Camus D., Dubremetz JF. Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991, 47:223-232.
53. Gladkova SE, Bormotov NI, Dedkova LM, Reshetnikov SS, Kurlaeva TB, Belanov EF. An immunochemical study of the antigens from *Toxoplasma gondii* tachyzoites obtained in different cultivation systems. *Med Parazitol (Mosk)*. 1998, 1:20-3.
54. Dzierszinski F, Mortuaire M, Dendouga N, Popescu O, Tomavo S. Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* . *J. Mol. Biol.* 2001, 22:1017-27.
55. Adjogble KD, Mercier C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-Delauw MF, Däubener W. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int. J. Parasitol.* 2004, 34:1255-64.
56. Smith AT, Tucker-Samaras SD, Fairlamb AH, Sullivan WJ Jr. Myst family histone acetyltransferases in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* . *Eukaryot. Cell.* 2005, 4:2057-65.
57. Morales-Sainz L, Escobar-Ramírez A, Cruz-Torres V, Reyes-Prieto A, Vázquez-Acevedo M, Lara-Martínez R, Jiménez-García LF, González-Halphen D. The polypeptides COX2A and COX2B are essential components of the mitochondrial cytochrome c oxidase of *Toxoplasma gondii* . *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, 1777:202-10. Epub 2007 Nov 5.
58. Gordon JL, Buguliskis JS, Buske PJ, Sibley LD. Actin-like protein 1 (ALP1) is a component of dynamic, high molecular weight complexes in *Toxoplasma gondii* . *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2010, 67:23-31.
59. Pratt S, Wansadhipathi-Kannangara NK, Bruce CR, Mina JG, Shams-Eldin H, Casas J, Hanada K, Schwarz RT, Sonda S, Denny PW. Sphingolipid synthesis and scavenging in the intracellular apicomplexan parasite, *Toxoplasma gondii* . *Mol. Biochem. Parasitol.* 2013,187:43-51.

60. Azzouz N, Kamena F, Laurino P, Kikkeri R, Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Dubremetz JF, De Cola L, Seeberger PH. *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures. *Glycobiol.* 2013, 23:106-20.
61. Sadak A., Taghy Z., Fortier B., Dubremetz JF. Characterization of a family of rophtry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988, 29:203-211.
62. Krahenbuhl JL. & Remington JS. The immunology of *Toxoplasma* and toxoplasmosis, In Immunology of parasitic infections. Edited by Cohen S, Warren KS. London Blackwell Scientific Publications; 1982, 356-421.
63. Kaufman HE. , Remington JS., Jacobs L. Toxoplasmosis the nature of virulence. *Am. J. Ophthalmol.* 1958, 46:255-260.
64. Kaufman HE., Melton ML., Remington JS., Jacobs L. Strain differences of *Toxoplasma gondii* . *J. Parasitol.* 1959, 45:189-190.
65. Jacobs L. & Melton ML. Modifications in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1954, 447-457.
66. Nagasawa H., Oka M., Maeda K. Induction of heat shock protein closely correlates with protection against *Toxoplasma gondii* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89:3155-3158.
67. Handman E., Ghodjing JW., Remington JS. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii* . *J. Immunol.* 1980.124:2578-2583.
68. Bloomfield MM. & Remington JS. Comparison of three strains of *Toxoplasma gondii* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Trop. Geogr. Med.* 1970, 22:367-370.
69. Suggs M., Walls KW. , Kagan IG. Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*, *B panamensis* and five *Toxoplasma gondii* isolates. *J. Immunol.* 1968, 101:166-175.
70. Gross U., Muller WA. , Knapp S., Heesemann J. Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 1992, 59:4511-4516.
71. Darde ML, Bouteille B., Pestre-Alexandre M. Isoenzymic characterization of seven stains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988, 39:551-558.
72. Sibley LD. and Boothtoyd J. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 1992, 359:82-85.
73. Howe, DKS. and Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 1995, 172:1561-1566.
74. Mondragón, R., Howe, DKS, Dubey JP. and Sibley LD. Genotypic Analysis of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs *J. Parasitol.* 1998, 84 (3): 639-641.

5 Citoesqueleto y motilidad

CRUZ-MIRÓN, Rosalba, GÓMEZ-DE LEÓN, Carmen T. y MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo

Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, CDMX

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

5 Resumen

Los parásitos apicomplexa son un antiguo grupo de parásitos protozoarios que incluye varios patógenos importantes de seres humanos y animales como es el caso de *Toxoplasma gondii*. Para orientarse e invadir a las células hospedero y mantener un estilo de vida intracelular *Toxoplasma* utiliza un mecanismo de motilidad basado en su citoesqueleto y en la secreción de organelos. Este parásito utiliza una forma única de locomoción dependiente de sustrato conocido como motilidad por deslizamiento la cual es accionada por el sistema actina-miosina, que forman parte del sistema multiproteico conocido como glideosoma, este sistema a su vez forma parte del citoesqueleto subpelicular de *Toxoplasma* compuesto también por el conoide, los microtúbulos subpeliculares y el complejo membranal interno (CMI).

En conjunto, la comprensión de la arquitectura del parásito es importante para apreciar la morfología y los aspectos mecánicos que utiliza para una exitosa invasión celular y diseminación. Estas características le confieren a *Toxoplasma* la capacidad para poder transcender entre las especies, por lo que su estudio abriría nuevas alternativas hacia la búsqueda de un tratamiento contra este parásito.

El citoesqueleto subpelicular del Apicomplexa, *Toxoplasma gondii*, es una estructura altamente dinámica y compleja que participa en la motilidad, invasión a la célula hospedera, proliferación intracelular y salida de la célula hospedera, completando así el llamado ciclo lítico¹. A continuación se describirán las características del citoesqueleto subpelicular de *Toxoplasma*, mostrado en la Figura 6.

Complejo Apical. Una de las características estructurales únicas de las especies que conforman a los Api complexas es la presencia del llamado complejo apical en el extremo anterior del parásito, el cual está constituido por el conoide, los anillos polares y pre conoidales, y por dos microtúbulos cortos centrales².

El conoide se localiza en el polo apical y es una estructura fibrosa en forma de cono truncado constituida por subunidades organizadas con una dirección helicoidal en sentido contrario a la de las manecillas del reloj, (Figura 6)². Está formado por 14 filamentos organizados en espiral de aproximadamente 430 nm de longitud. El conoide mide cerca de 280 nm de largo y 380 nm de diámetro, y puede extenderse o retraerse dentro del anillo polar apical en un proceso conocido como “extrusión del conoide”³.

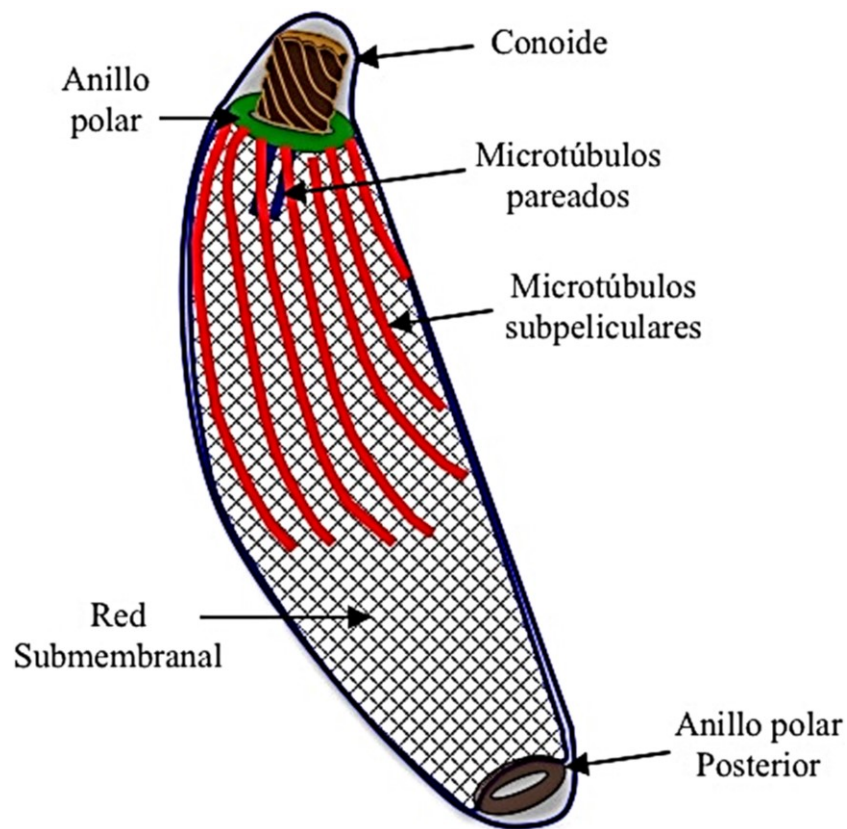


Figura 6 Diagrama del citoesqueleto subpelicular de taquizoíto de *T. gondii*.

Hay 2 microtúbulos intraconoidales que miden el doble de la longitud del conoide, los cuales se ha propuesto que sirven para orientar la disposición del cuello de las roptrías al interior del conoide, a fin de facilitar una secreción unidireccional durante la invasión. Dos anillos preconoidales ubicados por encima del conoide, el anterior con un diámetro de 215 nm y el posterior de 260 nm, cuya función es desconocida². Y dos anillos que se encuentran inmediatamente por debajo del conoide; el anillo polar, el cual parece estar formado por dos unidades aparentemente idénticas y con una ubicación fija, independientemente de la posición que presenta el conoide (Figura 7). Se ha propuesto que el anillo polar, cumple la función como centro organizador de microtúbulos (COMT), ya que los microtúbulos subpeliculares se encuentran asociados por su extremo anterior a este anillo (Figuras 6 y 7). Se ha sugerido que en esta zona podrían existir las condiciones para que los microtúbulos sean enucleados, ensamblados y finalmente anclados y estabilizados^{2,4}.

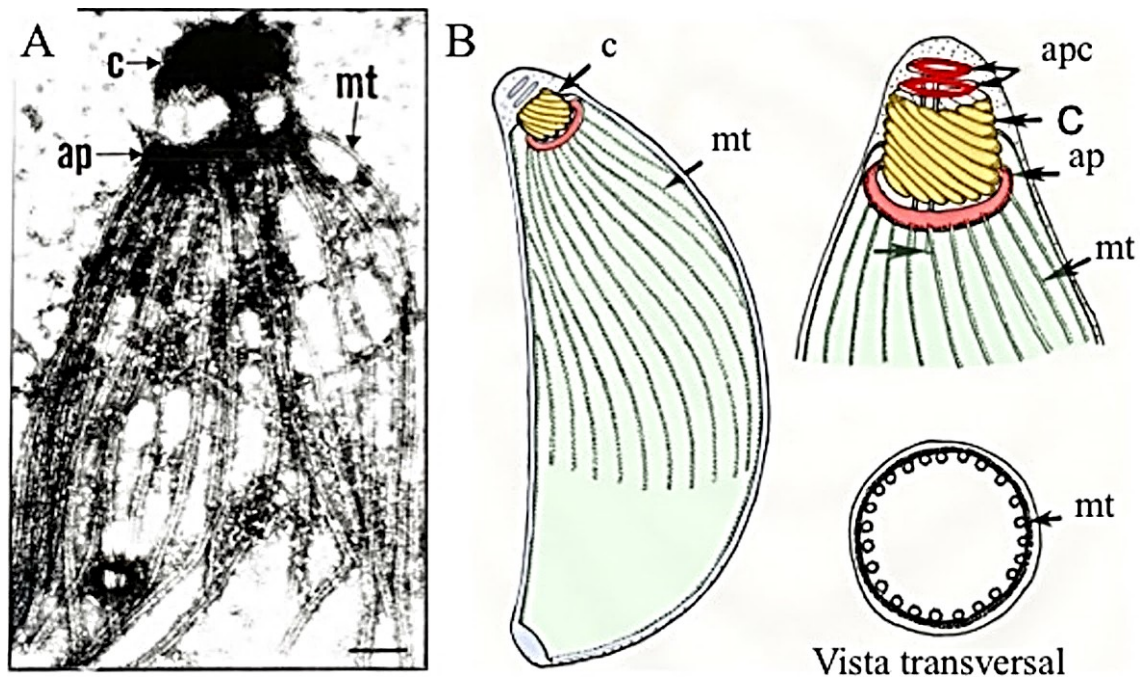


Figura 7 Complejo Apical y Microtúbulos Subpeliculares a) Citoesqueleto de un taquizoito insolubilizado con Tritón X-100 (Escala= 0.2 μm); b) Diagramas de la organización general de microtúbulos subpeliculares: conoide (c), anillo polar (ap); anillos preconoidales (apc); microtúbulos cortos pareados (mp).

La extrusión del conoide es un evento sensible a la concentración de calcio intracelular. Puede ser inducida *in vitro* utilizando ionóforos para calcio o etanol 0.5M^{3,5}, y se inhibe con citocalasina D (CD) o Butanedione monoxime (BDM), sugiriendo la participación de un sistema actina-miosina. En el conoide se han identificado: α -tubulina⁶; dos proteínas de unión a calcio TgCAM1 y TgCAM2 cada una con dos dominios de mano EF (sitio de unión a calcio)⁷; la cadena ligera de dineína TgDLC, que es una proteína pequeña de aproximadamente 8 kDa que presenta una similitud del 86% con las cadenas ligeras de dineína de ratón y humano⁷; y una proteína que contiene un dominio MORN (por sus siglas en inglés: membrane occupation and recognition nexus). La TgMORN1 de *Toxoplasma*, es una proteína de aproximadamente 41 kDa con 14 repetidos de un motivo conservado de 23 aminoácidos, el dominio MORN, el cual es altamente conservado desde bacterias hasta mamíferos, pero su función es desconocida. De las proteínas que contienen este dominio las más estudiadas son las de la familia **junctofilina**, las cuales están involucradas en interacciones membrana-citoesqueleto⁸. En *Toxoplasma*, esta proteína se encuentra asociada con el huso mitótico y con los anillos, anterior y posterior⁹, y es esencial para el ensamblaje del complejo basal¹⁰. Las centrinas son proteínas de unión a calcio pertenecientes a la superfamilia manos EF; estas proteínas juegan un papel principal en la duplicación y en el funcionamiento del cuerpo basal en células ciliadas, aunque también se ha localizado en el centrosoma y recientemente se ha descrito su participación en la reparación de lesiones en el DNA inducidas por rayos UV¹¹.

Otras proteínas que se han encontrado en el conoide incluyen a una proteína de unión a los microtúbulos intraconoidales TgICMAP (microtúbulos intraconoidales) de 135 kDa que contiene un dominio coiled-coil parecido a SMC (Mantenimiento estructural de Cromosomas) que se une a microtúbulos *in vitro* estabilizándolos¹².

La proteína IMC15, además de formar parte del CMI, también se ha detectado en el anillo preconoidal anterior y es una de las primeras proteínas en formar parte del ensamble de las células hijas¹³ y la proteína RNG (anillo polar apical) cuya función es desconocida, pero aparece en las células hijas justo después del desensamble del parásito madre¹⁴. **Microtúbulos.** *Toxoplasma* tiene tres poblaciones de microtúbulos, los microtúbulos subpeliculares, dos microtúbulos cortos intraconoidales (Figura 6 y 7) y los microtúbulos del huso mitótico necesarios para la replicación¹⁵. Los 22 microtúbulos subpeliculares se extienden helicoidalmente desde el anillo polar apical que sirve como su centro organizador hasta tres cuartas partes de la longitud completa del parásito (Figuras 6 y 7). El extremo más alejado al anillo polar apical es el extremo + y no parecen estar bloqueados por alguna proteína cap que limite su crecimiento. Estos microtúbulos definen la forma de media luna del parásito y su disposición en espiral determina el tipo de motilidad por deslizamiento helicoidal sobre el sustrato o durante la invasión. La motilidad, la extrusión del conoide y la invasión, no son inhibidos por drogas despolimerizantes de microtúbulos por lo que estos aparentemente no participan en dichos eventos^{16,17}.

Proteínas asociadas a microtúbulos. Los 22 microtúbulos subpeliculares se encuentran anclados a la cara citosólica del complejo membranal interno (CMI) por medio de partículas intramembranales (pim), las cuales fueron observadas en el películo por criofractura¹⁶. Las pim están distribuidas en el CMI formando líneas longitudinales sencillas o dobles¹⁷; éstas últimas se forman cada 32 nm y coinciden con la posición de los microtúbulos subpeliculares actuando como proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Figura 8). A pesar de que la identidad de dichas partículas permanece desconocida, se han propuesto algunos candidatos como TgILP1, una proteína pequeña localizada en el CMI cuyo homólogo en *Plasmodium* (PbG2) es esencial para mantener la morfología del parásito¹⁸ y las proteínas oligoméricas con múltiples pases transmembranales, GAPM1, GAPM2 y GAPM3^{19,20}, las cuales también presentan homólogos en *Plasmodium* que co-inmunoprecipitan tanto con alveolinas como con componentes del glideosoma¹⁹.

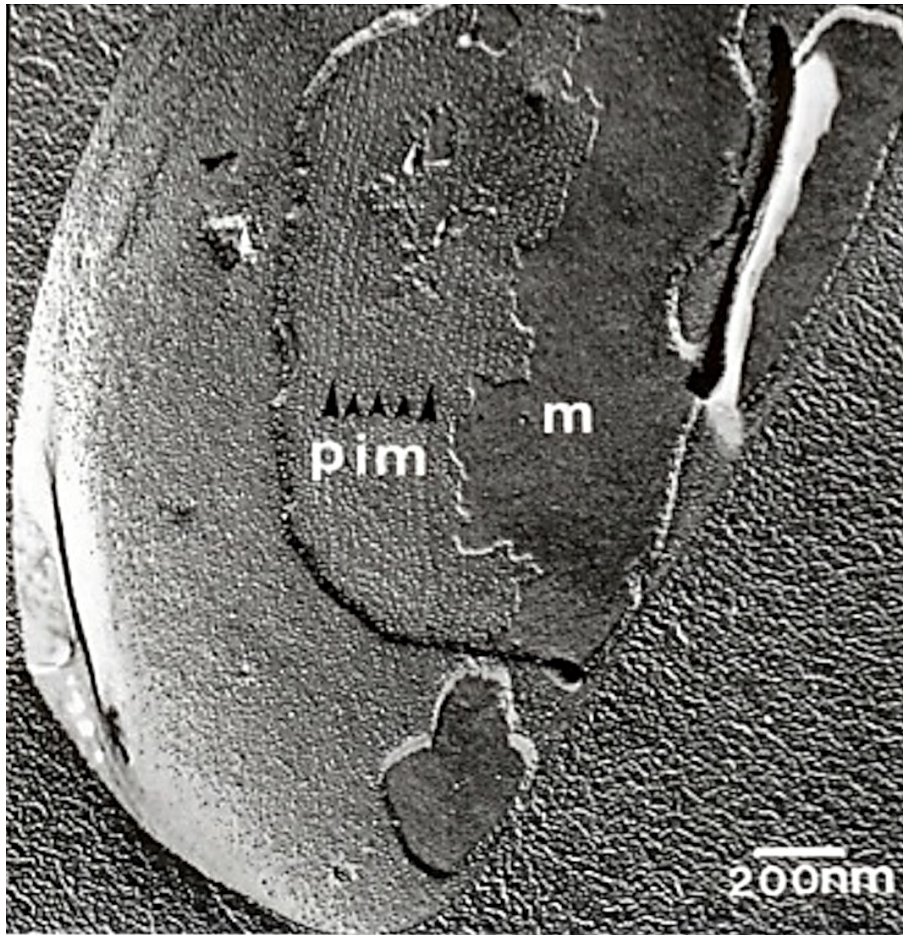


Figura 8 Películo de *Toxoplasma gondii* la imagen corresponde a una micrografía de MET y criofractura del películo de un taquizoíta. Pim, partículas intramembranales, m, membrana. Escala= 200 nm.

Los microtúbulos subpeliculares, en comparación con los microtúbulos de otros organismos, no son dinámicos y son inusualmente estables al frío y a la extracción con detergentes, características que le son conferidas por la proteína SPM1²¹; la pérdida de ésta proteína además de reducir el tamaño del taquizoíta, es esencial para la localización de otras proteínas en los MTs, como TrxL1 y TrxL2 (proteínas similares a tioredoxina)²². Sin embargo, la ausencia de SPM1 o SPM2 (una proteína asociada a microtúbulos independiente de SPM1), no altera la asociación entre los MTs y el CMI.

El genoma de *Toxoplasma* contiene genes que codifican para varias subunidades de cinesina, dineína y algunos componentes de dinactina (Arp1, p25, p27 y p62), un complejo proteico que regula la actividad motora de microtúbulos²³. Tiene 19 genes diferentes que codifican para cadenas pesadas de cinesina; aunque no han sido estudiadas hasta el momento, la cinesina KinI de *Plasmodium* ha sido utilizada para estudios estructurales, mostrando tener una función de despolimerización de MTs mediante la hidrólisis de ATP^{24,25}. Se han descrito 10 genes que codifican para cadenas pesadas, con dominio motor de dineína (DHCs), así como diferentes tipos de cadenas ligeras e intermedias, como la cadena ligera tipo 1, Tc-*Tex-1*, Roadblock/LC7, el factor de ensamble axonemal, la cadena ligera axonemal y la cadena intermedia axonemal²⁶. La cadena ligera de dineína (TgDLC8a) se localiza en la región apical de taquizoítos, mientras que las proteínas TgDLC8b, TgDLC8c y TgDLC8d presentan una distribución citosólica²⁷.

Complejo Membranal Interno (CMI). El complejo membranal interno, subyacente a la membrana plasmática, está formado por vesículas aplanadas y rectangulares fusionadas entre sí, y que se extienden desde el anillo polar apical hacia el anillo polar posterior, dejando descubiertos ambos extremos²⁸. El contenido luminal de las vesículas membranales aplanadas no ha sido definido en Apicomplexas, sin embargo, en el alveolata *Paramecium*, se ha demostrado que funciona como un almacén de calcio²⁹, dejando la posibilidad de que tenga la misma función en *Toxoplasma*. En este complejo membranal se han identificado principalmente tres familias de proteínas, las proteínas IMC (Inner Membrane Complex), las proteínas ISPs (IMC Subcompartment Proteins) y las proteínas GAP (Glideosome Associated Proteins). Las proteínas IMC nombradas IMC1 a IMC24^{7, 13, 21, 30-33} contienen una serie de repetidos conservados los cuales fueron llamados repetidos alveolina³⁴. Los motivos alveolina contienen dominios conservados ricos en valina y prolina compuestos de los subrepetidos “EKIVEVP” y “EVVR” o “VPV”, siendo la IMC2 la única que no contiene dominios alveolina³⁴. Las proteínas ISPs nombradas ISP1 a ISP4, han sido utilizadas para delinear subcompartimentos del CMI durante la división del parásito^{35, 36}. Las proteínas GAP40, GAP45, GAP50 y GAP70 participan en la formación del glideosoma (Figura 9)³⁷. Adicionalmente, hay una proteína similar a actina, la ALP1 la cual se ha propuesto, participa en el ensamble de componentes vesiculares reclutados en el complejo membranal interno durante la división celular³⁸.

Glideosoma. El glideosoma (Figura 9) es un complejo multiproteico asociado al películo, el cual es el responsable de generar el impulso para el movimiento de deslizamiento (gliding)³⁹. Está compuesto por miosina A (TgMyoA), la cual se encuentra unida a las proteínas asociadas al glideosoma TgGAP45 y TgGAP50. La proteína GAP50 es el principal anclaje al CMI, mientras que GAP45 se extiende en el espacio formado entre la membrana plasmática y la membrana externa del CMI y se mantiene anclada a ambas membranas gracias a modificaciones lipídicas; en este espacio MyoA se encuentra unida a los filamentos de actina, los cuales se mantienen asociados indirectamente, por medio de una proteína no identificada hasta el momento⁴⁰, al complejo formado por la proteína TgMIC2. Mientras que la actividad motora es regulada gracias a la fosforilación de la cadena ligera de miosina (TgMLC1) y a la unión a calcio de dos cadenas ligeras esenciales (ELC1 y ELC2)^{41, 42}.

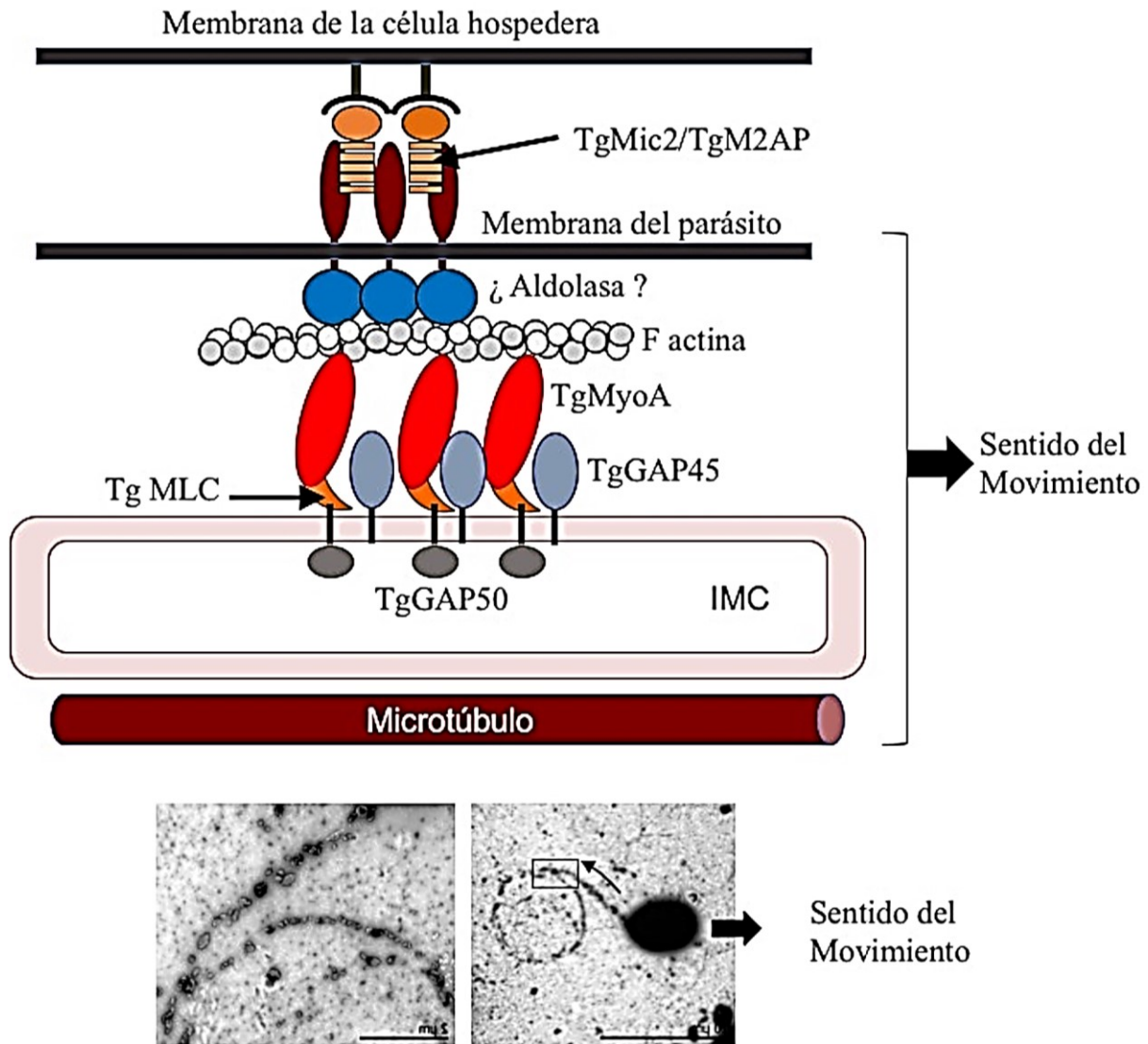


Figura 9 Representación del glideosoma involucrada en el gliding. Las interacciones entre moléculas de miosina y filamentos de actina entre otras en el películo del parásito podrían generar una interacción con algún receptor (aún desconocido) de membrana de la célula hospedera para activar el movimiento de deslizamiento o gliding. (El diagrama fue modificado de Soldati, D. et al. The glideosome: A molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. Trends in Cell Biol. 14, 528-532. 2004).

Red submembranal de citoesqueleto. La extracción de proteínas de *Toxoplasma* con detergentes y sales biliares han revelado la existencia de una estructura filamentosa asociada al citoesqueleto de microtúbulos subpeliculares a la que se le ha otorgado una función en la generación y mantenimiento de la forma celular^{31-33, 43}.

Esta red se encuentra asociada al complejo membranar interno, aunque todavía no se ha esclarecido su ubicación topográfica fina en el complejo trimembranal que conforma el películo (Figura 6 y 8). Tiene una distribución cortical que abarca todo el parásito, está formada por filamentos entrecruzados de aproximadamente 10 nm y parece estar anclada a los anillos anterior y posterior. Aunque esta estructura es rica en actina, se ha identificado la presencia de algunas proteínas IMC^{32, 33}.

Actina. En Apicomplexas la presencia de los filamentos de actina ha sido ampliamente cuestionada; no obstante, son organismos altamente móviles cuya dinámica es inhibida por drogas despolimerizantes de actina F tales como citocalasina D⁴⁴⁻⁴⁷. Aunque actina está presente bioquímicamente en cantidades significativas, se conoce poco acerca de la organización estructural de actina F en estos organismos. Se ha planteado que aproximadamente el 98% de la actina de *Toxoplasma* es globular y esta distribución no es modificada por la adición de agentes polimerizantes de actina como falacidina, MgCl₂, actina exógena, espermina o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂).

Hasta el momento existe una gran controversia ya que se ha observado la estabilización de filamentos de actina por falacidina⁴⁸, mientras que otros concluyen que la falacidina no ha sido útil en la identificación de los microfilamentos de Apicomplexas^{45, 49-52}. La exposición de taquizoítos a jasplaquinolida, una droga estabilizante de filamentos de actina permeable a membrana, induce la polimerización de filamentos de actina en el extremo anterior en asociación con el conoide, donde se forma una proyección apical prominente cubierta de membrana⁴⁹. Estos filamentos fueron decorados con el subfragmento 1 de miosina, demostrando que son filamentos de actina. En algunos parásitos el material filamentososo también fue encontrado por debajo del complejo subpelicular de microtúbulos, el CMI, y en la región posterior de algunos parásitos. El tratamiento con la droga ocasionó una inhibición reversible de la invasión, sugiriendo que la dinámica de polimerización-despolimerización de actina es un proceso necesario para la invasión y motilidad⁴⁹.

Proteínas de unión a actina. El motor de actina-miosina requiere de proteínas accesorias que ayudan a la polimerización-despolimerización de actina, así como de moléculas de asociación con otras estructuras del citoesqueleto que también participan en la motilidad. Comparado con los mamíferos, los Apicomplexas cuentan con un grupo limitado a unas docenas de genes que codifican para proteínas que interactúan con actina⁵³. De los cuales en *Toxoplasma* se han descrito; el factor despolimerizante de actina (ADF), una proteína citoplásmica de 118 aminoácidos con un peso molecular calculado de 13.4 kDa la cual posee cierto grado de similitud con cofilina y actoforina, dos proteínas que unen monómeros de actina que promueven la despolimerización de sus filamentos, actividad que también realiza el ADF de *Toxoplasma*^{54, 55}; Toxofilina, una proteína de 27 kDa que se une a monómeros de actina (G-actina) inhibiendo su polimerización, generalmente se localiza en el citoplasma y durante el evento de exteriorización es ubicada en el extremo apical⁴⁷.

Miosina. Las miosinas de los Apicomplexas son ampliamente conservadas en el filo y son atípicas. *Toxoplasma* expresa 11 miosinas: TgMyoA a TgMyoK⁴⁶, las cuales se encuentran clasificadas entre las clases VI, XIV, XXII, XXIII y XXIV. La clase XIV se encuentra dividida en tres subgrupos (a, b y c). MyoA y MyoD pertenecen a la clase XIVa. TgMyoA es una cadena pesada pequeña de miosina con cuello corto y sin cola⁵⁶⁻⁵⁸. Mediante fraccionamiento subcelular se ha sugerido que se encuentra asociada a dominios de membrana, mientras que en parásitos intracelulares es detectada en forma punteada cerca del polo apical del parásito, distribución que se ve afectada en parásitos en movimiento, localizándose en forma de parches en el extremo apical, consistente con el papel que juega durante el movimiento de deslizamiento⁴⁶; su localización correcta depende del extremo carboxilo, esencialmente de 2 residuos de arginina⁵⁹. TgMyoD es la miosina más pequeña detectada en *Toxoplasma*, está íntimamente relacionada con TgMyoA compartiendo el 55 y 70% de identidad en la secuencia primaria y similitud respectivamente.

TgMyoB/C y TgMyoE pertenecen a la clase XIVb. TgMyoB y TgMyoC están codificadas en el mismo gen por un splicing alternativo cambiando solamente en el extremo carboxilo terminal, sin embargo, presentan diferencias en su localización subcelular y solubilidad. TgMyoC se localiza en los extremos apical y posterior del CMI⁴⁶, mientras que TgMyoB se localiza de forma punteada en el citosol; ambas proteínas están implicadas en el proceso de división del parásito⁶⁰⁻⁶². TgMyoE ha sido identificada exclusivamente en bradizoítos y su función es desconocida hasta el momento⁶⁰. TgMyoH pertenece a la clase XIVc, a diferencia de las otras miosinas de la clase XIV, TgMyoH contiene un largo dominio de cuello, gracias a los dominios conservados que contiene se ha predicho su participación durante la división celular y la formación de la envoltura nuclear, sin embargo, no existen datos experimentales que soporten la función sugerida⁶³.

TgMyoF pertenece a la clase XXII, presenta seis repetidos WD40, los cuales han sido implicados en funciones de regulación transcripcional y transducción de señales⁶⁴, sin embargo, la función de las miosinas clase XXII es desconocida. Las miosinas TgMyoG (clase XXIII), TgMyoI (clase XXIV), TgMyoJ y TgMyoK (clase VI) no han sido estudiadas hasta el momento.

Motilidad de *Toxoplasma gondii*. Las células tienen la capacidad de moverse en algún momento de su vida, mientras que algunas no son muy activas, otras, como las células del sistema inmune y las amebas son extremadamente motiles; esta motilidad está dada por el citoesqueleto de las mismas y depende de las proteínas actina y tubulina⁶⁵. Mientras algunas células se mueven a través de un medio acuoso con ayuda de cilios o flagelos, la mayoría de las células que se deslizan sobre un sustrato lo hacen sin un organelo de locomoción, por ejemplo, el movimiento ameboideo implica una serie de cambios morfológicos del parásito a medida que este avanza a través del sustrato⁶⁶. Los mecanismos de motilidad como en el caso de los parásitos, juegan un papel muy importante en el proceso de invasión y diseminación de los mismos, tal es el caso de los parásitos pertenecientes al filo Apicomplexa los cuales son objeto de gran interés debido a que estos causan significativos índices de morbilidad y mortandad en seres humanos y animales⁶⁷.

Toxoplasma gondii, es un organismo que, gracias a sus mecanismos de locomoción, es capaz de propagarse rápidamente a través del hospedero infectado¹. Una parte importante de la patogénesis de *Toxoplasma* es consecuencia directa de los ciclos repetidos de invasión, la replicación y la salida que conducen a la propagación del parásito. La salida activa de la célula hospedero implica la motilidad del parásito, el reordenamiento de su citoesqueleto y la secreción de organelos especializados⁶⁸⁻⁷⁰.

Las formas de diferenciación de vida de *Toxoplasma* (taquizoíto, bradizoíto y esporozoíto) son invasivas y es probable que se basen en un mecanismo común de locomoción. El taquizoíto es el estadio del parásito más dinámico e invasivo que es dependiente de su motilidad y eventos de secreción para llevar a cabo la invasión celular⁷¹.

La invasión pasiva del parásito no requiere de la motilidad de *Toxoplasma* ya que son los macrófagos los encargados de fagocitarlos envolviendo a los parásitos en una vacuola fagocítica la cual posteriormente será modificada por el parásito en una vacuola parasitófora donde proliferarán los parásitos¹.

Toxoplasma invade activamente a la célula hospedero principalmente por dos mecanismos, 1) motilidad por deslizamiento sobre la membrana de la célula, conocido también como movimiento tipo gliding, y 2) extrusión del conoide. El movimiento tipo gliding, es una forma de locomoción dependiente de sustrato que ocurre sin cambios aparentes en la forma celular y en ausencia de organelos locomotores; este deslizamiento se caracteriza por que el parásito se mueve en forma helicoidal y en sentido contrario a las manecillas del reloj^{70, 71}.

Esta forma de motilidad se lleva a cabo por el sistema actina-miosina del parásito y depende de la polimerización y despolimerización regulada de actina para generar la fuerza de deslizamiento y la internalización del parásito a la célula (Figura 9)⁷².

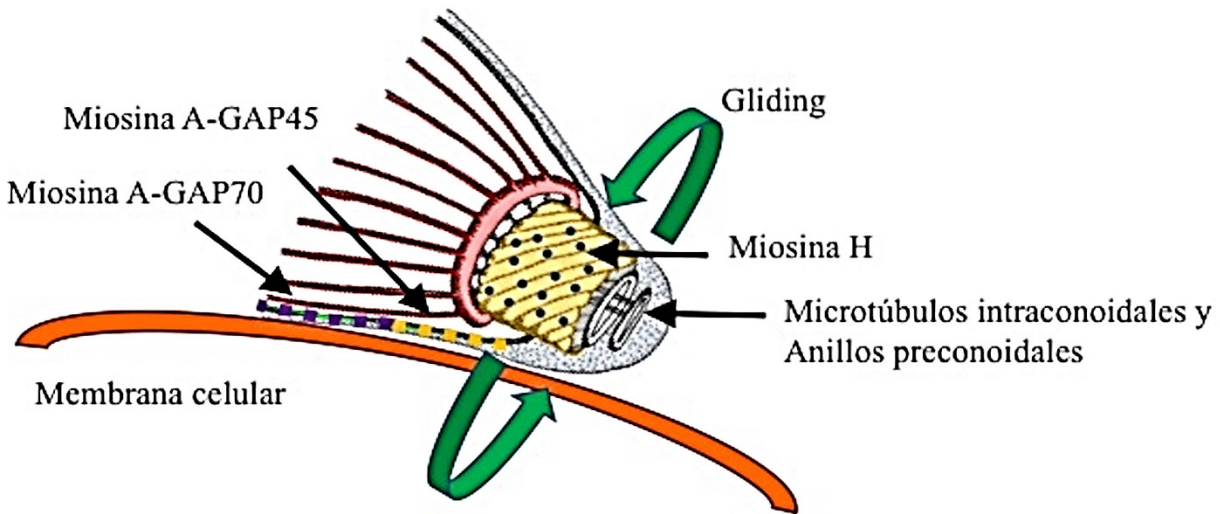


Figura 10 Movimiento tipo gliding en *Toxoplasma gondii*, el parásito se mueve sobre el sustrato (membrana de la célula hospedera) en forma helicoidal en sentido contrario a las manecillas del reloj. Las miosinas A, C y H en *Toxoplasma* se encuentran directamente relacionadas con la motilidad del parásito.

La proteína miosina es altamente conservada a través del filo apicomplexa y juega un papel central en la motilidad. Mediante el uso de drogas que inhiben a la miosina como BDM se ha observado que existe un bloqueo total en el proceso de deslizamiento e invasión del parásito, lo cual indica que es de gran importancia para la supervivencia y propagación de este⁴⁷. *Toxoplasma* presenta varias isoformas de moléculas de miosina, sin embargo, las que hasta ahora se han visto involucradas en el proceso de motilidad son los isotipos A, C y H. Como parte del glideosoma, la miosina A se encuentra anclada al CMI e interacciona, con la proteína de deslizamiento GAP70 en el extremo apical del parásito y con las proteínas GAP45, 40 y 50 por debajo del extremo apical a lo largo de la longitud del parásito, además de formar un complejo con la cadena ligera de la miosina (MLC)^{1, 72, 73}. La miosina C, se encuentra en la parte apical de los taquizoítos e interactúa con GAP80 e IMC1. Se ha demostrado que la miosina A no es esencial para la supervivencia de los taquizoítos, ya que esta puede ser reemplazada por la miosina C cuando se encuentra ausente; sin embargo cuando ambas proteínas no se expresan en el parásito, *Toxoplasma* no es capaz de sobrevivir^{73, 74}. Por su parte, la miosina H, se encuentra asociada a los microtúbulos conoidales y se ha observado que el bloqueo de la expresión de esta proteína disminuye dramáticamente las probabilidades de supervivencia del parásito, esto a pesar de la presencia de la miosina A, por lo que se piensa que la presencia de miosina H en el conoide marca la pauta para la iniciación del proceso de invasión, es decir, la dinámica de deslizamiento inicia con la activación de la motilidad por parte de la miosina H seguido de la activación de la miosina A⁷³.

A la fecha se ha demostrado que esta molécula es fundamental dentro del ciclo de vida de *Toxoplasma*; sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares río abajo que llevan a cabo su activación.

Se sabe que en otros organismos las proteínas cinasas juegan papeles muy importantes en los procesos de activación de la motilidad celular, tal es el caso de la cinasa de la cadena ligera de la miosina⁷⁵. En *Toxoplasma* se ha encontrado que esta cinasa, además de ser activada a altas concentraciones de Ca^{2+} , también es inhibida por KT5926, bloqueando la invasión del parásito, por lo que se piensa que es una cinasa dependiente de calmodulina; por otra parte esta es una proteína mensajera multifuncional que traduce las señales de calcio mediante su interacción con el mismo, y en el parásito se ha encontrado mayormente acumulada en el polo apical, en contraste con lo observado en los ciliados *Tetrahymena*, *Paramecium* y en los flagelados como *Trypanosoma r.*, donde calmodulina se ha encontrado en los orgánulos de locomoción, se sugiere que en *Toxoplasma* se moviliza y activa durante la invasión participando en el proceso de motilidad del mismo, sin embargo se desconoce de qué manera está involucrada en el movimiento tipo gliding del parásito^{76, 77}.

La miosina es una proteína fundamental para que se lleve a cabo el deslizamiento de gliding (Figura 9 y 10), sin embargo, esta proteína por sí sola no podría generar tal evento^{73, 74}. En otros organismos como amebas se ha observado que el movimiento de arrastre depende de la polimerización de los filamentos de actina, estos proporcionan el anclaje a las moléculas de miosina para iniciar la locomoción⁶⁶. En *Toxoplasma* ha sido difícil identificar estos filamentos ya que la actina filamentosa no es fácil de observar en parásitos no móviles, además, estudios bioquímicos han demostrado que alrededor del 97 % de la actina se encuentra en forma monomérica^{78, 57}. Sin embargo, es complejo conciliar que la actina no esté presente en forma filamentosa ya que se requiere de esta proteína para el deslizamiento del parásito y la posterior invasión⁷⁹. Se ha observado que en la región apical de *Toxoplasma* hay una mayor acumulación de la actina monomérica, lo cual concuerda con la ubicación de la miosina, la calmodulina y la MLCK⁷⁶. A partir de esto se ha sugerido, que una vez que la miosina se activa mediante un mecanismo desconocido, podría moverse a través de los filamentos de actina, y que una serie de señales podría dar lugar a la activación del sistema actomiosina a través de calcio y calmodulina^{76, 78}. Además dentro de este modelo, descubrimientos recientes indican que en la motilidad y la invasión de los parásitos además de intervenir el citoesqueleto del parásito, se requieren adhesinas de la superficie de la célula infectada, estos hallazgos sugieren que los filamentos de actina forman un andamio fijo en el que la miosina se mueve hacia el extremo del filamento. La región de la cola en el extremo carboxilo terminal de la miosina podría interactuar directamente, o a través de otras proteínas, con el dominio citoplásmico de una proteína de transmembrana que mediera la unión al sustrato extracelular^{55, 80}.

El segundo tipo de evento dinámico necesario para la invasión exitosa de *Toxoplasma gondii* es la extrusión del conoide⁸¹. Este, es un mecanismo que consiste en la protrusión del organelo apical denominado conoide con la finalidad de presionar la membrana de la célula hospedero y mediante la ayuda de un movimiento tipo tornillo (twirling) penetrar hacia el interior de la misma. El conoide forma parte del citoesqueleto de *Toxoplasma* (Figura 10) y en conjunto con los elementos estructurales que lo forman, proporciona orientación al parásito y es el punto focal de la secreción de las roptrías y micronemos que se agrupan debajo de la base del mismo para una etapa de liberación secuencial^{15, 82, 83}. La protrusión del conoide se da principalmente cuando el parásito está moviéndose sobre el sustrato y cuando está tratando de invadir a la célula blanco. En este proceso, el conoide sobresale más allá del anillo apical y de los 22 microtúbulos, en un movimiento que es sensible a la concentración de calcio citoplásmico del parásito y puede ser inducida por ionóforos para este catión³ o por etanol. Este último es el método óptimo para inducir la extrusión del conoide ya que no se afecta la viabilidad ni la capacidad invasiva de *Toxoplasma*⁵.

Mediante este método y con el uso de inhibidores se han logrado caracterizar las señales que están involucradas, demostrando que la extrusión del conoide es dependiente de la activación de la fosfolipasa C, el receptor de IP3 y una cinasa tipo PKC; sin embargo, hasta la fecha no está claro cuál es la ruta de señalización activada al presentarse el evento mótil ya que estas proteínas no han sido caracterizadas en *Toxoplasma* ⁵.

Hallazgos recientes demuestran que proteínas encontradas en el conoide del parásito como, la miosina H, las proteínas CAM 1 y 2, y la cadena ligera de dineína juegan un papel importante en el movimiento de *Toxoplasma*, sin embargo, su función aún no ha sido determinada ⁸³.

5.1 Agradecimientos

La presente investigación se realizó con apoyo de la Fundación Miguel Alemán A.C otorgado a Ricardo Mondragón Flores y la beca CONACYT otorgada a Rosalba Cruz Mirón con número de registro 429402.

5.2 Referencias

1. Blader IJ., Coleman BI., Chen CT., & Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu. Rev. Microbiol.* 2015, 69:463-85.
2. Nichols BA. & Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 1987, 34:217-226.
3. Mondragon R. & Frixione E. Ca (2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Euk. Microbiol.* 1996, 43:120-7.
4. Russell DG., & Burns RG. The polar ring of coccidian sporozoites: A unique microtubule-organizing centre. *J. Cell. Sci.* 1984, 65:193-207.
5. González Del Carmen M., Mondragón M., González S., & Mondragón R. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2009, 11: 967–982
6. Hu K., Roos DS., & Murray JM. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 2002, 156: 1039-1050.
7. Hu K., Johnson J., Florens L., Fraunholz M., Suravajjala S., Dilullo C., Yates J., Roos DS., & Murray JM. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2006, 2(2): e13.
8. Gubbels MJ., Vaishnava S., Boot N., Dubremetz JF., & Striepen B. A Morn-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J. Cell Sci.* 2006, 119(Pt 11):2236-45.
9. Gubbels MJ., Lehmann M., Muthalagi M., Jerome ME., & Brooks CF. Forward genetic analysis of the apicomplexan cell division cycle in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2008, 4(2):e36.
10. Lorestani A., Sheiner L., Yang K., Robertson SD, Sahoo N., Brooks CF., Ferguson DJ., Striepen B., & Gubbels MJ. A *Toxoplasma* MORN1 null mutant undergoes repeated divisions but is defective in basal assembly, apicoplast division and cytokinesis. *PloS One.* 2010, 5 (8):e12302.

11. Dantas TJ., Daly OM., & Morrison CG. Such small hands: the roles of centrins/caltractins in the centriole and in genome maintenance. *Cell Mol. Life Sci.* 2012, 69:2979-97.
12. Heaslip AT., & Ems-Mcclung SC., Hu K. TgICMAP1 Is a Novel Microtubule Binding Protein in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.* 2009, 4:e7406.
13. Anderson-White BR., Ivey FD., Cheng K., Szatanek T., Lorestani A., Beckers CJ., Ferguson DJ., Sahoo N., & Gubbels MJ. A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 2011, 13:18-31.
14. Tran JQ., De Leon JC., Li C., Huynh MH., Beatty W., & Morrissette NS. RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2010, 67:586-98.
15. Morrissette NS., & Sibley LD., Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66:21-38.
16. Jensen JB., & Edgar SA., Effect of antiphagocytic agents on penetration of *Eimeria magna* sporozoites into cultured cells. *J. Parasitol.* 1976, 62:203-206.
17. Russell DG., & Sinden RE. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J. Cell. Sci.* 1981, 50:345-349.
18. Dubremetz JF., & Torpier G. Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (*Protozoa, Coccidia*). *J. Ultrastr. Res.* 1978, 62:94-109.
19. Morrissette NS., Murray JM., & Roos DS. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 1997, 110 (Pt 1):35-42.
20. Tremp AZ., Carter V., Saeed S., & Dessens JT. Morphogenesis of *Plasmodium* zoites is uncoupled from tensile strength. *Mol. Microbiol.* 2013, 89:552-64.
21. Bullen HE., Tonkin CJ., O'donnell RA., Tham WH., Papenfuss AT., Gould S., Cowman AF., Crabb BS., & Gilson PR. A novel family of Apicomplexan glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. *J. Biol. Chem.* 2009, 284:25353-63.
22. Rayavara K., Rajapandi T., Wollenberg K., & Kabat J., Fischer ER., Desai SA. A complex of three related membrane proteins is conserved on malarial merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009, 167:135-43.
23. Tran JQ., Li C., Chyan A., Chung L., & Morrissette NS. SPM1 stabilizes subpellicular microtubules in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell.* 2012, 11: 206-16.
24. Liu J., Wetzel L., Zhang Y., Nagayasu E., Ems-Mcclung S., Florens L., & Hu K. Novel thioredoxin-like proteins are components of a protein complex coating the cortical microtubules of *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell.* 2013, 12:1588-1599.
25. Gordon JL., & Sibley LD. Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC genomics.* 2005, 6:179.

26. Mulder AM., Glavis-Bloom A., Moores CA., Wagenbach M., Carragher B., Wordeman L., & Milligan RA. A new model for binding of kinesin 13 to curved microtubule protofilaments. *J. Cell Biol.* 2009, 185:51-7.
27. Shipley K., Hekmat-Nejad M., Turner J., Moores C., Anderson R., Milligan R., Sakowicz R., & Fletterick R. Structure of a kinesin microtubule depolymerization machine. *EMBO J.* 2004, 23:1422-32.
28. Morrissette N. Targeting *Toxoplasma* tubules: tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot. Cell.* 2015, 14:2-12.
29. Qureshi BM., Hofmann NE., Arroyo-Olarte RD., Nickl B., Hoehne W., Jungblut PR., Lucius R., Scheerer P., & Gupta N. Dynein light chain 8a of *Toxoplasma gondii*, a unique conoid-localized beta-strand-swapped homodimer, is required for an efficient parasite growth. *FASEB J.* 2013, 27: 1034–1047.
30. Porchet E., & Torpier G. Freeze fracture study of *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infective stages (author's transl). *Z Parasitenkd.* 1977, 54:101-24.
31. Lemgruber L., Kloetzel JA, Souza W., & Vommario RC. *Toxoplasma gondii*: further studies on the subpellicular network. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2009, 104(5):706-9.
32. Mann T., & Beckers, C. Characterization of the Subpellicular Network, A Filamentous Membrane Skeletal Component in the Parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001, 115:257-268.
33. Oliveria-Lima JG., Mineo JR., D Santos AA., Ferreria LS., Ferro AV., & Oliveira CA. Improved methods for examination of *Toxoplasma gondii* cytoskeleton at ultrastructural level. *Parasitol. Res.* 2001, 87,287-293.
34. Gubbels MJ., Wieffer M., & Striepen B. Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Mol, Biochem. Parasitol.* 2004, 137:99-110.
35. Chen AL., Kim EW., Toh JY., Vashisht AA., Rashoff AQ., Van C., Huang AS., Moon AS., Bell HN., Bentolila LA., Wohlschlegel JA., & Bradley PJ. Novel components of the *Toxoplasma* inner membrane complex revealed by BioID. *MBio.* 2015, 6(1):e02357-14.
36. Gould SB., Tham WH., Cowman AF., Mcfadden GI., & Waller RF. Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. *Mol. Biol. Evol.* 2008, 25:1219-30.
37. Beck JR., Rodriguez-Fernandez IA., De Leon JC., & Huynh MH., Carruthers VB., Morrissette NS., Bradley PJ. A novel family of *Toxoplasma* IMC proteins displays a hierarchical organization and functions in coordinating parasite division. *PLoS Pathog.* 2010, 6(9):e1001094.
38. Poulin B., Patzewitz EM., Brady D., Silvie O., Wright MH., Ferguson DJ., Wall RJ., Whipple S., Guttery DS., Tate EW., Wickstead B., Holder AA., & Tewari R. Unique apicomplexan IMC sub-compartment proteins are early markers for apical polarity in the malaria parasite. *Biol. Open.* 2013, 2:1160-70.

39. Keeley A., & Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *TRENDS Cell Biol.* 2004, 14:528-532.
40. Gaskins E., Gilk S., Devore N., Mann T., Ward G., & Beckers C. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 2004, 165:383-93.
41. Gordon JL., Beatty WL., & Sibley LD. A novel actin-related protein is associated with daughter cell formation in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell.* 2008, 7:1500-12.
42. Shen B., & Sibley LD. *Toxoplasma* aldolase is required for metabolism but dispensable for host-cell invasion. *PNAS.* 2014, 111:3567-72.
43. Nebl T., Prieto JH., Kapp E., Smith BJ., Williams MJ., Yates JR., Cowman AF., & Tonkin CJ. Quantitative *in vivo* analysis reveals calcium-dependent phosphorylation sites and identifies a novel component of the *Toxoplasma* invasion motor complex. *PLoS Pathog.* 2011, 7(9):e1002222.
44. Tang Q., Andenmatten N., Hortua Triana MA., Deng B., Meissner M., Moreno SN., Ballif BA., & Ward GE. Calcium-dependent phosphorylation alters class XIVa myosin function in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* 2014, 25:2579-91.
45. Patrón A., Mondragon M., Gonzalez S., Ambrosio J., Guerrero A., & Mondragón R. Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 2005, 35: 883-894.
46. Dobrowolski JM. & Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 1996, 84:933-939.
47. Dobrowolski JM., Carruthers VB., & Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 1997, 26:163-173.
48. Heintzelman MB. & Schwartzman JD. Characterization of myosin-A and myosin-C: Two class XIV unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *Cell Motil. Cytosk.* 1999, 44:58-67.
49. Poupel O., Boleti H., Axisa S., Couture TE., & Tardieux I. Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol. Biol. Cell.* 2000, 11:355-368.
50. Preston TM., & King CA. Evidence for the expression of actomyosin in the infective stage of the sporozoan protist *Eimeria*. *Cell Biol. Int. Rep.* 1992, 16:377-81.
51. Shaw MK., & Tilney LG. Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96:9095-9.
52. Morisaki JH., Heuser JE., & Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.* 1995, 108 (Pt 6):2457-64.
53. Forney JR., Vaughan DK., Yang S., & Healey MC. Actin-dependent motility in *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *J. Parasitol.* 1998, 84:908-13.

54. Cintra WM. & De Souza W. Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Submicrosc. Cytol.* 1985, 17:503-508.
55. Baum J., Papenfuss AT., Baum B., & Speed TP., Cowman AF. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006, 4:621–28.
56. Yadav R., Pathak PP., Shukla VK., Jain A., Srivastava S., Tripathi S., Krishna Pulavarti SV., Mehta S., & Sibley LD., Arora A. Solution structure and dynamics of ADF from *Toxoplasma gondii*. *J. Struct. Biol.* 2011, 176:97-111.
57. Allen ML., Dobrowolski JM., Muller H., & Sibley LD., Mansour TE. Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997, 88:43-52.
58. Heintzelman MB., & Schwartzman JD. A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 1997, 271:139-146.
59. Foth BJ., Goedecke MC., & Soldati D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103: 3681–6.
60. Herm-Gotz A. *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *Embo J.* 2002, 21: 2149–58.
61. Hettmann C., Herm A., Geiter A., Frank B., Schwarz E., Soldati T., & Soldati D. A Dibasic Motif in the Tail of a Class XIV Apicomplexan Myosin Is an Essential Determinant of Plasma Membrane Localization. *Mol. Biol. Cell.* 2000
62. Delbac F., Sanger A., Neuhaus EM., Stratmann R., Ajioka JW., Toursel C., Herm-Gotz A., Tomavo S., Soldati T., & Soldati D. *Toxoplasma gondii* myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell Biol.* 2001, 155:613-23.
63. Frenal K BJ., & Foth D. Soldati. Myosin class XIV and other myosins in protists. L.M. Coluccio (Ed.), *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, Springer, Dordrecht, The Netherlands pp. 421–440. 2008
64. Jacot D., Daher W., & Soldati-Favre D. *Toxoplasma gondii* myosin F, an essential motor for centrosomes positioning and apicoplast inheritance. *EMBO J.* 2013, 32:1702-16.
65. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Walter P., *Molecular Biology of the cell*, Garland Science, New York, USA, 1463 p.
66. Friedl P. & K. Wolf. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 2010, 188: 11-9.
67. Song G. & Springer TA. Structures of the *Toxoplasma* gliding motility adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2014, 111: 4862-4867.
68. Blader IJ., Coleman BI., Chen CT., & Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu. Rev. Microbiol.* 2015, 69:463-85.

69. Mehta S., & Sibley LD. Actin depolymerizing factor controls actin turnover and gliding motility in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* 2011, 22:1290-9.
70. Heintzelman MB. Gliding motility in apicomplexan parasites. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2015, 46:135-42.
71. Hakansson S., Morisaki H., Heuser J., & Sibley LD. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol. Biol. Cell.* 1999, 10:3539-47.
72. Egarter S., Andenmatten N., Jackson AJ., Whitelaw JA., Pall G., Black JA., & Meissner M. The *Toxoplasma* Acto-MyoA motor complex is important but not essential for gliding motility and host cell invasion. *PLoS One.* 2014, 9(3):e91819.
73. Graindorge A., Frenal K., Jacot D., Salamun J., Marq JB., & Soldati-Favre D. The Conoid Associated Motor MyoH Is Indispensable for *Toxoplasma gondii* Entry and Exit from Host Cells. *PLoS Pathog.* 2016, 12: e1005388.
74. Frenal K., Marq, JB., Jacot D., Polonais V., & Soldati-Favre D. Plasticity between MyoC- and MyoA-glideosomes: an example of functional compensation in *Toxoplasma gondii* invasion. *PLoS Pathog.* 2014, 10(10): e1004504.
75. Chen C., Tao T., Wen C., He W., Q., Qiao YN., Gao YQ., & Zhu MS. Myosin light chain kinase (MLCK) regulates cell migration in a myosin regulatory light chain phosphorylation-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2014, 289: 28478-88.
76. Pezzella-D'alessandro N., Le Moal H., Bonhomme A., Valere A., Klein, C., Gomez-Marin J., & Pinon, JM. Calmodulin distribution and the actomyosin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.* 2001, 49: 445-54.
77. Sugi T., Kato K., Kobayashi K., Pandey K., Takemae H., & Kurokawa H., Akashi H. Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3. *Parasitol Int.* 2009, 58: 416-423.
78. Salamun J., Kallio JP., Daher W., Soldati-Favre D., & Kursula I. Structure of *Toxoplasma gondii* coronin, an actin-binding protein that relocalizes to the posterior pole of invasive parasites and contributes to invasion and egress. *FASEB J.* 2014, 28: 4729-4747.
79. Wetzel DM., Hakansson S., Hu K., Roos D., & Sibley LD. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol. Biol. Cell.* 2003, 14: 396-406
80. Sibley LD., Hakansson S., & Carruthers VB. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr. Biol.* 1998, 8: R12-4.
81. Keeley A., & Soldati, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* 2004, 14(10): 528-532.

82. Gomez De Leon CT., Diaz Martin RD., Mendoza Hernandez G., Gonzalez Pozos S., Ambrosio JR., & Mondragon Flores R. Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Proteomics*. 2014, 111: 86-99.
83. Katris NJ., Van Dooren GG., Mcmillan PJ., Hanssen E., Tilley L., & Waller RF. The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog*. 2014, 10: e1004074.

6 Organelos de secreción e invasión celular

DÍAZ-MARTÍN, Rubén Darío y MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo

Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, CDMX

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

6 Resumen

Durante la infección por parte de *Toxoplasma gondii*, los eventos dinámicos en conjunto con eventos de secreción de diversos factores proteicos, son claves en el establecimiento del parásito a nivel intracelular y en el posterior desarrollo de la enfermedad. Estos eventos cruciales, que abarcan desde la adhesión del parásito a la superficie de la célula hospedero hasta la formación de una vacuola parasitófora al interior de la célula invadida, pasando por extrusión del conoide y la penetración de la célula hospedero, son mediados por factores proteicos que son secretados por el parásito desde una batería de organelos altamente especializados denominados en conjunto organelos de secreción. A lo largo de este capítulo, haremos una revisión de cuál es el papel de estos organelos durante el proceso de invasión celular y cuáles son los mecanismos moleculares empleados por el parásito para llevar a cabo los eventos de secreción de micronemas, roptrías y gránulos densos. Así mismo, analizaremos el papel de los componentes del citoesqueleto durante este proceso de invasión y el establecimiento de la infección intracelular.

Introducción

Toxoplasma gondii, es un patógeno intracelular que tiene la capacidad de invadir cualquier célula nucleada en un amplio rango de organismos vertebrados. Para ello, el parásito emplea diferentes herramientas que le permiten llevar a cabo la invasión de la célula hospedero de forma exitosa, lo cual es un paso clave en el mantenimiento de infección a lo largo del ciclo de vida del parásito¹.

El proceso de invasión requiere una serie de pasos cruciales que van desde la adhesión del parásito a la superficie de la célula hospedero hasta la formación de una vacuola parasitófora al interior de la célula invadida, pasando por eventos de motilidad, secreción de roptrias extrusión del conoide y penetración de la célula hospedero. En todos estos eventos, participan diferentes organelos de secreción del parásito que están involucrados en la liberación factores proteicos que permiten desde la adhesión y la motilidad hasta la formación de un ambiente intravacuolar donde se da la división del parásito por medio de endodiogenia².

Estos organelos de secreción participan en dos tipos de procesos de invasión, el primero de estos, es un proceso de invasión pasiva (Figura 11), en el cual las células efectoras son las células fagocitas del organismo infectado como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, en un proceso que puede durar hasta unos 15 minutos. Después de la adhesión del parásito a la membrana de la célula fagocítica, esta despliega una serie de señales de transducción que permiten la reorganización del citoesqueleto y la formación de filopodios y extensiones de la membrana plasmática que envuelven al parásito para posteriormente introducirlo al citoplasma por medio de un fagosoma^{3,4}. Este fagosoma, se caracteriza por la ausencia de moléculas involucradas en el reconocimiento y fusión de los lisosomas del fagocito y por lo tanto se inhiben los procesos que conducen a la destrucción y digestión del parásito intravacuolar. Aparentemente la incapacidad de fusionarse con los lisosomas es debida a una modificación de la topografía molecular del fagosoma producida por la presencia de componentes secretados por el parásito intravacuolar^{3,5}. En este punto, al interior del fagosoma, el parásito libera diferentes factores que le permiten modificar la expresión génica de la célula hospedero, modulando la respuesta inmune, lo cual inhibe la producción de ácido nítrico y la liberación de citocinas; un evento clave, que permite la supervivencia del parásito y su proliferación al interior del fagocito⁶.

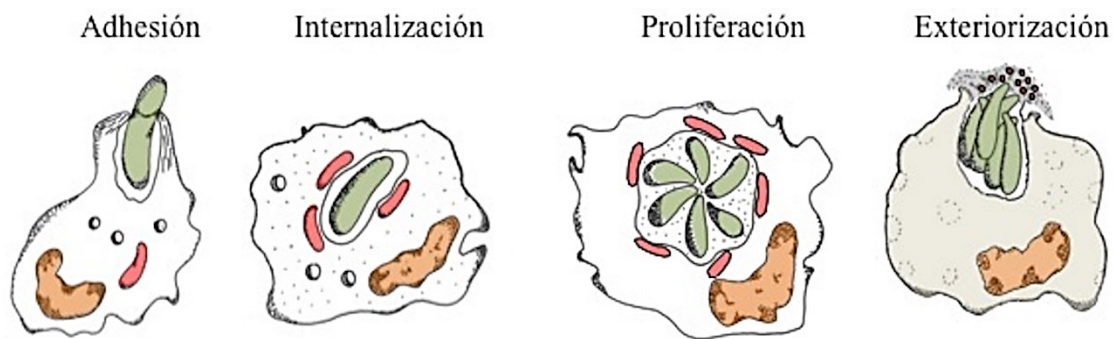


Figura 11 Invasión pasiva. Diagrama de la invasión pasiva: **Adhesión.** El macrófago se une y organiza prolongaciones de la membrana que rodean al taquizoíto; **Internalización,** del taquizoíto en un fagosoma sin destrucción; **Proliferación** intravacuolar por endodiogenia; **Exteriorización,** del taquizoíto con la muerte consecutiva de la célula hospedero.

El segundo tipo de invasión conocido como invasión activa (Figura 12), implica una serie de eventos dinámicos acompañados de múltiples eventos de secreción por parte del parásito, durante el cual, *Toxoplasma* utiliza sus propios recursos para invadir a células no fagocíticas que incluyen a la mayoría de las células del organismo, lo cual convierte al parásito en la célula efectora durante este proceso. La invasión activa que se lleva a cabo entre 10-30 segundos, involucra la activación de la motilidad por deslizamiento del parásito así como la secreción de productos provenientes de organelos especializados^{7, 8}. Este fenómeno de invasión activa, tiene como primeros eventos el reconocimiento de la célula hospedero por parte del parásito y la adhesión de este a la célula blanco, pero a la fecha, sigue sin determinarse la existencia de receptores específicos en la membrana de las células hospederas que estén involucrados en la invasión activa por parte de *Toxoplasma*⁹. Pese a esto, algunos autores han sugerido la interacción entre proteínas secretadas por los micronemos (MIC) del parásito con receptores tipo integrinas así como a proteoglicanos y laminina presentes en la matriz extracelular del hospedero, los cuales pudieran mediar la interacción entre las células y el parásito^{10, 11}.

A continuación se analizará el papel de los organelos de secreción presentes en *Toxoplasma gondii* durante los diferentes eventos que se dan a lo largo del proceso de invasión activa de la célula hospedero, con especial énfasis en la secreción de micronemos durante la adhesión, la secreción de roptrias durante la penetración de la célula blanco, la secreción de los gránulos densos para la formación de un hábitat intracelular para el parásito y así mismo se analizará el papel de los componentes del citoesqueleto durante la motilidad y la extrusión del conoide, dos eventos de motilidad cruciales para el establecimiento de una invasión exitosa por parte del parásito.

6.1 Los micronemos y su papel durante la adhesión a la célula blanco

Los micronemos, son uno de los principales organelos involucrados con el proceso de invasión de la célula hospedero, estos participan en la adhesión del parásito, un paso crucial en el proceso de invasión activa por parte de este patógeno. Estos micronemos, son organelos ubicados en la región apical del parásito, presentan una forma esférica y durante las primeras etapas de la invasión, su contenido es secretado sobre la membrana de la célula hospedero. En su interior, alojan a las proteínas de micronemos conocidas como proteínas MIC, las cuales conforma un sistema heterogéneo de moléculas adhesivas y lubricantes que facilitan la motilidad del parásito sobre la superficie de la célula hospedero (Figura 12 paso 1)². Estas adhesinas, pese a que favorecen la unión y el deslizamiento del parásito sobre la membrana de la célula hospedero no son incorporadas al interior de ésta y permanecen en la superficie luego del proceso de invasión celular¹². A la fecha se conocen 16 proteínas de micronemos: las proteínas MIC de la MIC1 a la MIC12, la MIC16, las proteínas AMA1, M2AP y la proteína SUB1, sin embargo, la función de muchas de ellas se desconoce. En el caso de varias de ellas, se ha logrado determinar la existencia de complejos proteicos que aparentemente son claves en los procesos de adhesión e invasión celular^{13, 14}. El primero de estos complejos es el formado por las proteína MIC2, la cual presenta dominios de integrina que se ha implicado en la unión del parásito con la célula hospedero y con la matriz extracelular gracias a su interacción con la proteína ICAM1 en la membrana plasmática de la célula blanco y con los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular. Esta proteína, se asocia a la proteína M2AP, lo cual facilita su transporte en la vía secretoria del parásito; luego de la exocitosis, MIC2 se asocia a las proteasas MPP1 y MPP2, las cuales son las encargadas del procesamiento proteolítico de MIC2, lo cual permite su maduración y su interacción con los componentes de la célula hospedero¹⁵.

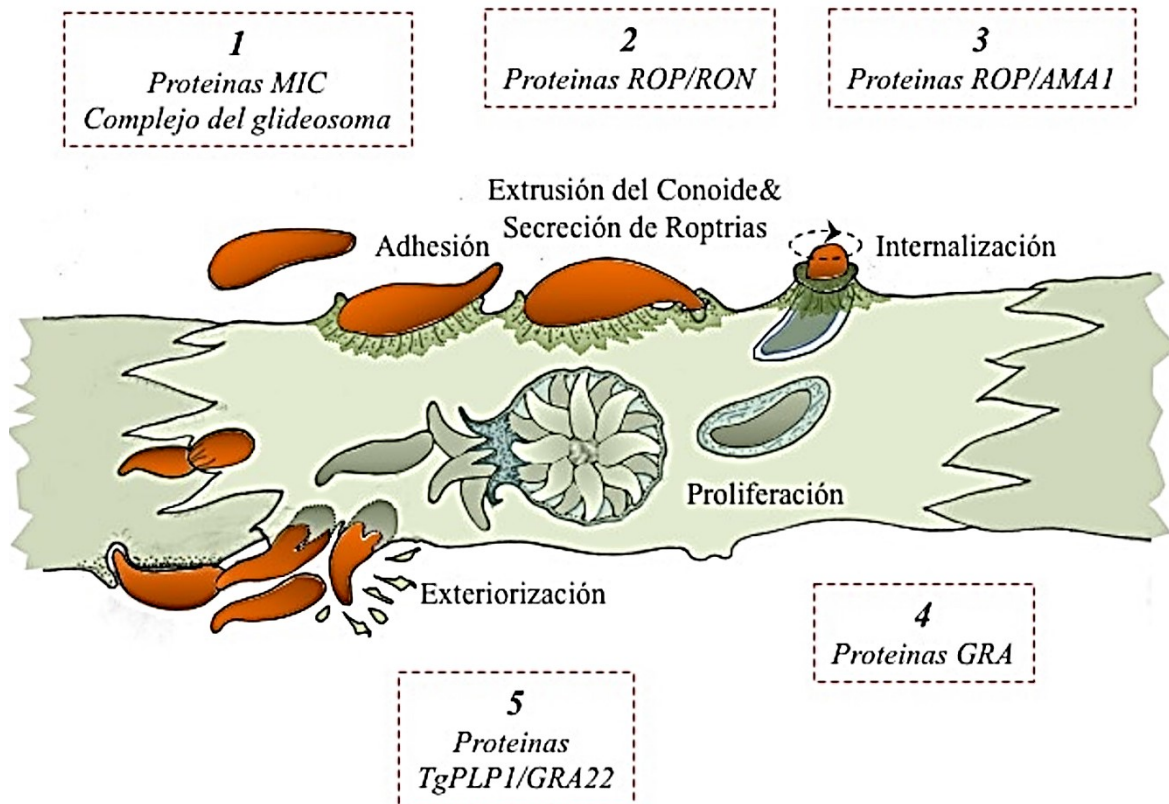


Figura 12 Invasión Activa por *Toxoplasma gondii*. El proceso de invasión es mediado por los organelos de secreción micronemos (proteínas MIC), Roptrias (Proteínas ROP) y (proteínas RON), así como gránulos densos (proteínas GRA), Este proceso está íntimamente relacionado con los componentes del citoesqueleto como el complejo apical (conoide) y con los componentes del complejo del glideosoma responsable de la motilidad por deslizamiento.

El segundo complejo que se ha demostrado que está involucrado en el proceso de adhesión, es el formado por las proteínas MIC3 y MIC8, la primera, se une directamente a la superficie de la célula hospedero gracias a su motivo de unión a quitina (BCL) y los múltiples dominios homólogos al EGF (Factor de crecimiento epidérmico); por su parte, MIC8, es una proteína transmembranal que ha demostrado ser clave en la formación de la unión estrecha entre el parásito y la célula hospedero; esta, es posiblemente el punto de anclaje de la proteína MIC3 a la superficie del parásito^{16, 17}. Se ha demostrado que los componentes de este complejo son un factor de virulencia clave en modelos *in vitro* e *in vivo*, y que el dominio intracelular de MIC8 es crucial en la función de esta proteína^{17, 18}.

Por su parte, MIC4, es una proteína ubicua en todos los estadios del ciclo de vida del parásito; esta, es procesada por proteólisis tanto en el extremo-N como en el extremo-C luego de su liberación de los micronemos por la proteasa SUB1, una proteasa encargada del procesamiento de diversas proteínas MIC. MIC4, presenta 6 dominios que participan en la adhesión a la célula hospedero¹⁹ y forma un complejo con las proteínas MIC1 y MIC6 que está involucrado en el reconocimiento y adhesión a la célula hospedero. Dentro de este complejo, se ha demostrado que MIC4, posee sitios de unión a galactosa, lo cual pueden estar involucrados en la evasión de la respuesta inmune por parte del parásito²⁰.

Otro complejo proteico crucial para la regulación de invasión, es el formado por la proteína SUB1 y la proteína MIC5. Esta, es un potente regulador de la actividad serin-proteasa de la proteína SUB1, ya que presenta una estructura similar al predominio de la subtilisina, lo cual la convierte en un importante regulador de los procesos proteolíticos que se llevan a cabo durante la invasión y motilidad celular²¹. Adicionalmente, esta serinproteasa SUB1 se procesa por autocatálisis a partir de un precursor inicial de 120 kDa. Esta proteasa está anclada a la membrana por medio de un anclaje GPI, y es liberada a la superficie del parásito durante el proceso de invasión, donde se encarga del procesamiento de la proteína MIC4 y de los complejos M2AP-MIC1. Ensayos de disrupción del gen han demostrado que la ausencia de esta proteína afecta la adhesión a la célula hospedero, la invasión celular y el movimiento de *gliding* del parásito, lo cual sugiere que esta es un factor de virulencia del parásito en modelos *in vivo*²².

6.2 La regulación de la secreción de micronemos

No obstante, se han descrito diferentes moléculas citosólicas que participan en la regulación de la secreción de los micronemos, se desconoce cuál es la molécula efectora fisiológica presente en la superficie de la célula hospedera que activa la secreción del contenido de los micronemos^{23, 24}.

Se ha demostrado, que luego de la interacción del taquizoíto con la membrana de su célula hospedera, al interior del parásito se libera calcio citoplásmico de los tres compartimentos citoplásmicos que almacenan este catión, como son 1) ácido-calcisomas, 2) retículo endoplasmático y 3) mitocondria²⁵. Se han desarrollado modelos *in vitro* que permiten simular el incremento en estos niveles de calcio intracelular en ausencia de una célula hospedera mediante el tratamiento del parásito con etanol²⁶, ionóforos para calcio, ó diferentes agonistas para el receptor de rianodina^{27, 28}.

Al interior de los micronemos, la proteína PRP1 (*parafusin-related protein 1*) se ha propuesto que tiene un papel indirecto en la exocitosis regulando los niveles de Ca^{2+} intracelular, ya que se ha demostrado que es un ortólogo funcional de la *parafusin protein* (PFUS) presente en *Paramecium tetraurelia* la cual lleva a cabo esta función regulatoria²⁹. La TgPRP1 es una fosfoglucomutasa (PGM), que pertenece a un grupo de enzimas evolutivamente conservadas. Se ha demostrado que diferentes isoformas de PGM presentes en otros modelos eucariotas, están implicadas en eventos de señalización mediados por Ca^{2+} que aparentemente no están relacionados con las funciones clásicas de las PGMs en el metabolismo clásico de la glucosa³⁰.

Los cambios en los niveles de calcio al interior del parásito, pueden junto con otras señales, culminar en la activación de la fosfolipasa C (PLC), la cual genera como segundos mensajeros a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), lo cual trae como consecuencia la secreción de los micronemos^{26, 31}.

Se ha demostrado que una cinasa de DAG (DAG-Kinase 1) es la encargada de regular el balance entre el ácido fosfatídico (PA) y el DAG en este proceso de secreción; el sensor de este mecanismo de regulación, aparentemente es una proteína con homología de pleckstrina. Esta, se encuentra en la superficie de los micronemos y censa la concentración de PA durante la secreción de micronemos³¹. Aparentemente, otra señal involucrada en la secreción de los micronemos, es la acidificación del medio; se ha demostrado que la acidificación del medio, es capaz de generar un aumento en los niveles de calcio intracelular del parásito, generando la secreción de los micronemos y la activación de una proteína homóloga a la perforina (PLP1), la cual es una proteína que se encuentra implicada en el proceso de egreso de la célula hospedera (Figura 12 paso 5)³².

Finalmente, el proceso de secreción de micronemos, parece estar estrechamente ligado a la correcta osmoregulación del parásito, se ha demostrado, que una bomba de protones con función ATPasa (TgVP1) localizada en los acidocalcisomas y la membrana vacuolar la cual a su vez está involucrada en la osmoregulación del parásito ante condiciones de estrés osmótico, y parece estar relacionada con la correcta secreción de los micronemos. Las cepas *knockout* para TgVP1, no presenta defectos en la maduración de las proteínas MIC, pero si defectos en la adhesión a la célula hospedero, la invasión celular y la secreción de micronemos³³.

6.3 La internalización del parásito y la interacción entre micronemos y roptrías

Una vez que el parásito se adhiere a la célula hospedero, la membrana apical del *Toxoplasma* se fusiona con la membrana de la célula blanco generando una “unión móvil” gracias a la asociación de los productos de secreción tanto de micronemos como de roptrías (Figura 12, Paso 2; esta unión móvil, se mantiene a lo largo de la penetración del parásito (Figura 13). Esta unión está asociada con la formación de una constricción alrededor del parásito que migra desde el extremo apical hacia el posterior a medida que procede la invasión (Figura 13)³⁴.

Luego de la adhesión celular, la proteína AMA 1 es secretada desde los micronemos asociándose y migrando sobre la superficie del taquizoíto (Figura 12 paso 3) en donde es proteolíticamente degradada a una forma soluble por la serin-proteasa *rhomboid protein*^{35, 36}. Esta adhesina, se asocia a diferentes proteínas de roptrías que participan durante la invasión de *Toxoplasma gondii*; de estas, dos son las proteínas de roptrías ROP2 y ROP4³⁷, mientras que las restantes son proteínas presentes en el cuello de las roptrías TgRON2, TgRON4, TgRON5 y TgRON8³⁷. Para su correcta asociación, estas proteínas provenientes de las roptrías y del cuello de las roptrías deben ser proteolíticamente procesadas, lo cual permite la formación de un complejo multiproteico con la proteína AMA1, este complejo se encuentra localizado en la unión móvil y se ha demostrado que participa en la fusión de las membranas con la célula hospedero y la invasión celular³⁸.

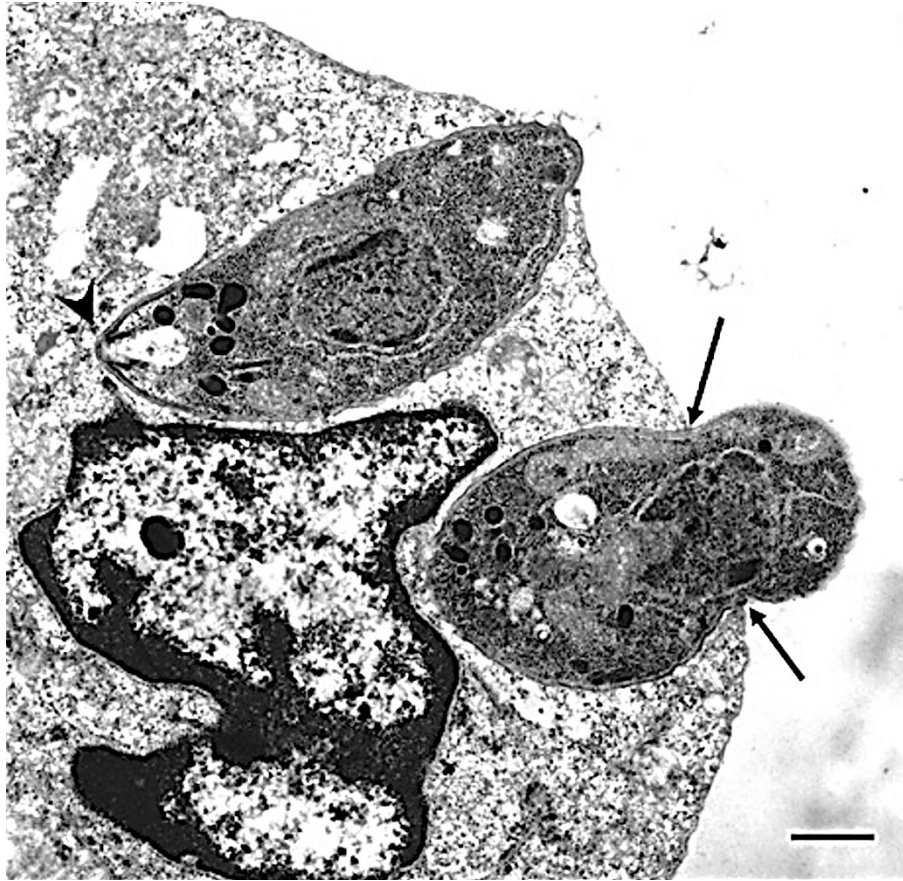


Figura 13 Micrografía de la invasión de *Toxoplasma gondii*. Dos taquizoítos se encuentran invadiendo a la célula hospedera. Uno de ellos ha vaciado el contenido de sus roptrias (cabeza de flecha) y el otro presenta la unión móvil así como la constricción del cuerpo (flechas). Escala= 1 µm.

6.4 El papel de la proteína ROP1 durante la invasión celular

A lo largo del evento de invasión, se da la secreción del contenido de las roptrias lo cual permite tanto la penetración como la interacción del parásito con la célula blanco³. Una vez que se adhiere el parásito a la membrana de la célula hospedera, se genera una horadación local en la membrana de la célula de aproximadamente 1 µm de diámetro a través de la cual el parásito se internaliza mediante movimiento de tipo tornillo, pero el mecanismo por el cual se da esta horadación aún permanece sin ser establecido³⁹. Un posible candidato que puede facilitar la formación de la horadación es la proteína de roptrias ROP1 (inicialmente conocida como PEF, factor estimulador de la penetración), esta puede ser responsable de la horadación de la membrana de la célula hospedero gracias a la formación de complejos moleculares que presentan una carga asimétrica con el extremo amino terminal altamente ácido y el carboxilo terminal básico^{40, 41}. ROP1 al interior de la roptría, es un zimógeno que es procesado gracias a la acción enzimática de la serinproteasa SUB2, la cual se sigue que puede procesar a ROP1 antes de su secreción para activarla⁴².

6.5 Los gránulos densos y establecimiento de la infección intracelular

Conforme el parásito penetra la célula hospedero, se da la formación de una vacuola parasitofora (VP) (Figura 12 pasa 4). Al interior de esta VP, los parásitos secretan el contenido de los gránulos densos para formar una red vesículo-tubular (RVT) que envuelve a los parásitos. Tanto la exocitosis del contenido de los gránulos densos como la liberación de los productos secretados en forma de vesículas multilamelares por un proceso de “capping” hacia el extremo posterior del parásito contribuyen a la formación de esta RVT⁴³.

Al interior de estos gránulos densos se alojan las proteínas GRA; estas, son consideradas un grupo de proteínas relativamente pequeñas entre 21 y 50 kDa, con una secuencia *N*-terminal característica para este grupo de proteínas; en general, estas no presentan similitud con ninguna familia de proteínas conocidas en algún otro *Phylum* aunque presenta numerosos ortólogos en otros apicomplexa como *Plasmodium* y *Neospora*⁴⁴.

Hasta la fecha, solo una pequeña fracción de las proteínas de estos gránulos densos han sido identificadas y se conoce muy poco sobre su papel durante los diferentes eventos de la invasión y establecimiento de la infección intracelular⁴⁵. Al interior de los gránulos densos se han identificado un total de 21 proteínas GRA que van de la proteína GRA1 a la proteína GRA25, donde las proteínas GRA11 y GRA13 son consideradas actualmente productos del procesamiento de GRA14⁴⁶ mientras que las proteínas GRA17 y GRA18 fueron reportadas como anotaciones erróneas de otras proteínas GRA⁴⁷.

Todas estas proteínas son consideradas como antígenos de excreción-secreción (ESP) con una secuencia señal de 25 a 30 aminoácidos excepto para GRA3 y GRA6 que permite que estas proteínas se dirijan a la vía secretoria del parásito⁴⁶. Achbarou y colaboradores (1991) utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales caracterizaron las proteínas GRA1 de 27 kDa, GRA2 de 28 kDa, GRA3 de 30 kDa y GRA4 de 40 kDa, las cuales se encuentran en los gránulos densos al interior del parásito y en la red vesículo-tubular (RVT) al interior de la VP⁴⁸. GRA1, se encuentra en los gránulos densos tanto de taquizoítos como de bradizoítos y presenta capacidad para la unión a Ca^{2+} , lo cual sugiere su importancia fisiológica durante el proceso de invasión. Esta proteína, se encuentra tanto asociada a la RVP como en forma soluble al interior de la VP⁴⁹.

Por otra parte, GRA2 es reconocida por el anticuerpo monoclonal TG17.179 al interior de los gránulos densos y como un producto de secreción al interior de la VP luego de la invasión celular. El análisis de la secuencia de la proteína revela una alta tasa de residuos de serina y treonina lo cual indica que esta proteína puede ser objeto de O-glicosilación⁵⁰. GRA2 tiene en su secuencia dos alfa hélices de naturaleza anfipática y es secretada por un sistema multilamelar que forma una invaginación especializada en la parte posterior del parásito luego de la invasión celular. Se ha propuesto que la naturaleza anfipática de GRA2 permite su interacción con la RVT ubicada en el espacio intravacuolar cuya función aun es desconocida⁵¹. GRA2 forma complejos con las proteínas GRA4 y GRA6, el cual pueden estar implicado en el transporte de nutrientes o proteínas al interior de la VP. GRA3, es una proteína que es deposita en la VP luego de la invasión celular. Esta se asocia tanto a la membrana de la VP como a una serie de extensiones de la membrana vacuolar que se distribuyen a lo largo de todo el citoplasma de la célula hospedero. Esta proteína, presenta un motivo KKXX que permite la asociación de la proteína con la membrana de la VP y posiblemente con el retículo endoplásmico de la célula hospedero⁵². Así mismo, se ha demostrado que puede interactuar con la proteína CAMLG (*calcium modulating ligand*) una proteína integral de membrana la cual está implicada en la transducción de señales mediada por calcio. Se ha propuesto que esta interacción es posiblemente responsable de la inhibición de la apoptosis en la célula hospedero⁵³.

Por su parte la proteína GRA4, se distribuye tanto a través del lumen de la VP como una proteína asociada a la red vesículo-tubular al interior de la vacuola, se encuentra en interacción con la proteína GRA6, la cual depende a su vez de interacciones hidrofóbicas.

Este complejo GRA4-GRA6, presenta alta afinidad por la proteína GRA2 lo cual puede generar la estabilización de la red vesículo-tubular al interior de la VP^{46, 54}. En un análisis de doble híbrido se demostró que los productos génicos de GRA4 pueden interactuar con las proteínas CFL1 (*Cofilin1*) una proteína de unión a actina que modula la polimerización de filamentos de actina inhibiendo la polimerización de actina G⁵⁵. Estos ensayos, también demostraron una asociación con la piruvato cinasa, la proteína TIMM50 (*inner mitochondrial membrane 50*); lo cual sugiere que estas interacciones, pueden estar involucradas en la asociación de la VP con la mitocondria de la célula hospedero⁴⁶.

Mientras tanto, la proteína GRA5, también denominada p21, es una proteína de 21 kDa que se encuentra en la VP luego de la invasión. La secuencia de esta proteína presenta un péptido señal de 25 aminoácidos y dos regiones altamente hidrofóbicas que sugieren la presencia de un dominio transmembranal⁵⁶. Se ha demostrado que los productos génicos de GRA5 pueden interactuar con las proteínas CALMG (*calcium modulating ligand*), SGTA (*small glutamine-rich tetrapeptide (TRP)-containing alpha*), lo cual puede formar parte del mecanismo de inhibición de la apoptosis en las células hospedero⁵⁵.

La proteína GRA6, es una proteína de 32 kDa que se localiza en los gránulos densos, en la VP y que se encuentra estrechamente asociada a la RVT⁵⁶. Esta proteína presenta un dominio hidrofóbico central flanqueado por dos dominios hidrofílicos. Además, presenta un dominio C-terminal rico en glicinas, lo cual indica que puede tener un papel estructural al interior de la RVT⁵⁷. Se ha demostrado que el tráfico y la localización intracelular de la proteína GRA6, dependen de su dominio N-terminal, el cual al ser eliminado permite que la proteína se localice en la membrana plasmática del pasito. Así mismo, este dominio es capaz de interactuar con lípidos de carga negativa lo cual puede ser crucial para la asociación de GRA6 con la red vesículo-tubular y con la membrana de la VP⁵⁸.

Por otro lado, la proteína GRA7, también denominada p29, luego de la invasión de la célula hospedero por parte del taquizoíto, se acumula en la VP y en la membrana de la VP, mientras que en las células infectadas con bradizoítos se localiza en el citoplasma de la célula hospedero⁵⁹. Esta, presenta un pequeño dominio hidrofóbico, que aparentemente determina su asociación con membranas celulares tanto del parásito como de la célula hospedero⁴⁶. La proteína de gránulos densos 8 (GRA8), es una proteína de 38 kDa que es liberada en la VP poco después de la invasión celular. Esta, se asocia con la parte interna de la membrana de la VP. No presenta una homología significativa con ninguna otra proteína conocida, aunque presenta tres dominios ricos en prolina hacia el centro de la secuencia y un dominio C-terminal que puede servir como un dominio transmembranal⁶⁰. Se ha demostrado por medio de ensayos de doble híbrido que esta proteína en células HeLa puede interactuar con las proteínas timidin quinasa 1, alfa actina 1, cadherina 24, citocromo b5 reductasa, hidroxiacil-coenzima A II y la ATP sintetasa entre otras⁵⁵. Esta proteína, induce una fuerte respuesta de anticuerpos en humanos y es considerada una posible herramienta para el desarrollo de estrategias diagnósticas^{61, 62}. Por otra parte, la proteína GRA9 o B10, es una proteína de 318 aminoácidos con una masa de 41 kDa. GRA9 se encuentra al interior de la VP y al igual que otras proteínas GRA, esta se asocia con las prolongaciones derivadas de la VP que se distribuyen a lo largo del citoplasma de la célula hospedero. Así mismo, esta proteína se asocia con la red vesículo-tubular al interior de la VP⁶³. A diferencia de GRA2, GRA9 no es liberada por medio de una invaginación especializada en la parte posterior de la célula de *Toxoplasma*, si no que se libera al espacio intravacuolar por la parte anterior del parásito.

Esta proteína se presenta tanto en forma soluble como en forma insoluble al interior de los gránulos densos y se ha detectado una proteína homóloga en *Neospora caninum* que se expresa preferentemente en el estado de bradizoíto⁶⁴.

GRA10, es una proteína de gránulos densos de 36 kDa que es considerada una de las principales proteínas de excreción/secreción del parásito luego de la invasión de la célula hospedero, esta se encuentra tanto en la VP, como asociada a la membrana de la VP⁶⁵. Se ha demostrado que GRA10 se puede asociar al núcleo de células HeLa y puede ser translocada al nucléolo gracias a una secuencia de localización nucleolar (NoLS) presente en la estructura primaria de su secuencia⁶⁶. Esta proteína no presenta una marcada homología con otras proteínas conocidas. Adicionalmente tiene dos posibles dominios transmembranales y un motivo RGD ubicado entre los dominios transmembranales^{65, 66}. Aparentemente se asocia a la proteína TAF1B (*TATA-binding protein associated factor 1B*) lo cual sugiere que GRA10 participa en las modificaciones de la síntesis del rRNA de las células hospedero luego de la invasión celular⁶⁶.

La proteína GRA12 de 49 kDa, no presenta homología con otras proteínas conocidas. Tiene una distribución similar a GRA2 y GRA6, pero es liberada al lumen de la VP desde el extremo anterior del parásito poco después de la invasión celular. Ya en la VP, esta proteína se asocia con la red vesículo-tubular y también puede encontrarse en forma soluble como en forma insoluble al interior de la vacuola⁶⁷. Se ha detectada como parte de complejos moleculares formados por las proteínas RON, la cual se asocia a la proteína AMA1 durante la invasión y se ha determinado que *in vitro* puede asociarse a la maquinaria de invasión del parásito; así mismo, se ha encontrado una proteína homóloga como parte del proteoma de las roptrías aunque su localización celular y función no son claras⁶⁷⁻⁶⁹.

Por su parte, GRA14, se encuentra asociada a la red vesículo tubular y a la membrana de la VP como una proteína transmembranal, con su dominio C-terminal hacia el citoplasma de la célula hospedero y su dominio N-terminal hacia el lumen de la VP. Aunque su función es desconocida, experimentos de co-infección con parásitos knockout indican que GRA14 puede ser transportada de una VP a otra durante la infección tisular⁴⁵.

Por otra parte, la proteína GRA15, se encuentra codificada en un gen altamente polimórfico ubicado en el cromosoma 10 del genoma de *T. gondii*⁷⁰. Esta proteína, es liberada al interior de la célula hospedero luego de la invasión celular y se ha demostrado que se encuentra relacionada con la modulación de la expresión génica de NFκβ al interior de la célula hospedero^{70, 71}, lo cual genera un cambio en la expresión de moléculas como IL12, el receptor a CD40 e IL1β^{71, 72}, las cuales están involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria durante la infección por *Toxoplasma*⁷³.

La proteína GRA16, tiene en su secuencia un dominio PEXEL (RRLAE) involucrado en la maduración y transporte de ciertas proteínas en el grupo de los apicomplexas⁷⁴. Esta proteína se asocia al factor ASP5, que se encarga de la maduración y transporte de la proteína desde el parásito hacia la célula hospedero⁷⁵. GRA16, presenta dominios de transporte nuclear y se asocia con la proteína PP2A de la célula hospedero, lo cual permite su transporte al interior del núcleo de esta. Al interior del núcleo, GRA16 se asocia a la proteína HAUSP, una proteasa de ubiquitina relacionada con la supresión de P53⁷⁶. GRA16, está involucrada en la retención de la célula hospedero en la fase G2/M del ciclo celular, por medio de la desregulación de la ciclina B1, una molécula clave en la regulación del ciclo celular durante la infección intracelular por *Toxoplasma*^{76, 77}.

Las proteínas GRA19, GRA20 y GRA21, también presentan un dominio homólogo al dominio PEXEL, que está involucrado con la maduración de la proteína pero no con su transporte a la célula hospedero. Estas tres proteínas de gránulos densos han sido poco caracterizadas. Se ha visto que durante la infección intracelular, estas se encuentran asociadas a la cara externa de la membrana de la VP por medio de una interacción proteína-proteína, en donde forman un complejo de función desconocida.

Las tres proteínas co-localizan con GRA7 al interior de los gránulos densos en taquizoítos extracelulares, pero hasta la fecha la función de estas proteínas y su papel en el ciclo de vida del parásito permanece incierta^{47, 78}.

Por otra parte, GRA22 es una proteína ubicada en el interior de gránulos densos de taquizoítos y bradizoítos⁴⁷. Se ha detectado en la pared quística de los quistes tisulares, pero no se encuentra asociada con la membrana de la VP. Se ha propuesto que regula el proceso de exteriorización del parásito de la célula hospedero, ya que los parásitos knock-out para GRA22 presentan tiempos de exteriorización más rápidos después de la exposición a ionóforos para calcio, lo cual sugiere que GRA22 puede estar involucrada en la regulación de este proceso durante la invasión intracelular⁷⁹.

Entre tanto, GRA23 es una proteína de 21 kDa que se encuentra asociada a la membrana de la VP y a la RVT al interior de la vacuola. Esta proteína co-localiza con las proteínas GRA4 y GRA7, y se ha sugerido que puede estar implicada en la remodelación de la membrana de la VP y de la RVT⁸⁰.

La proteína GRA24 de 64 kD, es secretada desde la VP hacia el núcleo de la célula hospedero gracias a su asociación con la proteína ASP5⁷⁵. Al interior del núcleo, GRA24 se asocia con la MAP cinasa p38 α , lo cual favorece la desregulación de factores como ERG1 y c-Fos. Esto, permite la modulación de citocinas proinflamatorias como IL12 y quimocinas como MCP1, que están involucradas con la virulencia del parásito y el mantenimiento de la infección⁸¹.

Finalmente, la proteína GRA25, es una fosfoproteína presente en los gránulos densos, cuya masa aproximada es de 48 kDa, aunque existe una pequeña diferencia de peso entre las poblaciones clonotípicas I y II de unos pocos aminoácidos. Esta proteína, se encuentra asociada a la membrana de la VP, y se ha demostrado que es un factor de virulencia clave para el desarrollo de la infección, así como un inmunomodulador ya que la expresión de GRA25 regula la expresión de las quimocinas CCL2 Y CXCL1⁸².

6.6 La invasión celular y los componentes del citoesqueleto

Junto con la secreción de micronemos, roptrías y gránulos densos, la motilidad por deslizamiento es un aspecto clave en el proceso de invasión de la célula hospedero. Este movimiento que permite tanto el desplazamiento sobre la membrana de la célula blanco como su penetración es denominado *gliding motility*⁸³. Debido a que *Toxoplasma* carece de organelos motores como flagelos, membranas ondulantes o cilios, desarrolla este tipo de motilidad que requiere la adhesión al sustrato y deslizamiento con giros en el sentido de las manecillas del reloj⁸⁴⁻⁸⁶. Los mecanismos moleculares que inducen la motilidad en presencia de la célula hospedero no se han esclarecido a la fecha. Pese a esto, se han desarrollado modelos de inducción de la motilidad *in vitro* utilizando como agonistas tripsina, ionoforos para calcio y potasio, así como proteínas presentes en el suero bovino fetal^{87, 88}.

Este mecanismo de *gliding*, (Figura 12 pasos 1 y 5) está estrechamente relacionado con el citoesqueleto del parásito, el cual es una estructura altamente compleja, conformada por el películo, un sistema trimembranal que incluye la membrana plasmática y un complejo membranal interno característico del grupo de los *Alveolata*⁸⁹. Asociado a este complejo de membranas se encuentra un sistema de microtúbulos subpeliculares, que determina la forma del parásito, pero que no se encuentra implicado directamente en la motilidad del parásito^{90,91,92}. Sumado estos dos sistemas se encuentra una red de filamentos semejantes a filamentos intermedios, la cual presenta actina y otras proteínas características del citoesqueleto de este parásito⁹²⁻⁹⁴.

Asociado a estos componentes del citoesqueleto se encuentra un motor de actina miosina denominado glideosoma, el cual es el responsable de la motilidad por deslizamiento durante los eventos de invasión e internalización del parásito^{92,95,96}.

Este motor se caracteriza por la presencia de un grupo especial de miosinas denominada miosinas de clase XIV (MyoA) que se encuentra altamente conservada a lo largo del grupo de los⁹⁷; estas, junto con la cadena ligera de la miosina (MLC1) son las responsables de generar la fuerza durante el movimiento de deslizamiento ó *gliding*⁹⁸.

Los componentes que sustentan el anclaje y la motilidad del parásito, se encuentra en el espacio que existe entre la membrana plasmática y el complejo membranal interno gracias a las proteínas GAP45, la cual ha demostrado ser clave en la regulación y ensamblaje del complejo por medio de procesos de fosforilación y a GAP50, una proteína integral de membrana que se encuentra en el complejo membranal interno y que sirve con andamio para el mantenimiento del complejo^{99,100}.

De la misma forma, este evento de motilidad, requiere la polimerización de actina en filamentos, cuya dinámica en el caso de los apicomplexas está estrictamente regulada por diferentes factores como son, el factor despolimerizador de actina (Tg-ADF) y la proteína Formina (TgFRM3), las cuales se expresan en todos los estadios invasivos del parásito^{101,102}.

Una vez activada la motilidad, se dispara un segundo proceso dinámico consecutivo al deslizamiento denominado extrusión del conoide (Figura 14). Este, es un evento clave en el proceso de invasión activa en el cual el parásito extiende el extremo apical a manera de estilete sobre la membrana celular para censar el sitio en el cual llevar a cabo la invasión.

Este evento está estrechamente relacionado con la secreción de roptrías, lo cual facilita un proceso de invasión exitosa^{11,26,103}. Este evento dinámico puede ser inducido aun en ausencia de la célula hospedero, para esto, se han utilizado diversos agonistas como inoforos para calcio¹⁰⁴, lo cual sugiere fuertemente que este proceso es dependiente de la dinámica de calcio al interior de los depósitos de este cation presentes en el taquizoíto^{104,105}.

Se ha demostrado que la extrusión del conoide, es un evento dependiente de la participación de la fosfolipasa C (PLPC), y que durante este evento ocurre la formación de inositol trifosfato, un incremento intracelular de calcio y la activación de una proteína homóloga a PKC²⁶; de la misma forma se ha demostrado que uso de fármacos que modifican la dinámica de componentes del citoesqueleto como filamentos de actina o inhibidores de la actividad ATPasa de la miosina, ha permitido sugerir que estos componentes del citoesqueleto son los responsables de la motilidad, pero que esta no depende de la acción de calmodulina ó de microtúbulos^{26,104}.

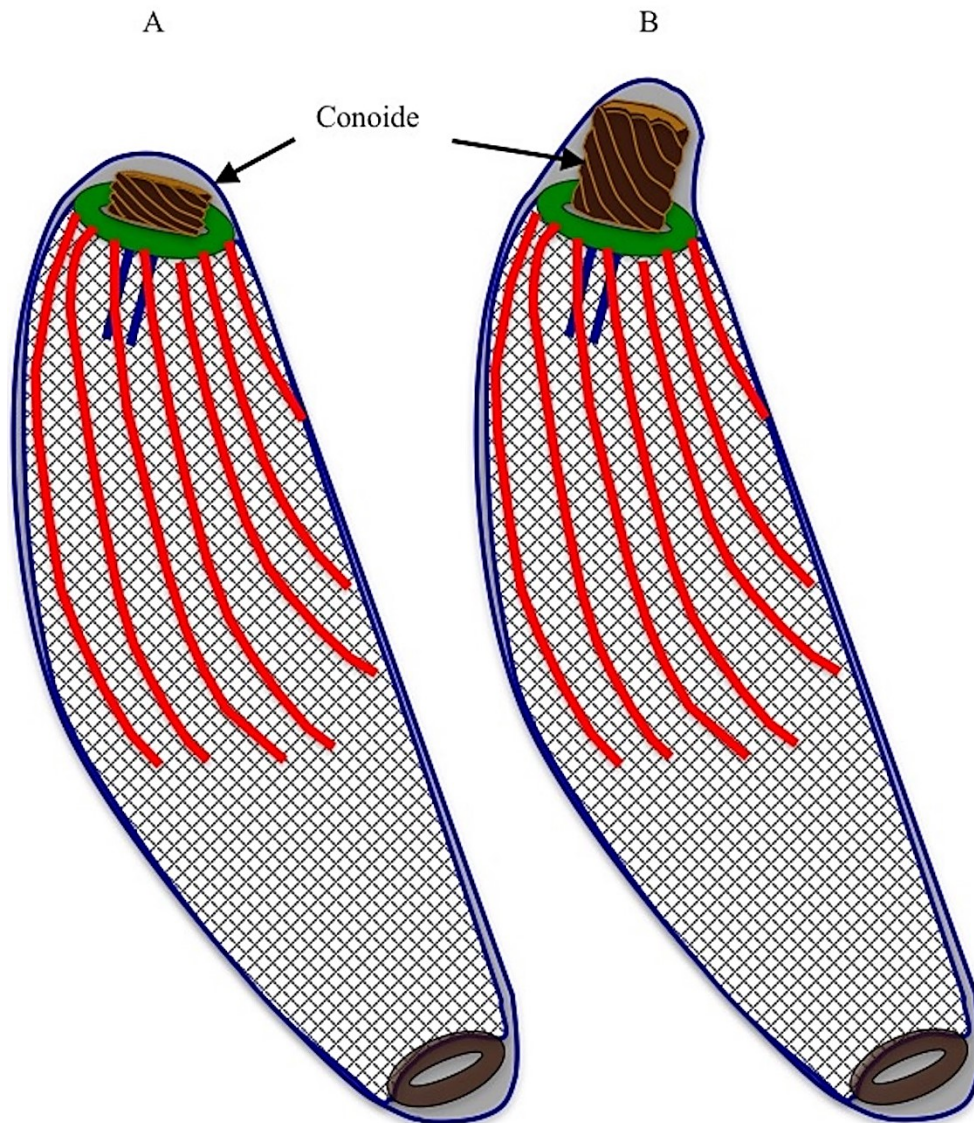


Figura 14 Extrusión del conoide (A) Diagrama de un taquizoito en reposo con el conoide introducido; (B) Diagrama de un taquizoito activado con el conoide extruido.

6.7 Agradecimientos

El presente capítulo se realizó con apoyo de la Fundación Miguel Alemán A.C. otorgado a Ricardo Mondragón Flores. Agradecemos a la QFB Sirenia González de la Unidad de Microscopía Electrónica LANSE del CINVESTAV.

6.8 Referencias

1. Weidner JM, Barragan A. Tightly regulated migratory subversion of immune cells promotes the dissemination of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2014, 44:85-90.
2. Sharma P, Chitnis CE. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 2013, 16:432-437.

3. Jones TC, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* 1972, 136:1173-1194.
4. Mauel J. [Mechanisms of intracellular microbicide]. *Bull. Europ. Physiopathol. Resp.* 1983; 19:115-122.
5. Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 1985, 315:416-419.
6. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10:766-778.
7. Werk R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev. Infect. Dis.* 1985, 7:449-457.
8. Denkers EY. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003, 39:193-203.
9. Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol. Rev.* 2011, 240:72-91.
10. Furtado GC, Cao Y, Joiner KA. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 1992, 60:4925-4931.
11. Carruthers VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol. Int.* 1999, 48:1-10.
12. Brossier F, David Sibley L. *Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005, 37:2266-2272.
13. Sheiner L, Santos JM, Klages N, et al. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Mol. Microbiol.* 2010, 77:912-929.
14. Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31:1293-1302.
15. Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO Journal.* 2003, 22:2082-2090.
16. Garcia-Reguet N, Lebrun M, Fourmaux MN, et al. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microb.* 2000, 2:353-364.
17. Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An. Acad. Brasil. Cienc.* 2006, 78:271-291.

18. Kessler H, Herm-Gotz A, Hegge S, et al. Microneme protein 8--a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 2008, 121(Pt 7):947-956.
19. Brecht S, Carruthers VB, Ferguson DJ, et al. The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:4119-4127.
20. Marchant J, Cowper B, Liu Y, et al. Galactose recognition by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 2012, 287:16720-16733.
21. Saouros S, Dou Z, Henry M, Marchant J, Carruthers VB, Matthews S. Microneme protein 5 regulates the activity of *Toxoplasma* subtilisin 1 by mimicking a subtilisin prodomain. *J. Biol. Chem.* 2012, 287:36029-36040.
22. Lagal V, Binder EM, Huynh MH, et al. *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites. *Cell Microb.* 2010, 12:1792-1808.
23. Carruthers VB, Tomley FM. Microneme proteins in apicomplexans. *Sub-cell. Biochem.* 2008, 47:33-45.
24. Carruthers VB, Moreno SN, Sibley LD. Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca²⁺] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. J.* 1999, 342 (Pt 2):379-386.
25. Wetzel DM, Chen LA, Ruiz FA, Moreno SN, Sibley LD. Calcium-mediated protein secretion potentiates motility in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 2004, 117(Pt 24):5739-5748.
26. Del Carmen MG, Mondragon M, Gonzalez S, Mondragon R. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 2009, 11:967-982.
27. Plattner H, Sehring IM, Mohamed IK, et al. Calcium signaling in closely related protozoan groups (Alveolata): non-parasitic ciliates (*Paramecium*, *Tetrahymena*) vs. parasitic Apicomplexa (*Plasmodium*, *Toxoplasma*). *Cell Calcium.* 2012, 51:351-382.
28. Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 1997, 73:114-123.
29. Liu L, Tucker SC, Satir BH. *Toxoplasma* PRP1 is an ortholog of parafusin (PFUS) in vesicle scaffold assembly in Ca(2+)-regulated exocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* 2009, 88:301-313.
30. Matthiesen SH, Shenoy SM, Kim K, Singer RH, Satir BH. Role of the parafusin orthologue, PRP1, in microneme exocytosis and cell invasion in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microb.* 2003, 5:613-624.
31. Bullen HE, Jia Y, Yamaro-Botte Y, et al. Phosphatidic Acid-Mediated Signaling Regulates Microneme Secretion in *Toxoplasma*. *Cell Host Micro.* 2016, 19:349-360.
32. Roiko MS, Svezhova N, Carruthers VB. Acidification Activates *Toxoplasma gondii* Motility and Egress by Enhancing Protein Secretion and Cytolytic Activity. *PLoS Pathog.* 2014, 10(11):e1004488.

33. Liu J, Pace D, Dou Z, et al. A vacuolar-H(+)-pyrophosphatase (TgVP1) is required for microneme secretion, host cell invasion, and extracellular survival of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 2014, 93:698-712.
34. Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Ann. Rev. Microbiol.* 2015, 69:463-485.
35. Parussini F, Tang Q, Moin SM, Mital J, Urban S, Ward GE. Intramembrane proteolysis of *Toxoplasma* apical membrane antigen 1 facilitates host-cell invasion but is dispensable for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012, 109:7463-7468.
36. J MS, Graindorge A, Soldati-Favre D. New insights into parasite rhomboid proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2012, 182:27-36.
37. Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Path.* 2005, 1(2):e17.
38. Parker ML, Penarete-Vargas DM, Hamilton PT, et al. Dissecting the interface between apicomplexan parasite and host cell: Insights from a divergent AMA-RON2 pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016, 113:398-403.
39. Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp. Parasitol.* 1999, 92:87-99.
40. Nichols BA, Chiappino ML, O'Connor GR. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 1983, 83:85-98.
41. Ossorio PN, Schwartzman JD, Boothroyd JC. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 50:1-15.
42. Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr. Op. Microbiol.* 2007, 10:582-587.
43. Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 1995, 108 (Pt 4):1669-1677.
44. Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all Apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 2005, 35:829-849.
45. Rome ME, Beck JR, Turetzky JM, Webster P, Bradley PJ. Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 2008, 76:4865-4875.
46. Nam HW. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J. Parasitol.* 2009, 47 Suppl:S29-37.

47. Mercier C, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol.* 2015, 31:60-71.
48. Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Sadak A, et al. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 1991, 103 Pt 3:321-329.
49. Cesbron-Delauw MF, Guy B, Torpier G, et al. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, 86:7537-7541.
50. Zinecker CF, Striepen B, Tomavo S, Dubremetz JF, Schwarz RT. The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998, 97:241-246.
51. Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Sibley LD. The amphipathic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J. Cell Sci.* 1998, 111 (Pt 15):2171-2180.
52. Henriquez FL, Nickdel MB, McLeod R, et al. *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitol.* 2005, 131(Pt 2):169-179.
53. Kim JY, Ahn HJ, Ryu KJ, Nam HW. Interaction between parasitophorous vacuolar membrane-associated GRA3 and calcium modulating ligand of host cell endoplasmic reticulum in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean J. Parasitol.* 2000, 46:209-216.
54. Karsten V, Qi H, Beckers CJ, et al. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J. Cell Biol.* 1998, 141:1323-33.
55. Ahn HJ, Kim S, Kim HE, Nam HW. Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean J. Parasitol.* 2006, 44:303-12.
56. Lecordier L, Mercier C, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.* 1999, 10:1277-87.
57. Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30:637-42.
58. Gendrin C, Bittame A, Mercier C, Cesbron-Delauw MF. Post-translational membrane sorting of the *Toxoplasma gondii* GRA6 protein into the parasite-containing vacuole is driven by its N-terminal domain. *Int. J. Parasitol.* 2010, 40:1325-34.
59. Bonhomme A, Maine GT, Beorchia A, et al. Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.* 1998, 46:1411-22.

60. Carey KL, Donahue CG, Ward GE. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000, 105:25-37.
61. Babaie J, Zare M, Sadeghiani G, Lorgard-Dezfuli M, Aghighi Z, Golkar M. Bacterial production of dense granule antigen GRA8 of *Toxoplasma gondii*. *Iran Biomed. J.* 2009, 13:145-51.
62. Koethe M, Pott S, Ludewig M, et al. Prevalence of specific IgG-antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic turkeys determined by kinetic ELISA based on recombinant GRA7 and GRA8. *Vet. Parasitol.* 2011, 180:179-90.
63. Adjogble KD, Mercier C, Dubremetz JF, et al. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int. J. Parasitol.* 2004, 34:1255-64.
64. Marugan-Hernandez V, Alvarez-Garcia G, Risco-Castillo V, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. *Proteomics.* 2010, 10:1740-50.
65. Ahn HJ, Kim S, Nam HW. Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2005, 331:614-20.
66. Ahn HJ, Kim S, Nam HW. Nucleolar translocalization of GRA10 of *Toxoplasma gondii* transfected in HeLa cells. *Korean J. Parasitol.* 2007, 45:165-74.
67. Michelin A, Bittame A, Bordat Y, et al. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *Int. J. Parasitol.* 2009, 39:299-306.
68. Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, et al. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:34245-58.
69. Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, et al. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Path.* 2011, 7(2):e1001276.
70. Rosowski EE, Lu D, Julien L, et al. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J. Exp. Med.* 2011, 208:195-212.
71. Gov L, Karimzadeh A, Ueno N, Lodoen MB. Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. *mBio.* 2013, 4(4). pii: e00255-13. doi: 10.1128/mBio.00255-13
72. Morgado P, Sudarshana DM, Gov L, et al. Type II *Toxoplasma gondii* induction of CD40 on infected macrophages enhances interleukin-12 responses. *Infect. Immun.* 2014, 82:4047-55.
73. Bougdour A, Tardieux I, Hakimi MA. *Toxoplasma* exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewrites the host genome expression. *Cell Microb.* 2014, 16:334-43.

74. Alexandre JS, Yahata K, Kawai S, Torii M, Kaneko O. PEXEL-independent trafficking of *Plasmodium falciparum* SURFIN4.2 to the parasite-infected red blood cell and Maurer's clefts. *Parasit. Int.* 2011, 60:313-20.
75. Curt-Varesano A, Braun L, Ranquet C, Hakimi MA, Bougdour A. The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells. *Cell Microb.* 2016. 18:151-67. doi: 10.1111/cmi.12498. Epub 2015 Sep 6.
76. Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, et al. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host Microb.* 2013, 13:489-500.
77. Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, et al. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microb.* 2008, 10:908-20.
78. Hsiao CH, Luisa Hiller N, Haldar K, Knoll LJ. A HT/PEXEL motif in *Toxoplasma* dense granule proteins is a signal for protein cleavage but not export into the host cell. *Traffic.* 2013, 14:519-31.
79. Okada T, Marmansari D, Li ZM, et al. A novel dense granule protein, GRA22, is involved in regulating parasite egress in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2013, 189:5-13.
80. Masatani T, Matsuo T, Tanaka T, et al. TgGRA23, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the parasitophorous vacuole membrane and intravacuolar network. *Parasit. Int.* 2013, 62:372-9.
81. Braun L, Brenier-Pinchart MP, Yogavel M, et al. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *J. Exp. Med.* 2013, 210:2071-86.
82. Shastri AJ, Marino ND, Franco M, Lodoen MB, Boothroyd JC. GRA25 is a novel virulence factor of *Toxoplasma gondii* and influences the host immune response. *Infect. Immun.* 2014, 82:2595-605.
83. Sibley LD. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr. Op. Biotech.* 2010, 21:592-8.
84. Vanderberg JP. Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. *J. Protozool.* 1974, 21:527-37.
85. Augustine PC. Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31:1-8.
86. Combe A, Moreira C, Ackerman S, Thiberge S, Templeton TJ, Menard R. TREP, a novel protein necessary for gliding motility of the malaria sporozoite. *Int. J. Parasitol.* 2009, 39:489-96.
87. Mondragon R, Meza I, Frixione E. Divalent cation and ATP dependent motility of *Toxoplasma gondii* tachyzoites after mild treatment with trypsin. *J. Euk. Microbiol.* 1994, 41:330-7.
88. Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 1996, 84:933-9.

89. Chen AL, Kim EW, Toh JY, et al. Novel components of the *Toxoplasma* inner membrane complex revealed by BioID. *mBio*. 2015, 6(1):e02357-14.
90. Russell DG, Sinden RE. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J. Cell Sci*. 1981, 50:345-59.
91. Jensen JB, Edgar SA. Effects of antiphagocytic agents on penetration of *Eimeria magna* sporozoites into cultured cells. *J. Parasitol*. 1976, 62:203-6.
92. Gomez de Leon CT, Diaz Martin RD, Mendoza Hernandez G, Gonzalez Pozos S, Ambrosio JR, Mondragon Flores R. Proteomic characterization of the subpellicular cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Proteom*. 2014, 111:86-99.
93. Patron SA, Mondragon M, Gonzalez S, Ambrosio JR, Guerrero BA, Mondragon R. Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Int. J. Parasitol*. 2005, 35:883-94.
94. Hu K, Johnson J, Florens L, et al. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Path*. 2006, 2(2):e13.
95. Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol*. 2004, 14:528-32.
96. Drewry LL, Sibley LD. *Toxoplasma* Actin Is Required for Efficient Host Cell Invasion. *mBio*. 2015,6(3):e00557.
97. Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2006, 103(10):3681-6.
98. Frenal K, Soldati-Favre D. [The glideosome, a unique machinery that assists the Apicomplexa in gliding into host cells]. *Med. Sci*. 2013, 29:515-22.
99. Gilk SD, Gaskins E, Ward GE, Beckers CJ. GAP45 phosphorylation controls assembly of the *Toxoplasma myosin XIV* complex. *Euk Cell*. 2009, 8:190-6.
100. Fauquenoy S, Hovasse A, Sloves PJ, et al. Unusual N-glycan structures required for trafficking *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner membrane complex regulate host cell entry through parasite motility. *Mol. Cell. Proteom*. 2011, 10:M111 008953.
101. Yadav R, Pathak PP, Shukla VK, et al. Solution structure and dynamics of ADF from *Toxoplasma gondii*. *J. Struc. Biol*. 2011, 176:97-111.
102. Daher W, Klages N, Carlier MF, Soldati-Favre D. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* formin 3, an actin nucleator dispensable for tachyzoite growth and motility. *Euk. Cell*. 2012, 11:343-52.
103. Beck JR, Chen AL, Kim EW, Bradley PJ. RON5 is critical for organization and function of the *Toxoplasma* moving junction complex. *PLoS Path*. 2014,10(3):e1004025.

104. Mondragon R, Frixione E. Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Euk. Microb.* 1996, 43:120-7.
105. Moreno SN, Ayong L, Pace DA. Calcium storage and function in apicomplexan parasites. *Ess. Biochem.* 2011, 51:9G7-110.

7 Diseminación tisular

RAMÍREZ-FLORES, Carlos Jorge & MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo

Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, CDMX

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

7 Resumen

Toxoplasma gondii es uno de los parásitos más exitosos conocidos al momento, es capaz de infectar a múltiples organismos desde aves hasta humanos; además, puede infectar y replicarse dentro de prácticamente todas las células nucleadas. Su éxito en este planeta le es conferido por una eficiente estrategia de invasión a la célula hospedera y por su gran capacidad de diseminación a través de todo el organismo. Las barreras biológicas (hematoretiniana, hematoencefálica, placenta) son el principal mecanismo de defensa contra infecciones microbianas; sin embargo, el parásito logra atravesarlas infectando órganos inmunoprivilegiados ocasionando las patologías más severas.

El proceso de invasión del parásito ha sido estudiado extensamente; en contraste, poco se conoce con relación a la diseminación tisular. Para que el parásito logre llegar e infectar los órganos inmunoprivilegiados debe migrar y atravesar barreras biológicas posiblemente de dos maneras: a) adhiriéndose al epitelio, infectándolo o modificando las uniones intercelulares; o bien b) pasando dentro de leucocitos, camuflándose.

En los últimos años se ha elucidado el proceso de diseminación de algunos parásitos con igual virulencia que *Toxoplasma*. Los conocimientos recientes pudieran ser utilizados para extender el estudio hacia el parásito.

Toxoplasma gondii es considerado un parásito cosmopolita, tiene la capacidad de infectar prácticamente a todas las células nucleadas de los organismos de sangre caliente, incluido el humano ¹; actualmente se sabe que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por este parásito; sin embargo, gran parte de este grupo no lo sabe ².

Toxoplasma es un importante patógeno oportunista, causa infecciones congénitas en el feto, incluyendo retraso mental, ceguera, convulsiones y muerte. En mujeres embarazadas puede causar aborto ³; además, este parásito es el causante de encefalitis en individuos inmunocomprometidos ⁴ y coriorretinitis en individuos sanos ⁵. Para lograr estas condiciones patológicas, *Toxoplasma* debe llegar hasta estos órganos inmunoprivilegiados (placenta, cerebro y ojo) y debe atravesar barreras biológicas; sin embargo, el mecanismo molecular que el parásito utiliza para lograr infectar estos órganos está por ser elucidado.

En la actualidad se conoce que un número limitado de patógenos cuentan con mecanismos que les permiten atravesar barreras biológicas; sin embargo, un cierto número de microorganismos de alta virulencia como virus, bacterias, parásitos y hongos son capaces de cruzar barreras biológicas tan importantes e impermeables como la hemato-encefálica, la placentaria y el intestino, utilizando para ello diversas estrategias como el tráfico dentro de leucocitos, la transcitosis (migración transcelular) y la migración paracelular ^{6,7}. En el caso de parásitos como *Plasmodium* y *Eimeria*, los cuales pertenecen al mismo *phylum* que *Toxoplasma* (el *Apicomplexa*), se comparte la capacidad de atravesar barreras biológicas y distribuirse por todo el organismo hospedero.

Las barreras biológicas tienen la función de regular la permeabilidad de fluidos, manteniendo un balance homeostático mediante el sellamiento de los espacios paracelulares, de tal forma que se logra una polarización entre la zona apical y la basal de los epitelios. El funcionamiento de las barreras celulares está determinado por las uniones intercelulares, las cuales dependen de moléculas de adhesión ubicadas en las caras basolaterales de los epitelios y endotelios⁸.

Existen procesos fisiológicos que han resuelto la migración a través de las barreras celulares, uno de los más importantes corresponde el tráfico de leucocitos que se lleva a cabo por una transmigración celular ^{9,10}. El proceso de migración leucocitaria ha sido extensamente caracterizado y hoy en día se conocen las diferentes etapas involucradas y que incluyen una primera interacción entre los leucocitos y el endotelio vascular a través de moléculas de adhesión de naturaleza glicoproteica de poca afinidad conocidas como selectinas, seguido de una activación celular disparada por el reconocimiento de receptores integrinas que reconocen a moléculas de la **superfamilia de la inmunoglobulinas** ^{9,10}. Este evento trae como consecuencia la activación de la motilidad leucocitaria con cambio de forma y finalmente la diapédesis.

Todas las formas invasivas de *Toxoplasma* (esporozoíto, taquizoíto y bradizoíto) tienen la capacidad de invasión celular; sin embargo, el taquizoíto es la forma más invasiva, proliferativa y con mayor capacidad de diseminación tisular, en gran medida debido a su elevada propiedad dinámica y secretora que lo caracteriza. Una vez llevada a cabo la infección, *Toxoplasma* inicialmente cruza el epitelio intestinal, se disemina en los tejidos profundos y atraviesa barreras biológicas tales como la placenta y la barrera hematoencefálica, siendo precisamente estas ubicaciones donde el parásito ocasiona los daños más graves de la enfermedad ¹¹. Aquellos patógenos que logran atravesar estas barreras de defensa son aquellos que causan las patologías más severas. La alta capacidad migratoria de *Toxoplasma* se esquematiza en la Figura 15.

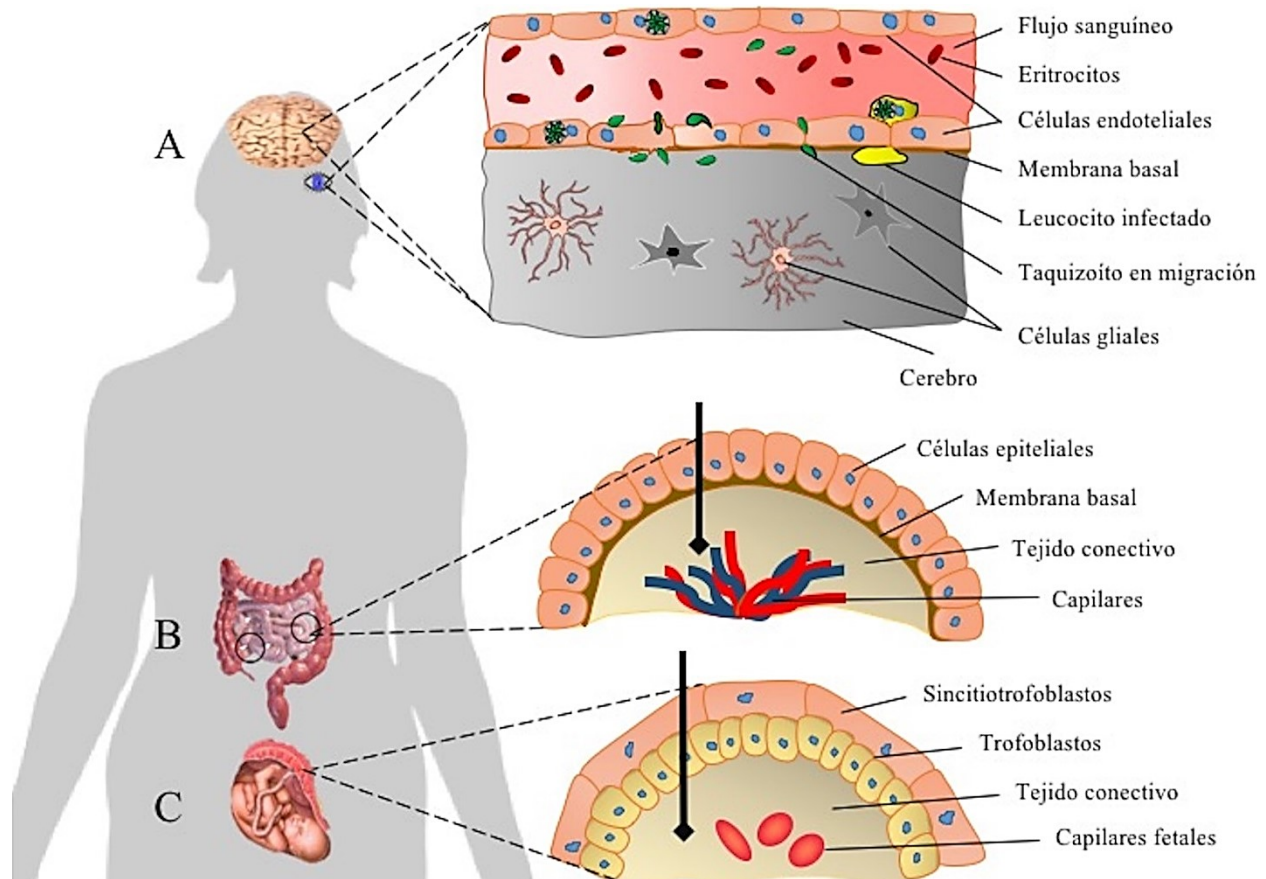


Figura 15 Migración del parásito *Toxoplasma gondii* a través de las barreras biológicas del organismo hospedero. *Toxoplasma* logra diseminarse por múltiples tejidos llegando a órganos inmunoprivilegiados como el cerebro y el ojo atravesando las barreras hemato-encefálica y hemoretiniana respectivamente (A); atraviesa el epitelio intestinal (B) e incluso es capaz de llegar al feto atravesando la barrera placentaria (C). Al inicio de la infección el parásito atraviesa el epitelio intestinal, el tejido conectivo y llega a los capilares; es aquí donde el parásito puede viajar por el torrente sanguíneo diseminándose por todo el organismo mediante diferentes métodos. El sentido de la migración de *Toxoplasma* a través de las barreras biológicas se representa por las flechas negras.

7.1 Poblaciones clonóticas de *Toxoplasma gondii* y su capacidad de diseminación

En ensayos *in vitro*, *Toxoplasma* es capaz de cruzar monocapas de células epiteliales y endoteliales unidireccionalmente desde la cara apical hacia la cara basolateral a través de un proceso que está asociado a su motilidad y virulencia¹¹. De hecho, la virulencia del parásito está asociada con sus propiedades genóticas. Mediante el análisis del genoma de *Toxoplasma*, mismo que se encuentra reportado en un sitio público de internet (www.Toxodb.org), se ha podido determinar con técnicas de amplificación de genes por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriores análisis con enzimas de restricción (RFLP), la existencia de tres poblaciones clonóticas de *Toxoplasma* clasificadas como tipo I, II y III, las cuales se caracterizan por tener diferentes grados de virulencia y distribución en diferentes hospederos^{12, 13}. Los taquizoítos del tipo I se asocian con una infección activa en el modelo murino y son altamente patogénicos; mientras que los del tipo II son medianamente virulentos ($LD_{50}=10^3-10^4$) y los del tipo III son de baja virulencia ($LD_{50}\geq 10^5$)¹³. De los aspectos más relevantes en las infecciones por parásitos tipo I (por ejemplo los de la cepa RH) es su alta capacidad de diseminación hacia múltiples tejidos, misma migración que es considerablemente menor en otras poblaciones clonóticas (tipo II y III)¹¹.

Los taquizoítos tipo I de *Toxoplasma*, son los de mayor distribución geográfica y en consecuencia los más caracterizados. Estos parásitos tipo I se diseminan rápidamente y alcanzan grandes cargas parasitarias en los tejidos aún a bajos inóculos^{14, 15}. Al ser los más virulentos, presentan una elevada capacidad de diseminación tisular *in vivo* en modelos de toxoplasmosis murina e *in vitro* en modelos de migración a través de monocapas de células crecidas en filtros y en cámaras de Boyden¹¹, migración que es mayor en comparación con las otras poblaciones clonotípicas (II y III)¹⁶. Los parásitos tipo I presentan también una gran capacidad para la transmigración *ex vivo* a través de intestino de ratón así como una penetración directa a la lámina propia y endotelio vascular¹¹.

7.2 Posibles mecanismos de diseminación de *Toxoplasma gondii* en el hospedero

Como se mencionó en líneas anteriores, la patogenia del parásito está potenciada por la alta capacidad que tiene para atravesar barreras biológicas e infectar diversos órganos, entre ellos los inmunoprivilegiados como el ojo y el cerebro; sin embargo, a la fecha se desconoce con certeza cómo se realiza este proceso. En la actualidad se ha propuesto que la migración de *Toxoplasma* pudiera estar dado por una migración tipo caballo de Troya, donde el parásito viajaría camuflado dentro de leucocitos¹⁷ (Figura 16); sin embargo, recientemente se ha demostrado que *Toxoplasma* penetra directamente al epitelio y a la matriz extracelular (MEC), lo cual nos indica que la migración a través de las barreras biológicas debe ser un proceso activo¹⁶ (Figura 16). Sin embargo, los determinantes genéticos que le permite la capacidad de migración tan efectiva con la que cuenta el parásito permanecen por ser esclarecidos.

Un modelo celular que se ha utilizado para estudiar la migración transepitelial por *Toxoplasma*, es la línea celular MDCK, la cual fue aislada originalmente de un riñón de perro. Estas células se caracterizan por conservar en cultivo las características típicas de un epitelio como son: polaridad celular así como la presencia de uniones intercelulares de anclaje, oclusoras y de contacto al substrato. Con base en los estudios de interacción entre taquizoítos de *T. gondii* y monocapas de células MDCK, se ha sugerido que *Toxoplasma* atraviesa los epitelios mediante el reconocimiento de la proteína ICAM-1, que es una molécula de adhesión intercelular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se encuentra distribuida en los endotelios vasculares y participa en la migración fisiológica de los leucocitos¹⁸. Este reconocimiento lo lleva a cabo el parásito mediante la proteína MIC2 que se asocia a la membrana plasmática de la célula hospedero durante el proceso de adhesión inicial. A la fecha se desconoce si los taquizoítos interactúan con las barreras endoteliales de la misma manera que con las células MDCK; al menos en monocapas de células MDCK, los parásitos se localizan en las cercanías a las uniones intercelulares¹⁸. Estudios más recientes han brindado información que corrobora que el parásito interacciona con el endotelio vascular, lo cual pudiera estar relacionado con su proceso de diseminación¹⁹. Incluso, se ha reportado que la presencia de bradizoítos en células de epitelio intestinal de ratón, altera la proteína de unión estrecha ocludina²⁰; este proceso llevado a cabo también por taquizoítos no afecta la integridad de la monocapa celular¹⁸.

En un estudio reciente se analizó el efecto de la infección por *Toxoplasma* en una estirpe de células de epitelio pigmentario retiniano (ARPE-19)²¹. Las células ARPE-19 juegan un papel crucial en la fisiología de la retina y la formación de la barrera hematoretiniana²². Puntualmente, como resultado de la infección con taquizoítos de *Toxoplasma* a células ARPE-19 (con una cepa altamente virulenta: RH), se evidenció un incremento en la permeabilidad de la monocapa celular. El resultado anterior se demostró al observar alteraciones en la proteína de unión estrecha ocludina, lo cual ocasionó la pérdida de la integridad de la monocapa celular desde estadios tempranos de la infección²¹. Además, la funcionalidad de las uniones intercelulares en monocapas de células ARPE-19 durante la infección de *Toxoplasma*, fue evaluada mediante la medición de la resistencia transepitelial. Se demostró un decremento en la resistencia transepitelial en aquellas monocapas que estuvieron en presencia de *Toxoplasma* desde la primera hora de infección en comparación con el control; para las cuatro horas post-infección el decremento fue diez veces menor al control²¹. Esta pérdida en la integridad de uniones estrechas se traduce en un incremento en la permeabilidad paracelular, sugiriendo que el parásito logra atravesar el epitelio contribuyendo al daño ocular, mismo daño que es visible en la toxoplasmosis ocular. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el parásito también utilice la vía transcelular para su migración; es decir, que *Toxoplasma* invada a la célula epitelial, prolifere y al romper a la célula durante su exteriorización pueda en consecuencia tener acceso a la lamina basal y tejido conectivo; de esta forma pudiera alcanzar los microcapilares para su diseminación por vía sanguínea¹⁶ (Figura 16).

En modelos murinos de infección oral, *Toxoplasma* invade, prolifera y atraviesa el epitelio intestinal, alcanzando el torrente sanguíneo para diseminarse a todos los tejidos del organismo, al atravesar la barrera hematoencefálica y la placentaria, ocasiona diferentes patologías como encefalitis y aborto, respectivamente²³ (Figura 15). Una vez en la circulación sanguínea, se desconoce si *Toxoplasma* se disemina como un parásito extracelular libre o si lo hace transportado por leucocitos infectados (que no destruyen al parásito a menos de que sean previamente activados por IFN- γ), los cuales pueden atravesar muchas barreras biológicas como parte de sus funciones de vigilancia inmunológica (Figura 16). El mecanismo por el cual *Toxoplasma* atraviesa los diferentes epitelios del organismo aún no queda claro. Reportes recientes en modelos de células epiteliales en cultivo, sugieren que el parásito puede utilizar la vía paracelular para su migración transepitelial, como se mencionó en líneas anteriores; es decir, que el parásito migra entre los espacios intercelulares lo cuales contienen moléculas y estructuras de adhesión^{16, 24} (Figura 16).

7.3 Diseminación sistémica de *Toxoplasma*

En modelos de toxoplasmosis murina inducidos por la infección intragástrica con quistes tisulares, se ha reportado la presencia de taquizoítos dentro de leucocitos en el intestino de ratón¹¹. Se han propuesto varias células que podrían participar en la diseminación tisular de *Toxoplasma* después de la liberación intragástrica de los parásitos con eventos celulares como sigue: 1) la diseminación temprana del parásito es llevada a cabo por células de estirpe monocítica CD11c+ presentes en la lámina propia del intestino y en nódulos linfáticos; 2) en la sangre, los parásitos se asocian con células CD11b+ muy probablemente monocitos y finalmente 3) los parásitos se han ubicado en células dendríticas y leucocitos recuperados de nódulos linfáticos mesentéricos y de sangre. Debido a que estas células se encuentran parasitadas, pueden desencadenar en consecuencia el proceso infeccioso cuando son transferidas intravenosamente a ratones sanos en los cuales migra y alcanza el cerebro¹¹. Esto indica que monocitos sanguíneos CD11b+ parasitados pueden migrar a través de la barrera hematoencefálica y promover la entrada del parásito en este órgano.

Estos datos dan soporte a la hipótesis de que el taquizoíto utiliza a los leucocitos para migrar y diseminarse *in vivo*. Sin embargo, no es claro si las células CD11c+ caracterizadas *in vitro* participan en la diseminación *in vivo* ya que se ha encontrado que después de la inoculación del parásito por la vía natural, las células CD11c+ se encuentran solamente en órganos linfoides secundarios y no en sangre. En ese mismo reporte se describió que los parásitos adquieren patrones diferentes de distribución intravacuolar cuando son mantenidos en condiciones *in vitro* que cuando se encuentran infectando al animal ¹¹.

Aún no queda claro cómo es que el parásito llega al torrente sanguíneo, a través del cual se disemina por todo el organismo hasta alcanzar tejidos alejados del sitio de infección original, como lo es el cerebro o el ojo (Figura 15). Ya sea llegar al torrente directamente desde el intestino o bien dentro de macrófagos infectadas como anteriormente se mencionó (Figura 16). Cualquiera que sea la forma en que *Toxoplasma* se disemina, es posible encontrar al parásito en el torrente sanguíneo del organismo hospedero a pocas horas de una infección oral en ratón ²⁵; además, lo anterior nos indica que el parásito es resistente a los factores del complemento ²⁶.

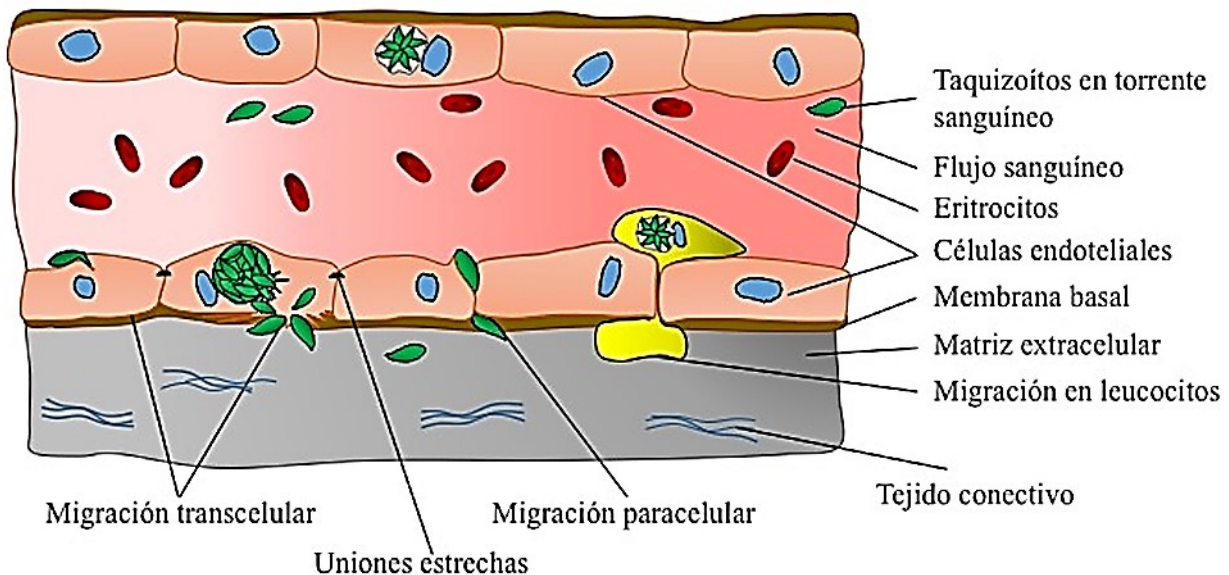


Figura 16 Posibles mecanismos de migración de *Toxoplasma gondii* a través de los epitelios. **Migración transcelular:** el parásito infectaría las células y saldría del otro lado del epitelio lisando a la célula, degradando así componentes de la MEC. **Migración paracelular:** *Toxoplasma* atravesaría el endotelio o epitelio mediante el espacio célula-célula, donde tendría que afectar las uniones intercelulares como las uniones estrechas. **Migración en leucocitos:** el parásito viajaría camuflado dentro de leucocitos (migración tipo caballo de Troya); los leucocitos pasan hacia el otro lado del epitelio al realizar su función de vigilancia inmunológica, acarreado así al parásito.

7.4 Posible papel de proteasas en el proceso de diseminación de *Toxoplasma*

A la fecha, algunos estudios han descrito que el parásito genera algunas modificaciones al macrófago hospedero que pudieran potenciar el proceso de diseminación. Algunas de estas modificaciones que se han estudiado se centran en la expresión de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) del hospedero ^{27, 28}. Estas MMPs son proteasas que han sido ampliamente estudiadas, y se conoce que su actividad está relacionada con migración celular y remodelación de la MEC. Lo anterior permite, por ejemplo, una migración de las células cancerosas hacia diferentes tejidos generando metástasis ²⁹.

En el caso de *Toxoplasma* se ha reportado que existe una expresión inducida de MMPs en el macrófago hospedero; posiblemente éstas moléculas están involucradas en el mecanismo por el cual *Toxoplasma* se disemina por todo el organismo e incluso hacia órganos inmunoprivilegiados. En estudios recientes se ha demostrado un incremento de una MMP (MMP-9) en sobrenadantes de cultivo días después de haber comenzado la infección por el parásito, así como el incremento de la secreción de las formas activas de algunas MMPs²⁷. Incluso, algunos estudios han demostrado que al inhibir las proteasas inducidas del hospedero se abolió la capacidad la migración de macrófagos infectados en substratos de Matrigel²⁸.

Posiblemente las proteasas estén jugando un papel muy importante en el proceso de diseminación del parásito hacia órganos inmunoprivilegiados, tal como lo hacen otros organismos con alta capacidad de diseminación y en los que se degrada la MEC por propia cuenta del patógeno para lograr la diseminación, por ejemplo: en *Entamoeba histolytica*, donde las proteasas facilitan la locomoción y diseminación de los trofozoítos invasores³⁰; en *Acanthamoeba spp* y *Trypanosoma brucei* se ha demostrado la degradación de componentes de la MEC por algunas proteasas, la cual le permite al patógeno diseminarse^{31,32}; en *Trichomonas vaginalis*, se han definido a algunas proteasas como factor de virulencia³³⁻³⁵; en *Trypanosoma cruzi*, componentes de MEC como colágena, heparán sulfato y laminina son destruidos por el parásito, mientras que fibronectina no es afectada³⁶. Sin embargo, para el caso de *Toxoplasma* casi nada se ha estudiado al respecto.

7.5 Proteínas accesorias en el proceso de diseminación

Todos los parásitos pertenecientes al grupo de apicomplexas tienen una serie de proteínas transmembranales conservadas pertenecientes a la familia conocida como TRAP (trhombospondin-related anonymous proteins). Estas proteínas que son almacenadas en organelos secretores y posteriormente son expuestas a la superficie del parásito. Estas proteínas tienen módulos adhesivos dentro de ectodominios compuestos por combinaciones de un dominio tipo integrina I/A y varias secuencias repetidas del tipo trombospodina (TSR). Notablemente las proteínas TRAP son esenciales para la motilidad e invasión de esporozoítos de *Plasmodium*, mientras que los dominios TSR y los I/A son importantes para infecciones productivas en los hospederos animales^{37,38}.

Se ha propuesto que la translocación de las moléculas TRAP vía la interacción con el citoesqueleto proporciona la fuerza para el “gliding” o deslizamiento del parásito y la invasión celular. En *Toxoplasma* la molécula homóloga de TRAP es la proteína MIC2 la cual es secretada apicalmente y translocada rápidamente en un proceso que depende del citoesqueleto de actina antes de ser liberada de la membrana por un proceso proteolítico, de hecho se reportó que los homólogos de TRAP están unidos al citoesqueleto a través del dominio C terminal con la proteína aldolasa unidora de actina^{39,40}.

Toxoplasma también puede inducir modificaciones en la distribución y funcionalidad de un tipo de unión intercelular conocido como unión comunicante o unión tipo gap. Las uniones comunicantes funcionan como canales intercelulares entre dos células adyacentes a través de los cuales se transfiere información química. Los canales están constituidos por los conexones, los cuales son los complejos multiproteicos que se organizan transitoriamente mediante la agrupación de seis proteínas conocidas como conexas, presentes en las membranas basolaterales y que permiten el paso de moléculas menores a 5 kDa. La infección de astrocitos con *Toxoplasma* produce una disminución en la expresión y acoplamiento de las conexas entre las células parasitadas, alterando en consecuencia la comunicación intercelular⁴¹.

Todavía quedan muchas preguntas por responderse en relación a las estrategias que utiliza este parásito a fin de asegurarse una exitosa distribución sistémica. El conocimiento de receptores y ligandos de unión que determinen el tropismo tisular permitirá diseñar en un momento dado estrategias moleculares que bloqueen la distribución tisular de los parásitos en órganos delicados como el cerebro y el ojo o incluso en ubicaciones biológicas como la placenta y el feto.

7.6 Agradecimientos

La presente investigación se realizó con el apoyo CONACYT al proyecto No. 155459 otorgado a Ricardo Mondragón Flores y la beca CONACYT otorgada a Carlos Jorge Ramírez Flores con número de registro 296155. Agradecemos a la QFB Mónica Edith Mondragón Castelán del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV, y a la QFB Sirenia González Pozos de la Unidad de Microscopia Electrónica del CINVESTAV (LANSE-CINVESTAV).

7.7 Referencias

1. Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2010.
2. Wyrosdick HM. & Schaefer JJ. *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. *Anim. Health Res. Rev.* 2015, 16:150-62.
3. Desmonts G. & Couvreur J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 1974, 290:1110-16.
4. Luft BJ., Hafner R., Korzun AH., Leport C., Antoniskis D., Bosler EM., Bourland DD., Uttamchandani R., Fuhrer J., Jacobson J., Morlat P., Vilde JL. & Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1993, 329:995-1000.
5. Roberts F. & McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol. Today.* 1999, 15:51-7.
6. Kerr JR. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *Mol. Pathol.* 1999, 52:220-30.
7. Huang SH. & Jong AY. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol.* 2001, 3:277-87.
8. Tsukita S., Furuse M. & Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2:285-93.
9. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994, 76:301-14.
10. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998, 392:565-8.
11. Barragán A. & Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* 2002, 195:1625-33.

12. Sibley LD. & Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992, 359:82-5.
13. Howe DK. & Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 1995, 172:1561-6.
14. Mordue DG., Monroy F., La Regina M., Dinarello CA. & Sibley LD. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* 2001, 167:4574-84.
15. Gavrilescu LC. & Denkers EY. IFN- γ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 2001, 167:902-9.
16. Barragán A. & Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 2003, 11:426-30.
17. Courret N., Darche S., Sonigo P., Milon G., Buzoni-Gatel D. & Tardieux I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. 2006, 107:309-16.
18. Barragán A., Brossier F. & Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell. Microbiol.* 2005, 7:561-8.
19. Harker KS., Jivan E., McWhorter FY., Liu WF. & Lodoen MB. Shear forces enhance *Toxoplasma gondii* tachyzoite motility on vascular endothelium. *MBio*. 2014, 5:e01111-13.
20. Weight CM. & Carding SR. The protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* targets the paracellular pathway to invade the intestinal epithelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012, 1258:135-42.
21. Nogueira AR., Leve F., Morgado-Diaz J., Tedesco RC. & Pereira MC. Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the junctional complex of retinal pigment epithelial cells. *Parasitology*. 2016, 1-8.
22. Sugita S. Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2009, 57:263-8.
23. Galván-Ramírez ML. & Mondragón-Flores R. Toxoplasmosis humana, Ediciones Cuéllar, Guadalajara, Jal, Méx., 2001. 1ª Ed.
24. Tardieux I. & Menard R. Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides. *Traffic*. 2008, 9:627-35.
25. Unno A., Suzuki K., Xuan X., Nishikawa Y., Kitoh K. & Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol. Int.* 2008, 57:515-18.
26. Fuhrman SA. & Joiner KA. *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement-mediated killing. *J. Immunol.* 1989, 142:940-7.

27. Schuindt SH., Oliveira BC., Pimentel PM., Resende TL., Retamal CA., DaMatta RA., Seipel D. & Arnholdt AC. Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet. Parasitol.* 2012, 186:207-15.
28. Seipel D., Oliveira BC., Resende TL., Schuindt SH., Pimentel PM., Kanashiro MM. & Arnholdt AC. *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alpha v beta 3 integrin. *Vet. Parasitol.* 2010, 169:312-9.
29. Stefanidakis M. & Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood.* 2006, 108:1441-50.
30. Meza I. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol. Today.* 2000, 16:23-8.
31. He YG., Niederkorn JY., McCulley JP., Stewart GL., Meyer DR., Silvany R. & Dougherty J. *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.* 1990, 31:2235-40.
32. Huet G., Richet C., Demeyer D., Bisiau H., Soudan B., Tetaert D., Han KK. & Degand P. Characterization of different proteolytic activities in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992, 1138:213-21.
33. Mendoza-López MR., Becerril-García C., Fattel-Facenda LV., Ávila-González L., Ruíz-Tachiquin ME., Ortega-López J. & Arroyo R. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect. Immun.* 2000, 68:4907-12.
34. Hernández-Gutiérrez R., Ávila-González L., Ortega-López J., Cruz-Talonia F., Gómez-Gutiérrez G. & Arroyo R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp. Parasitol.* 2004, 107:125-35.
35. Álvarez-Sánchez ME., Ávila-González L., Becerril-García C., Fattel-Facenda LV., Ortega-López J. & Arroyo R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 2000, 28:193-202.
36. Duaso J., Yanez E., Castillo C., Galanti N., Cabrera G., Corral G., Maya JD., Zulantay I., Apt W. & Kemmerling U. Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense? *J. Trop. Med.* 2012, 2012:758357.
37. Kappe S., Bruderer T., Gantt S., Fujioka H., Nussenzweig V. & Menard R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J. Cell Biol.* 1999, 147:937-44.
38. Sultan AA., Thathy V., Frevert U., Robson KJ., Crisanti A., Nussenzweig V., Nussenzweig RS. & Menard R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell.* 1997, 90:511-22.

39. Carruthers VB., Sherman GD. & Sibley LD. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J. Biol. Chem.* 2000, 12;275:14346-53.
40. Brossier F., Jewett TJ., Lovett JL. & Sibley LD. C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J. Biol. Chem.* 2003, 1;278:6229-34.
41. Campos de Carvalho AC., Roy C., Hertzberg EL., Tanowitz HB., Kessler JA., Weiss LM., Wittner M., Dermietzel R., Gao Y. & Spray DC. Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. *Brain Res.* 1998, 790:304-14.

8 Cistogénesis

CASTRO-ELIZALDE, Kitzia Nohemí, SANDOVAL-RODRÍGUEZ, Francisco Ernesto y
MONDRAGÓN-FLORES, Ricardo

Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, CDMX

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

8 Resumen

Los quistes tisulares son las estructuras encargadas del albergar los bradizoítos, y están conformados por la pared y la matriz quística. Hasta la fecha no se tiene un tratamiento eficaz contra la toxoplasmosis por que la pared del quiste sirve como barrera de protección contra la actividad de fármacos y contra la respuesta inmune del hospedero infectado, ya sea por la activación de células efectoras o por la producción y liberación de citocinas como interferón gamma a partir de macrófagos activados, los cuales son capaces solo de fagocitar y destruir taquizoítos extracelular. Considerando la importancia del proceso de enquistamiento de *Toxoplasma* en la patogénesis de la enfermedad, se han desarrollado diferentes metodologías para inducir la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y formación de quistes tisulares tanto *in vivo* como *in vitro*. La aplicación de tratamientos farmacológicos y vacunas contra *T. gondii*, ha tenido un avance limitado, la estandarización de condiciones que permitan la obtención de preparaciones enriquecidas de quistes, permitirá caracterizar su composición bioquímica para el diseño de fármacos que sean capaces de atravesar la pared del quiste con el fin de eliminar a los parásitos ahí alojados.

En los organismos homeotermos, la infección con *Toxoplasma gondii* se lleva a cabo a nivel intestinal, la cual inicia con la ingesta ya sea de ooquistes esporulados que contienen esporozoítos, presentes en fuentes de agua y hortalizas, o por el consumo de carne mal cocida contaminada con quistes tisulares, que alojan los bradizoítos, por lo que su ingesta en condiciones de poca higiene representa una importante forma de transmisión de la toxoplasmosis. Tanto los esporozoítos como los bradizoítos invaden el epitelio intestinal para posteriormente diferenciarse en la forma altamente invasiva y replicativa denominada taquizoíto ¹.

Todas las formas de diferenciación de *T. gondii* son virulentas así como intracelulares obligadas; es decir, que sólo dentro de la célula pueden desarrollarse y proliferar. Una vez dentro de la célula blanco, el taquizoíto lleva a cabo su proliferación intracelular dentro de una vacuola parasitófora (VP) por endodiogenia, un proceso asexual de división celular, en el cual la célula madre produce dos células hijas ². Como resultado de la infección, se activa la respuesta inmune de defensa del hospedero con la producción y liberación de interferón gamma (IFN- γ) por macrófagos activados, los cuales son capaces de fagocitar y destruir taquizoítos que pudieran encontrarse a nivel extracelular en los momentos previos a la invasión celular. La acción de los macrófagos o de otras células de defensa como linfocitos o de moléculas efectoras como los anticuerpos, complemento, etc., no son efectivos contra la forma intracelular del parásito. También se ha observado que la presencia de IFN- γ activa por otro lado, un proceso de diferenciación en *T. gondii* que conduce a su diferenciación de taquizoítos a bradizoítos, con la consecutiva transformación de la VP en un **quiste tisular**. Los bradizoítos permanecen en estado de latencia dentro de los quistes tisulares a lo largo de la vida del hospedero. El mecanismo de diferenciación de la forma de taquizoíto a bradizoíto y los eventos moleculares de su regulación aún permanecen desconocidos. Estos quistes tisulares conteniendo bradizoítos se localizan en tejidos como músculo, ojo y cerebro. Sin embargo, en otros estudios se ha sugerido que los quistes pueden localizarse en regiones específicas del cerebro, pero con un tropismo particular en la amígdala medial y basolateral; por ello se le ha relacionado con esquizofrenia y suicidios ^{3,4}.

En términos de quimioterapia anti-*Toxoplasma*, hasta el momento no existen fármacos capaces de eliminar los quistes tisulares presentes en los hospederos infectados. Parte de esto se debe a que, a la fecha, se desconocen las propiedades bioquímicas de los quistes tisulares, así como de los bradizoítos alojados en su interior ⁵.

En el hombre, una vez que los esporozoítos o los bradizoítos invaden al epitelio intestinal y se diferencian a taquizoíto, estos proliferan y atraviesan la lámina basal intestinal para iniciar su diseminación tisular por vía sanguínea o linfática. Con la activación del sistema inmunológico y producción de IFN- γ , se inicia la diferenciación de los taquizoítos a bradizoítos y formación del quiste tisular, en el cual permanecen en forma latente hasta por varios años, iniciando así una infección crónica ^{6,7}. En individuos inmuno-comprometidos y crónicamente infectados con *T. gondii*, los bradizoítos salen del quiste tisular y se diferencian a taquizoítos, diseminándose por todo el organismo reactivándose así la enfermedad. Esta reactivación de los parásitos de un estado crónico a uno agudo se asocia con la migración de los taquizoítos a través de la barrera hemato-encefálica hacia órganos vitales como el cerebro, en donde está relacionado con diversos desórdenes neurológicos produciendo cuadros de encefalitis y muerte ⁸. Cuando la infección con *T. gondii* ocurre durante el embarazo, el parásito alcanza la placenta e infecta al feto, produciendo daños oculares, cerebrales y aborto ⁹.

8.1 Morfología y biología de bradizoítos y quiste tisular

Se ha descrito la existencia de tres cepas clonotípicas de *Toxoplasma gondii* de acuerdo a su genoma (Tipo I, II y III) ¹. Además de las diferencias genotípicas de las poblaciones clonotípicas de *T. gondii*, también se ha hecho una correlación con su grado de virulencia, distribución preferencial en ciertas especies animales y habilidad para formar quiste. En el genotipo I se encuentra la cepa RH, la cual es considerada de virulencia elevada con una letalidad del 100 % (LD₁₀₀) al infectarse ratones susceptibles como los de la cepa *BALB/c* con un solo parásito; adicionalmente presenta una elevada motilidad *in vitro* y una rápida diseminación *in vivo*, y por ello es considerada como una cepa no formadora de quiste. En el genotipo II encontramos a las cepas 76K y ME49, las cuales se caracterizan por una virulencia intermedia e inducen una fuerte respuesta pro-inflamatoria. Finalmente, en el genotipo III están entre otras, las cepas NED y VEG, las cuales causan el 50 % de letalidad con aproximadamente 10⁶ parásitos y por ello se consideran de muy baja virulencia; las líneas clónales difieren entre sí en solo 1-2 % en su secuencia nucleotídica en su genoma ¹⁰. Los parásitos de los tipos II y III forman quistes en animales, así como en modelos *in vitro* de cultivos celulares infectados ¹¹. Este tipo de cepas han sido utilizadas en el estudio del proceso de diferenciación de taquizoíto a la forma de bradizoíto, así como del proceso de enquistamiento *in vitro*. Mediante el estudio de estas poblaciones de baja virulencia se ha podido determinar que los bradizoítos son una forma parasitaria intracelular de poca motilidad, baja virulencia y lenta proliferación que al igual que los taquizoítos también se dividen por endodiogenia y que transforman a la célula hospedera infectada en un quiste tisular. Se ha demostrado que bradizoítos maduros aislados de cerebros de ratones infectados, se encuentran en la fase G0 con un contenido uniforme de ADN ¹². Se hicieron estudios sobre la dinámica de la conversión a G1, en un sistema *in vitro* empleando parásitos tipo II (*Prugnnaud*) sometidos a la privación de CO₂ para el mantenimiento de bradizoítos hasta por 2 semanas. En estas condiciones, se determinó que los bradizoítos inmaduros se replican lentamente en forma asincrónica en unas 12 horas en comparación con los taquizoítos que requieren para dividirse cerca de 6 horas utilizando una combinación de endodiogenia y endopoligenia (replicación asexual mediante el cual más de dos células hijas se forman dentro de la célula madre) ¹³. Curiosamente, en el contexto de este sistema, el 10-20 % de vacuolas se transforman a quiste tisular, conteniendo parásitos individuales que carecían de un apicoplasto (orgánulo adquirido por endosimbiosis primitiva con algas), un plástido no fotosintético ^{13,14}. A pesar de su estado de quiescencia, los bradizoítos en desarrollo bajo estas condiciones, son muy móviles y capaces de salir de la célula hospedera sin destruir el quiste y así invadir una célula vecina. Por otro lado, los bradizoítos dentro de los quistes maduros purificados a partir de cerebros de ratón también exhiben cierta motilidad intravacuolar ¹³. La motilidad del bradizoíto dentro quiste y durante la invasión de células vecinas puede explicar el aumento en la cantidad de quistes y de bradizoítos en ratones infectados a pesar de la baja frecuencia de ruptura del quiste.

Dentro de las características de los bradizoítos se encuentran la presencia abundante de gránulos cuyo contenido son polisacáridos como la amilopectina, tienen un núcleo localizado más cercano al extremo posterior del parásito, tienen roptrías más electrodensas, numerosos micronemos así como una baja motilidad y replicación ^{15,16}.

El quiste tisular mide entre 50 a 70 μm y contiene aproximadamente entre 1000 y 2000 bradizoítos que miden aproximadamente 7 x 1.5 μm .

El tamaño del quiste depende del tipo de la célula hospedera, así como de su grado de madurez. Por ejemplo, en cerebro no suelen pasar de los 70 μm de diámetro y generalmente presentan una forma esferoidal (Figura 17), mientras que en tejido muscular pueden llegar a medir hasta 100 μm de diámetro y son más elongados ¹⁷.

El quiste se compone principalmente de la pared quística y la matriz quística (Figura 18 A). La **pared quística** es una estructura compacta y electrodensa responsable de aislar a los bradizoítos, esta pared es elástica y delgada, mide alrededor de 0.5 μm de grosor y tiene un aspecto áspero y desigual, posee una permeabilidad que deja cruzar moléculas de hasta 10 kDa (figura 18 B).

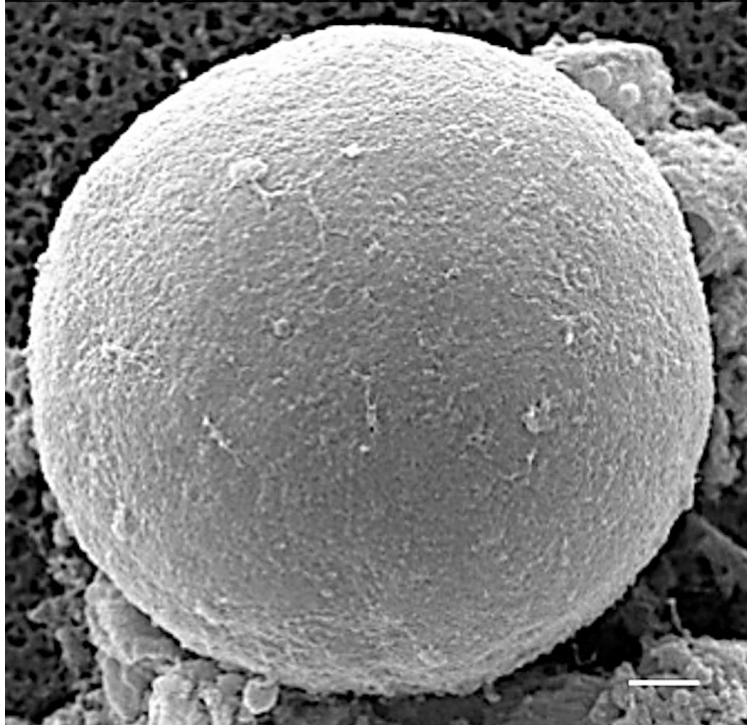


Figura 17 Morfología del quiste tisular por microscopía electrónica de barrido. Se puede observar que presentan una estructura esférica de aproximadamente 25 micras de diámetro; y una pared gruesa con presencia de material fibroso y vesicular, la cual es la responsable de mantener a los bradizoítos aislados del medio extra quístico. Escala = 5 μm .

La pared quística da positiva a la reacción de ácido peryódico de Schiff y se une a la lectina de *Dolichos biflorus* (Figura 19) y a la aglutinina de germen de trigo succinilada (S-WGA) debido a que es una pared rica en carbohidratos principalmente N-N-acetil galactosamina y N-acetilglucosamina.

Entre las proteínas relacionadas a la pared quística se encuentran algunas de la familia GRA de las cuales las que se han detectado en la pared quística a GRA5 de manera abundante y a GRA1, GRA3 y GRA6¹⁸, mientras que la **matriz quística** está compuesta por un material filamentoso y por vesículas de diferentes tamaños y estructuras tubulares. Las vesículas pequeñas oscilan de 50 a 140 nm de diámetro, mientras que las grandes presentan una cobertura densa en su superficie externa, y miden de 250 a 700 nm de diámetro. Los componentes tubulares encontrados en la matriz quística son similares a la red vesículo-tubular encontrada en la VP, estas estructuras tubulares tienen de 30 a 50 nm de diámetro¹⁹.

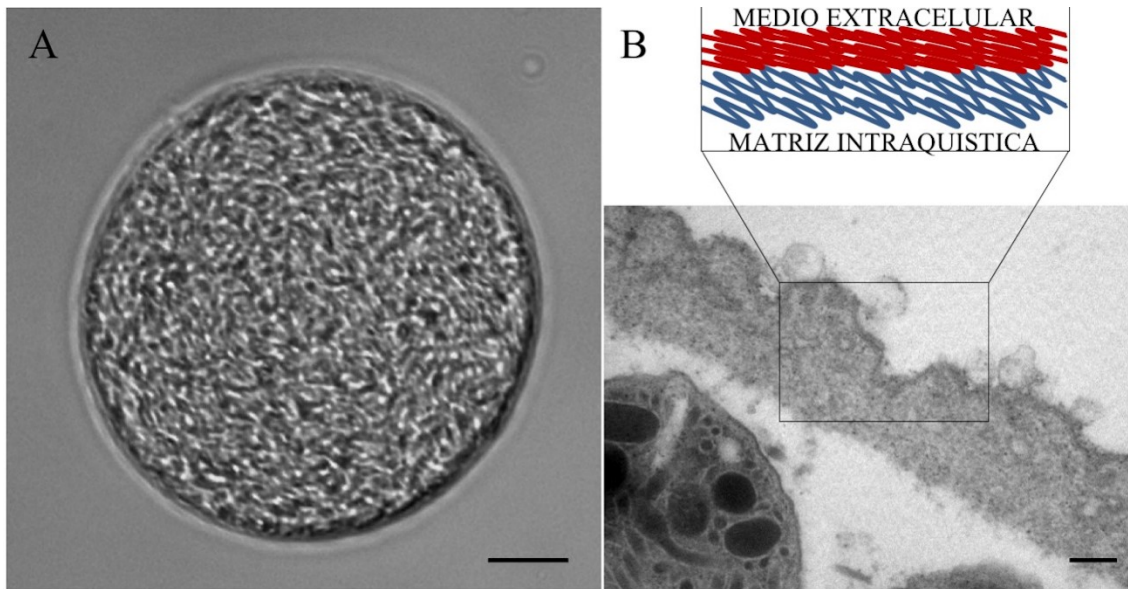


Figura 18 Estructura de la pared del quiste tisular, (A). El quiste está conformado por la pared y la matriz quística (B). La pared a su vez se encuentra formada por 2 capas o fases, una fase externa compacta y rígida (inserto B líneas rojas) y una interna más laxa (inserto B líneas azules). Durante el proceso de enquistamiento los bradizoítos, secretan vesículas y estructuras lamelares, en la región posterior de su cuerpo, que podrían corresponder a los componentes de la pared quística 10. Escala en A = 5 μm y en B = 100 nm.

En los tejidos del hospedero, los quistes inmaduros pueden llegar a medir hasta 5 μm y contener 2 bradizoítos en su interior. Una VP en su formación temprana puede contener taquizoítos o bradizoítos. La identificación de bradizoítos y de estructuras quísticas, es posible mediante técnicas histoquímicas las cuales detectarían marcadores específicos de bradizoítos y de la pared del quiste. Los bradizoítos desarrollan quistes en diversos tejidos, pero son más comunes en tejido nervioso y muscular; sin embargo, no queda claro cuál es la célula o tejido preferido por el parásito para realizar esta interconversión^{7, 15, 20}.

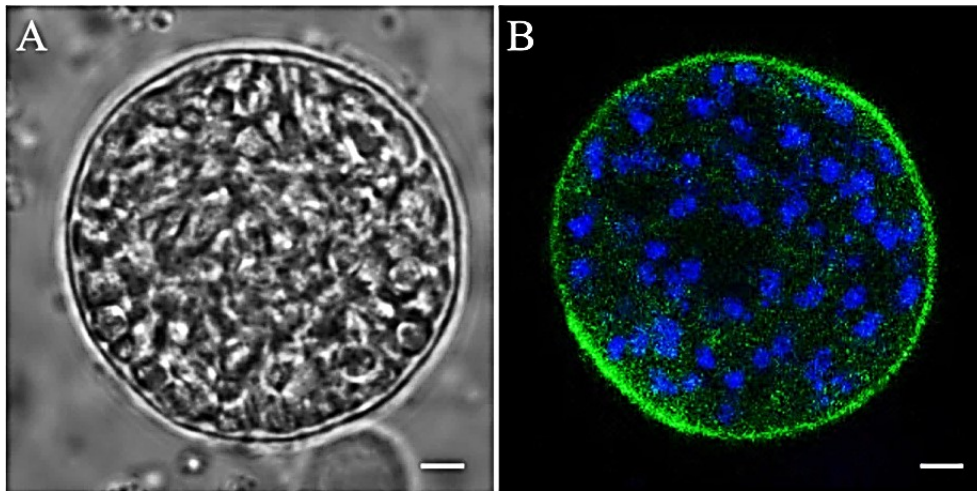


Figura 19 Quiste de la cepa ME49 A) Microscopía óptica de contraste de fases de un quiste tisular de la cepa ME49 (tipo II) de *Toxoplasma*; B) Microscopía confocal del quiste con tinción para la glicoproteína CST1 de la pared con la lectina de *Dolichus Biflorus* acoplada a isotiocianato de fluoresceína (en verde) y en azul se marcan los núcleos de los bradizoítos con el colorante DAPI. Escala = 5 μm .

En los bradizoítos no se observan cuerpos lipídicos, son positivos a la tinción acid-Schiff (PAS) y resisten más las condiciones de ácido-pepsina (sobreviviendo hasta 2 horas en pepsina-HCL, en contraste con el taquizoíto que sólo resiste 10 minutos con el tratamiento). En el modelo de ratón, el tiempo en que los bradizoítos tardan en penetrar una célula hospedera después de la infección vía oral es de 2 horas y la conversión a taquizoítos se realiza después de 18 horas. Se detecta parasitemia a las 24 horas post-infección y a los 4 días hay invasión de diferentes órganos. La formación de quistes se observa 6 días después de la infección²⁰. Aparentemente la pared del quiste se forma a partir de la yuxtaposición de la membrana de la vacuola parasitófora y de la membrana de la célula hospedera, con la presencia de filamentos intermedios que lo rodean y que no están incorporados a la pared del quiste ya que no se observan en quistes purificados a partir de células hospedera²¹.

8.2 Proteínas estructurales y de superficie

Durante la inter-conversión de estadios (taquizoítos a bradizoítos) se presentan cambios morfológicos y moleculares, que incluyen expresión de antígenos-estadio específicos y alteraciones en el metabolismo²², muchos de estas diferencias se demostraron mediante el uso de antisueros policlonales y con técnicas de Western blot, inmunofluorescencia y ELISA²⁰⁻²².

La mayoría de los antígenos identificados hasta el momento en taquizoítos como bradizoítos pertenecen a dos diferentes familias: SAG1 y SAG2 (surface antigens). La familia SAG1 incluye a SAG3, (BSR)4 (bradyzoite specific recombinant), Proteínas SRS 1-3 (SAG-related sequences), SAG5, SAG5.1 y SAG5.2. SAG1 y SRS1–SRS3 están presentes únicamente en taquizoítos, BSR4 sólo en bradizoítos y SAG3 en ambos (ver tabla 1)¹³. Esta familia de proteínas juega un papel importante en el proceso de adhesión del parásito a la célula blanco.

Dentro de la familia SAG2 se encuentran SAG2A (antes SAG2), SAG2B-SAG2D. SAG2A y SAG2B que se expresan exclusivamente en taquizoítos, mientras que SAG2C y SAG2D se expresan solamente en bradizoítos²¹. Las enzimas y el metabolismo bioquímico de los bradizoítos no se han estudiado en detalle debido a la dificultad para obtenerlos en cantidad suficiente *in vitro*.

Utilizando técnicas de biología molecular se han podido identificar diferentes enzimas como las enolasas de taquizoítos y bradizoítos, la glucosa-6-fosfato isomerasa y el lactato deshidrogenasa (LDH). Se ha demostrado que los bradizoítos poseen una ATPasa que está ausente en los taquizoítos ¹³.

Dentro de las proteínas características de taquizoítos están: SAG1, SAG2A, SAG2B, LDH1 y ENO2, mientras que proteínas propias de bradizoítos están: SAG2C, SAG2D, SAG4 y BSR4. A la fecha se sabe que únicamente SAG3 se presenta en ambos estados. En cuanto al estadio de bradizoíto, las que son específicas son SAG2C, SAG2D, SAG4, la recombinante específica de bradizoíto 4 (BSR4), el antígeno de matriz (MAG1), LDH2, la enolasa ENO1 y el antígeno de bradizoíto 1 (BAG1). La detección de estas moléculas mediante el uso de anticuerpos permite determinar el estado de diferenciación del parásito en una célula o en un tejido determinado.

Estudios realizados *in vivo* han demostrado que el tamaño del quiste tisular depende de la madurez del quiste, el tipo de célula hospedera infectada y el método citológico utilizado para hacer la medición. El tejido quístico en miocitos es 2-3 veces más grande que aquellos en células neurales. Mediciones hechas en quistes extraídos de cerebros mostró un crecimiento uniforme hasta las 10 primeras semanas, después de las cuales se presenta una considerable variabilidad en tamaño, debido quizá a una segunda generación de quistes tisulares. El tejido quístico puede alcanzar hasta 60 micras de diámetro y contener unos 60,000 organismos. El tamaño de los quistes puede variar dependiendo de la cepa de *T. gondii* ²⁰.

Tabla 1 Moléculas de bradizoítos y su distribución topográfica.

BAG = Bradyzoite antigen

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

8.3 Mecanismo de enquistamiento *in vivo*

Los mecanismos que se han propuesto en relación al proceso de enquistamiento de *T. gondii* se han relacionado con la inducción *in vitro* de estados de estrés en el parásito y en la célula hospedera. *In vivo* el estrés es generado por la activación de células de la respuesta inmune y citocinas liberadas como una respuesta del hospedero a la presencia del parásito. La respuesta inmune celular activada incluye a células T CD8⁺ en sinergia con las células T CD4⁺. Durante la fase inicial de la infección, los macrófagos constituyen el principal mecanismo de defensa del hospedero, mediante la fagocitosis del parásito, por otro lado, las células asesinas naturales (NK) también contribuyen teniendo un efecto citotóxico directo.

Las células Th1, las NK y los macrófagos son las encargadas de la producción de IFN- γ . El IFN- γ es una citocina que limita la replicación intracelular del parásito ²³, cuya importancia fue evidenciada en ratones transgénicos carentes de IFN- γ y que fueron infectados generando su muerte en contraste con los animales normales que sólo desarrollaron una toxoplasmosis crónica ²⁴, la administración exógena del INF- γ en los animales deficientes protegió de una infección letal.

Aunque no está del todo claro su papel específico, se ha encontrado que el INF- γ induce a la enzima que degrada al triptófano la indolamina 2,3- dioxigenasa ²³, generando una posible carencia de este aminoácido lo que se ha asociado con una probable disminución de la replicación del parásito con la formación del quiste aunque aún no está claro.

El factor de necrosis tumoral (TNF) α es otra citocina que también se ha vinculado con la inducción de la diferenciación a bradizoíto en macrófagos murinos. El TNF- α presenta un efecto sinérgico con el IFN- γ para facilitar la conversión a bradizoítos ²⁵. En un estudio realizado en fibroblastos humanos se determinó que la interleucina 6 (IL-6) favorece la formación de bradizoítos *in vitro* ²⁶. A la fecha se desconocen las señales involucradas en la inducción del enquistamiento del parásito.

8.4 Mecanismos de enquistamiento *in vitro*

Considerando la importancia del proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii* en su ciclo biológico y en la patogénesis de la enfermedad, se han desarrollado diferentes metodologías para inducir la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y quistes tisulares en cultivos de células infectadas ²⁷.

No obstante la inducción del enquistamiento de *T. gondii in vitro* ha sido reportada desde la década de los sesentas, las bases moleculares por las cuales se da este fenómeno aún no están del todo caracterizadas ^{7, 13}. Estudios previos realizados *in vitro* muestran que los factores inmunológicos no son siempre necesarios para la inducción de la formación del quiste tisular ²⁸.

En la actualidad se han descrito diferentes estrategias experimentales (Figura 20) con las cuales se puede inducir el desarrollo de bradizoítos en células infectadas todas ellas generando un microambiente de estrés para el parásito ²⁹ como:

pH alcalino. El mantenimiento de células infectadas con *T. gondii* en medio de cultivo con pH alcalino (8.0-8.2), es la estrategia más comúnmente utilizada para inducir la conversión de taquizoíto a bradizoíto *in vitro* ³⁰. Los bradizoítos obtenidos mediante este método son los que presentan un fenotipo más definido ³¹. Una estrategia altamente eficaz consiste en infectar el cultivo celular con taquizoítos de *T. gondii* por un par de horas en condiciones fisiológicas de pH (7.2-7.4) para permitir la invasión de los parásitos para después cambiar el medio de cultivo a pH alcalino ajustado con KOH. Las células infectadas son cultivadas por lo general en una atmósfera sin CO₂ exógeno para evitar la variación de pH. Sin embargo, el cultivo celular mantenido bajo pH alcalino por periodos prolongados sufre severos daños lo que impide estudiar en detalle el desarrollo de los bradizoítos ³². La exposición de los taquizoítos extracelulares a pH alcalino por una hora previa a la invasión de la célula hospedera, activa la inducción de la conversión a bradizoítos evitando así el daño sobre la célula hospedera; sin embargo, el rango de conversión es mucho menor al obtenido al cultivar las células invadidas con el parásito en pH alcalino. Tanto el daño directo al parásito como los cambios en la célula hospedera pueden detonar la conversión ³³.

IFN- γ y otras citocinas pro-inflamatorias. El IFN- γ es una citocina que participa en la inducción y regulación de la respuesta inmune celular que en el caso de la toxoplasmosis contribuye entre otros aspectos a la activación de macrófagos induciendo así un grado resistencia contra el parásito. El IFN- γ junto con otras citocinas induce varios mecanismos efectores como la producción de óxido nítrico y la limitación de triptófano, ambos factores que limitan la replicación del parásito o causan su muerte³⁴. El cultivo de células infectadas con taquizoítos de *T. gondii* en presencia de IFN- γ induce la formación de quistes^{25,26}. Este método de cistogénesis, mimetiza el efecto de citocinas de la respuesta inmune sobre el parásito²⁹. El enquistamiento de los taquizoítos inducido por IFN- γ varía de acuerdo a la estirpe de las células hospederas invadidas. En macrófagos invadidos, el enquistamiento ocurre de manera exitosa, lo que no sucede en astrocitos de ratón y células neuronales de rata. Este método no ha sido exitoso en las cepas RH y VEG³². Por otro lado, la interleucina 6 (IL-6) que se produce en procesos inflamatorios, es eficaz en la producción de quistes en fibroblastos humanos³³.

Fármacos. Dentro de los fármacos que se han utilizado con más frecuencia para inducir la cistogénesis están: pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, espiramicina, hidronaftoquinonas y macrólidos de nueva generación. La mayoría de estos fármacos disminuyen la replicación de *T. gondii*. La combinación de pirimetamina-sulfadiazina induce la inter-conversión con la expresión de antígenos bradizoíto-específicos. La atovacuona, es uno de los fármacos más efectivo en la inter-conversión y formación de quistes *in vitro*^{25,35}.

Choque térmico. Otra estrategia para inducir la conversión de *T. gondii* es la de aplicar cambios en las temperaturas de incubación de las células infectadas como factor de inducción de la diferenciación e inter-conversión a bradizoítos y formación de quistes *in vitro*. El procedimiento consiste en mantener las células no infectadas por dos horas a 34 °C para que estas adquieran termo tolerancia. Posteriormente las células son llevadas a 37 °C, para su infección por dos horas con taquizoítos de *T. gondii* y posteriormente se elevada la temperatura de incubación a 43 °C durante 12-48 horas, después las células son mantenidas de nuevo a 37 °C por el tiempo que dure el experimento. Bajo estas condiciones se observa desde las 48 horas la presencia de estructuras quísticas similares a las aisladas de cerebros de ratones infectados. Cabe mencionar que el tratamiento con calor induce la formación de quistes en cepas virulentas y avirulentas de *T. gondii*³².

Estrés nutricional. Recientemente se ha observado que la privación de nutrientes (como la arginina), bloquea de manera eficiente la replicación de *T. gondii* y dispara la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto, así como el desarrollo *in vitro* de estructuras semejantes a quistes titulares³⁶. *T. gondii* carece de la enzima necesaria para sintetizar arginina *de novo* por lo que requiere tomar este aminoácido de la célula hospedera. Al incrementar los niveles intracelulares de cGMP y cAMP de manera permanente o transitoria se ha demostrado inducir la diferenciación de *T. gondii* en la cepa PLK mas no en la RH³⁷.

Estrés oxidativo. El mantenimiento con nitroprusiato de sodio se ha visto que actúa como una fuente de óxido nítrico (NO) exógeno y también inhibe las proteínas implicadas en la cadena respiratoria del parásito²⁵. También, los fármacos que interfieren con las mitocondrias del parásito inducen su diferenciación a bradizoíto^{25,38}. El tratamiento con arseniato de sodio también desencadena la expresión de antígenos de bradizoítos³². Otra estrategia experimental con la cual se puede inducir el proceso de diferenciación del parásito es por mantenimiento del cultivo en condiciones axénicas³⁹, o el agotamiento de pirimidinas por la depleción de la enzima uracil-fosforribosiltransferasa (UPRT) sometidas a ambiente con CO₂ (0.03 %) ^{13,40}. Los compuestos que causan estrés sobre el retículo endoplásmico o inductores que interfieren con la salida de calcio también inducen la formación de quistes^{41,42}.

Conversión espontánea. La transición de taquizoítos a bradizoítos puede ocurrir de manera espontánea sin la necesidad de aplicar algún factor de stress; sin embargo, esto ocurre con una baja frecuencia. El grado de diferenciación varía de una cepa a otra. Recientemente se han descrito cambios en la fase pre-mitótica del ciclo celular particularmente en la fase llamada G2 que se ha asociado con la diferenciación a bradizoítos ¹².

Es tema de controversia si la línea celular es determinante para la inter-conversión de *T. gondii*. En la mayoría de las líneas celulares se obtienen quistes, más este hecho no ha sido cuantificado. Los fibroblastos humanos (células HFF) son unos de los más utilizados para estudiar el fenómeno de diferenciación. Para la inducción de la formación de quistes de *T. gondii* por stress se han utilizado diferentes líneas celulares como células Vero, fibroblastos humanos, macrófagos murinos, neuronas de rata, astrocitos y microglia las cuales se han invadido con parásitos de diferentes cepas de *T. gondii* como RH, ME-49, NTE, PLK, VEG y algunas cepas exóticas como: COUG, CAST, GPHT, MAS, FOU ²⁷.

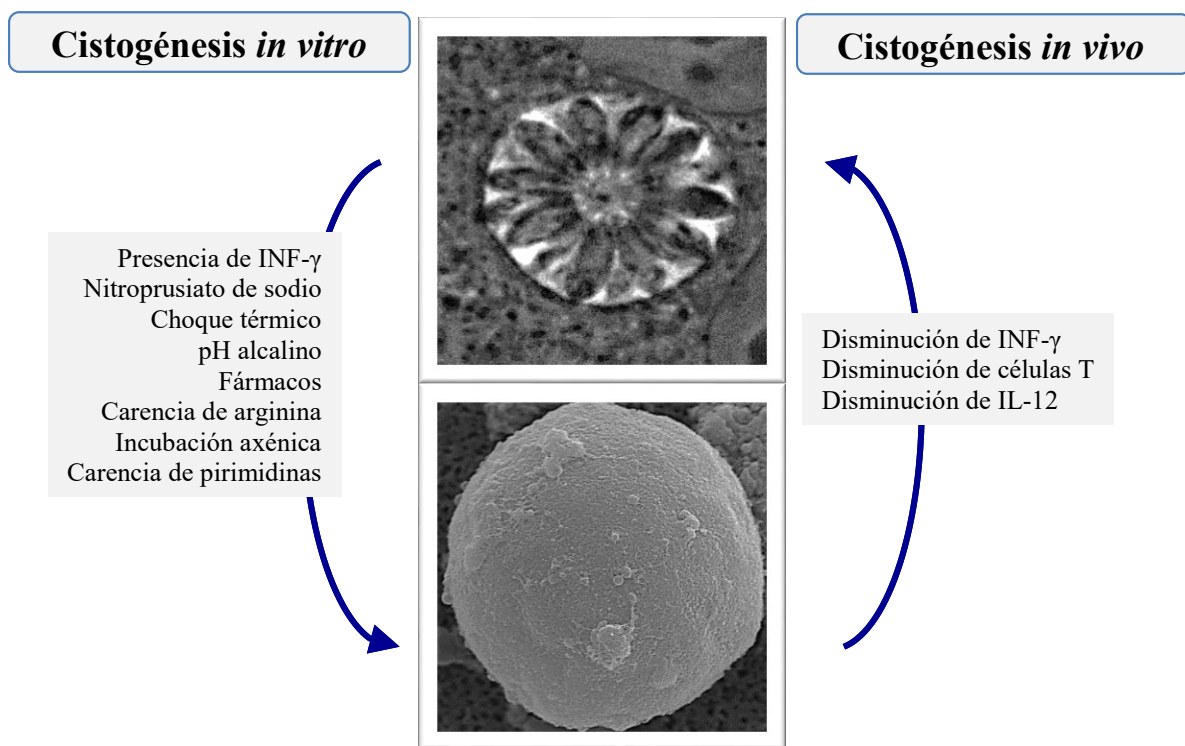


Figura 20 Factores asociados con la inter-conversión de taquizoíto a bradizoíto. Del lado izquierdo se enlistan los mecanismos involucrados con el cambio al estadio de bradizoíto mientras que al lado derecho se muestran los relacionados a la reactivación del parásito es decir la transformación de bradizoíto a taquizoíto.

La aplicación de tratamientos farmacológicos y vacunas contra *T. gondii*, ha tenido un avance limitado debido en gran medida a la falta de modelos experimentales que nos permita la caracterización del proceso de cigogénesis *in vitro* de *T. gondii*, de manera reproducible y con una alta frecuencia, y con ello permitir el aislamiento del quiste tisular, una de las formas de transmisión de las parasitosis más importantes y que aloja en su interior a la forma infectiva de *T. gondii*, los bradizoítos. La estandarización de condiciones que permitan la obtención de preparaciones enriquecidas en quistes tisulares, permitirá caracterizar su composición bioquímica, sus propiedades inmuno-protectoras, así como sus eventos moleculares para la búsqueda, evaluación y diseño de fármacos que sean capaces de atravesar la pared del quiste tisular con el fin de eliminar a los parásitos ahí alojados.

8.5 Agradecimientos

La presente investigación se realizó con apoyo de la fundación Miguel Alemán A.C. otorgado a Ricardo Mondragón Flores y las becas CONACYT otorgadas a Kitzia Nohemí Castro Elizalde con número de registro 261878 y a Francisco Ernesto Sandoval Rodríguez con número de registro 297768. Agradecemos a la QFB. Mónica Edith Mondragón Castelan del departamento de Bioquímica y a la QFB. Sirenia González Pozos de la Unidad de Microscopía Electrónica (LANSE) ambas del CINVESTAV, por el apoyo proporcionado en los procesamientos de microscopía electrónica.

8.6 Referencias

1. Halonen SK. & Weiss LM. *Toxoplasma gondii* presentations at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists: 100 years and counting. *Eukaryot. Cell.* 2009, 8:437-40.
2. Engelberg K., Ivey FD., Lin A., Kono M., Lorestani A., Faugno-Fusci D., Gilberger TW., White M. & Gubbels MJ. A MORN1-associated HAD phosphatase in the basal complex is essential for *Toxoplasma gondii* daughter budding. *Cell. Microbiol.* 2016.
3. Vyas A., Kim SK. & Sapolsky RM. The effects of *Toxoplasma* infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neurosc.* 2007, 148:342-8.
4. Hsu PC., Groer M. & Beckie T. New findings: depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2014, 26:629-37.
5. Luft BJ. & Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1992, 15:211-22.
6. Sibley LD., Krahenbuhl JL., Adams GM. & Weidner E. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell Biol.* 1986, 103:867-74.
7. Weiss LM. & Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front. Biosci.* 2000, 5:D391-405.
8. McConkey GA., Martin HL., Bristow GC. & Webster JP. *Toxoplasma gondii* infection and behaviour - location, location, location? *J. Exp. Biol.* 2013, 216:113-9.
9. Filisetti D. & Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2004, 40:71-80.

10. Sibley LD. Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2009, 39:915-24.
11. Behnke MS., Khan A., Wootton JC., Dubey JP., Tang K. & Sibley LD. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2011, 108:9631-6.
12. Radke JR., Guerini MN., Jerome M. & White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 131:119-27.
13. Dzierszinski F., Nishi M., Ouko L. & Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot. Cell.* 2004, 3:992-1003.
14. McFadden GI. The apicoplast. *Protoplasma.* 2011, 248:641-50.
15. Boothroyd JC., Black M., Bonnefoy S., Hehl A., Knoll LJ., Manger ID., Ortega-Barria E. & Tomavo S. Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1997, 352:1347-54.
16. Zhang YW., Halonen SK., Ma YF., Tanowitz HB. & Weiss LM. A Purification Method for Enrichment of the *Toxoplasma gondii* Cyst Wall. *J. Neuroparasitol.* 2010, 1:
17. Dubey JP., Lindsay DS. & Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11:267-99.
18. Sullivan WJ, Jr. & Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36:717-33.
19. Lemgruber L., Lupetti P., Martins-Duarte ES., De Souza W. & Vommaro RC. The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form. *Cell. Microbiol.* 2011, 13:1920-32.
20. Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1997, 44:592-602.
21. Fortier B., Coignard-Chatain C., Soete M. & Dubremetz JF. Structure and biology of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *C R Seances. Soc. Biol Fil.* 1996, 190:385-94.
22. Lekutis C., Ferguson DJ. & Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp. Parasitol.* 2000, 96:89-96.
23. Rosowski EE., Nguyen QP., Camejo A., Spooner E. & Saeij JP. *Toxoplasma gondii* Inhibits gamma interferon (IFN-gamma)- and IFN-beta-induced host cell STAT1 transcriptional activity by increasing the association of STAT1 with DNA. *Infect. Immun.* 2014, 82:706-19.

24. Suzuki Y., Orellana MA., Schreiber RD. & Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1988, 240:516-8.
25. Bohne W., Heesemann J. & Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 1994, 62:1761-7.
26. Weiss LM., Laplace D., Takvorian PM., Tanowitz HB., Cali A. & Wittner M. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1995, 42:150-7.
27. Ferreira da Silva Mda F., Barbosa HS., Gross U. & Luder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biosyst.* 2008, 4:824-34.
28. Ricard J., Pelloux H., Gross U., Meunier A. & Ambroise-Thomas P. Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor. *J. Parasitol.* 1999, 85:583-5.
29. Bohne W., Holpert M. & Gross U. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiol.* 1999, 201:248-54.
30. Soete M. & Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, 219:76-80.
31. Radke JR., Donald RG., Eibs A., Jerome ME., Behnke MS., Liberator P. & White MW. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog.* 2006, 2:e105.
32. Soete M., Camus D. & Dubremetz JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 1994, 78:361-70.
33. Weiss LM., Ma YF., Takvorian PM., Tanowitz HB. & Wittner M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. *Infect. Immun.* 1998, 66:3295-302.
34. Lang C., Gross U. & Luder CG. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 2007, 100:191-203.
35. Miyagi T., Itonaga H., Aosai F., Taguchi J., Norose K., Mochizuki K., Fujii H., Furumoto A., Ohama M., Karimata K., Yamanoha A., Taniguchi H., Sato S., Taira N., Moriuchi Y., Fukushima T., Masuzaki H. & Miyazaki Y. Successful treatment of toxoplasmic encephalitis diagnosed early by polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: two case reports and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis.* 2015, 17:593-8.
36. Fox BA., Gigley JP. & Bzik DJ. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.* 2004, 34:323-31.

37. Kirkman LA., Weiss LM. & Kim K. Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. *Infect. Immun.* 2001, 69:148-53.
38. Tomavo S. & Boothroyd JC. Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 1995, 25:1293-9.
39. Yahiaoui B., Dzierszynski F., Bernigaud A., Slomianny C., Camus D. & Tomavo S. Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999, 99:223-35.
40. Bohne W. & Roos DS. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997, 88:115-26.
41. Nagamune K., Hicks LM., Fux B., Brossier F., Chini EN. & Sibley LD. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 2008, 451:207-10.
42. Narasimhan J., Joyce BR., Naguleswaran A., Smith AT., Livingston MR., Dixon SE., Coppens I., Wek RC. & Sullivan WJ, Jr. Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 2008, 283:16591-601.

9 Respuesta inmune a la infección por *Toxoplasma gondii*

CARDONA-PEREZ, Nestor Ivan

Centro de Investigaciones Biomédicas Manuel Elkin Patarroyo Murillo en la Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

9 Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito apicomplejo intracelular obligado que infecta a la mayor parte de los animales de sangre caliente del planeta. La infección por *T. gondii* trae complicaciones de tipo ocular, neurológico y en varias ocasiones enfermedad sistémica principalmente en inmunocomprometidos e individuos infectados congénitamente. La inmunidad contra *T. gondii* es compleja y depende en gran medida de la heterogeneidad genética del parásito y del hospedero. La respuesta eficiente contra *T. gondii* es un proceso orquestado que se inicia desde la inmunidad innata, la cual es muy importante para el ensamblaje de una respuesta adaptativa eficiente lo que lleva como fin a la activación de una respuesta citotóxica con la subsecuente regulación de la infección y el establecimiento de la memoria inmunológica. *T. gondii* es uno de los parásitos que mas atención atraen por su capacidad de modulación del sistema inmune, sin embargo, en el presente capítulo se tratan los componentes principales de la respuesta inmune basados en estudios en modelo murino y en células humanas y finalmente se hace un acercamiento hacia las estrategias vacunales que se han utilizado contra este parásito.

La respuesta inmune a la infección por *T. gondii* puede variar considerablemente dependiendo de la presentación clínica de la enfermedad. La respuesta inmune local y sistémica puede variar entre individuos y parece que la respuesta inmune depende fuertemente del componente genético y del estado general del sistema inmune del hospedero¹.

9.1 Inmunidad innata, el papel de los TLRs

El reconocimiento de los protozoos parásitos es una tarea complicada para el sistema inmune de los mamíferos, esto es parcialmente debido a que la mayoría de las moléculas virales y microbianas que son reconocidas por los receptores inmunes innatos también se encuentran en patógenos eucariotas(1). En lugar de eso, el sistema inmune innato ha evolucionado para reconocer a *T. gondii* por medio del reconocimiento de una serie de moléculas diferentes que están presentes solamente en parásitos protozoos. Para el caso de *T. gondii*, en el ratón el receptor Toll más importantes es TLR11, pero en humanos este gen lleva a la transcripción de una proteína no funcional³; por lo tanto en humanos los receptores que juegan un papel importante son TLR5(2) que reconocen a la profilina, así como los TLR2 y TLR4 que reconocen anclas de fosfatidilglicoinositol (GPI)(3–6) y TLR4 que es importante para el reconocimiento de la proteína de choque térmico 70 (HSP70)(7,8). Por otro lado, se reconoce la ciclofilina 18 que actúa como una quimioquina que activa la producción de IL-12 a través de la unión al receptor de quimioquina 5 (CCR5)(9).

Todo este reconocimiento de los patrones moleculares asociados a membranas (PAMPs) de *Toxoplasma gondii* por parte de los TLRs (Toll Like Receptors), converge en la activación del factor de diferenciación mieloide 88 (MYD88), factor que se cree necesario para la activación de IL-12 seguida de la activación de la producción de IFN- γ según se muestra en estudios con ratones(10). Por lo tanto se cree que la activación de MYD88 dependiente de TLRs en células dendríticas (DC), lleva a la activación de células T ayudadoras 1 (Th1) de manera dependiente de IL-12, lo cual se requiere para la sobrevivencia del hospedero durante la infección(11,12). Sin embargo, ya se ha demostrado que ratones deficientes en MYD88 no se logran proteger cuando se tratan con IL-12 luego de una infección con *T. gondii* y que la activación de MYD88 en DCs promueve la producción de IFN- γ en células *natural killers* (NK) pero no en células T(13). También se tiene evidencia de que la producción de IL-12 dependiente de MYD88 puede variar según el genotipo de *T. gondii*, como pasa cuando se infectan macrófagos de ratón con una cepa RH (tipo I) y se observa que la producción de IL-12 se da de manera independiente de MYD88, mientras que cuando se infectan los mismos macrófagos con una cepa ME49 (tipo II) ocurre lo contrario (14).

Juntas, todas estas moléculas inducen una respuesta inmune innata efectiva que controla la fase inicial del crecimiento del parásito(7–9). A pesar de todo y gracias a estos reportes, se tiene un modelo de activación de DC por TLRs que ha llevado a la identificación de las vías moleculares para la activación de la respuesta innata contra *T. gondii*(15).

9.2 Mecanismos efectores mediados por IFN- γ

La capacidad del interferón de eliminar las células infectadas con *T. gondii* fue demostrada en estudios con macrófagos humanos que fueron estimulados con IFN- γ , lo que lleva a la inducción de la actividad antimicrobiana y el metabolismo oxidativo contra el parásito. La purificación parcial de fracciones solubles producidas por linfocitos humanos en respuesta a antígenos de *Toxoplasma* o concanavalina A, complementado con el bloqueo del IFN- γ , permitieron establecer que esta citoquina es el principal factor que aumenta la capacidad de los macrófagos humanos para matar el parásito(16). Adicionalmente, experimentos usando macrófagos aislados de personas con SIDA muestran que estas células son capaces de eliminar a *T. gondii* cuando son estimuladas con IFN- γ (17). El IFN- γ es la mayor molécula requerida en el hospedero para la resistencia contra el parásito y en varios de los mecanismos de protección mediados por IFN- γ , los cuales se citan a continuación:

- i) La inducción de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO)(18), lo que está involucrado en la supresión del crecimiento de *T. gondii* vía la inducción de la degradación del triptófano hacia N-formilkinurenina, resultando en la inanición celular del parásito (*cell starvation*) debido a la deficiencia de este aminoácido, lo que lo hace susceptible a los mecanismos de defensa inmune del hospedero(19).
- ii) La producción de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina(20) que es importante en el ratón pero no para la respuesta por macrófagos humanos(21–25) es mediada por los intermediarios del NO que son moléculas no polares sin carga que cruzan con facilidad las membranas y por lo tanto interactúan con el parásito en la vacuola parasitófora. La inhibición de enzimas metabólicas por parte del NO constituye un mecanismo importante de citostasis (bloqueo de la mitosis) mediado por NO(26). Otro mecanismo es el mediado por la óxido nítrico sintetasa (iNOS) que depende de la depleción de la arginina durante la síntesis de NO. *T. gondii* es un auxótrofo estricto que toma este aminoácido desde el citoplasma de las células infectadas, entonces la síntesis de NO resulta en la escasez de arginina y el bloqueo eficiente en la replicación del parásito. La arginina es importante para el parásito porque es un activador metabólico para la diferenciación del taquizoíto a bradizoíto(27).
- iii) Las especies reactivas de oxígeno (ROS) también cumplen su función como mecanismo mediado por IFN- γ y se han descrito en monocitos humanos y macrófagos de ratón activados(28). Esto contrasta con reportes de que la producción de ROS no es inducida por *T. gondii* en macrófagos humanos, donde se muestra que la no producción de ROS en estas células se correlaciona con la incapacidad para eliminar o inhibir el crecimiento intracelular del parásito(29). Por eso, el papel de las ROS en la eliminación de *T. gondii* todavía es tema de controversia(15).
- iv) Otro mecanismo inducido por IFN- γ es la activación de las GTPasas relacionadas con la inmunidad (IRGs y GBPs). El gen IRG contiene 21 copias en ratón y solamente 2 en humanos (IRGC, IRGM)(30), lo que muestra que la inmunidad hacia patógenos intracelulares mediada por IFN- γ es diferente entre especies(31). La infección por *T. gondii* resulta en la carga de las IRGs sobre la membrana de la vacuola parasitófora(32), lo que lleva a su vesiculación, rompimiento y eliminación del parásito por degradación lisosomal(33,34). Las IRGs cumplen una función importante en el control del parásito principalmente contra cepas tipo II y III, en contraste las cepas tipo I pueden suprimir este efecto de control(35). Este efecto de inhibición por parte de las cepas virulentas o tipo I en ratón se debe principalmente a las proteínas ROP18 y ROP5, las cuales impiden que las IRG se ubiquen en la membrana de la vacuola parasitófora y por lo tanto se evita la eliminación del parásito(36). El papel de las IRGM del humano se cree que está asociado con la maduración del fagosoma y sobre la destrucción de patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* y *Salmonella typhimurium* mediada por autofagia(30). También se ha asociado con un aumento en el riesgo de sufrir la enfermedad de Crohn debido a polimorfismos en IRGM que pueden llevar a afectar la eficacia de la autofagia(37). Sin embargo, esta por probar el papel de estas proteínas en el control de *T. gondii* en el humano. Las GBPs (p65 *guanylate-binding proteins*) son otra familia de proteínas inducidas por IFN- γ que participan en la inmunidad contra el parásito(38) y las cuales están presentes en ratones los cuales tienen 13 GBPs y en los humanos en los cuales hay 7 GBP (39). Se cree que estas proteínas trabajan en la eliminación de *T. gondii* mediada por IFN- γ en fibroblastos humanos gracias a un mecanismo de muerte celular lo que induce al egreso del parásito antes de la replicación intracelular, llevando a una proliferación limitada facilitando que las células inmunes procesen al parásito, en este proceso están involucradas las proteínas GBP1, GBP2 y ATG5 (40).

- v) Otros mecanismos también incluyen el agotamiento de hierro lo que se ha demostrado usando agentes quelantes de hierro ya que *T. gondii* en su estado intracelular es hierro-dependiente. Este elemento se requiere para la replicación en experimentos con enterocitos tratados con IFN- γ , lo que sugiere que en estas células se da una limitación del hierro disponible intracelularmente para el parásito, por lo que se plantea como un mecanismo antimicrobiano en enterocitos, los cuales hacen parte de las células de la primera línea de defensa en las mucosas (41).
- vi) También está la muerte de la célula hospedera mediada por P2X7; este es un receptor con una alta expresión en la superficie de los macrófagos la cual es regulada por IFN- γ y su activación se da por el ATP extracelular liberado por procesos como daño celular. Para *T. gondii* se muestra entonces que la activación de P2X7 favorece la muerte del parásito, proceso que se da en paralelo con la apoptosis de la célula y de forma independiente a la producción de NO. Esta activación se ha mostrado como eficiente para matar microorganismos intracelulares que sobreviven en células de la línea monocito/macrófago como *Mycobacterium*, *Chamydia* y *Leishmania*, característica que la comparte *T. gondii*(42).
- vii) Un último mecanismo que se reporta como importante es la activación de un componente del inflamosoma, el NALP1, el cual es un miembro de los NOD-like receptors (NLR) que pertenecen a la familia de proteínas que forman los inflamosomas(43) y que es inducida por IFN- γ luego del efecto de IL-18 en la infección por *Toxoplasma* (44). En experimentos con monocitos NALP1 *knockdown* se evidenció la acelerada pérdida de la viabilidad celular seguida de desintegración celular, por lo que se sugiere que el inflamosoma NALP1 es crítico en el proceso de inhibición del crecimiento y muerte de *T. gondii* en monocitos humanos.

La activación del inflamosoma NALP1 activa una cascada de mecanismos inmunes innatos, incluyendo la producción de citoquinas proinflamatorias y mecanismos que llevan a la muerte de las células infectadas como la apoptosis(43).

9.3 Inmunidad adaptativa

Los mediadores producidos en la respuesta innata llevan al desarrollo de una respuesta adaptativa. La IL-12 induce la expansión celular de la respuesta Th1 lo que promueve el desarrollo de células T CD8+ citotóxicas (45–47). Este tipo celular se ha demostrado que produce la muerte a células de ratón infectadas con *T. gondii*. También, estudios *in vivo* muestran que estas células T CD8+ citotóxicas controlan el número de quistes tisulares y previenen la encefalitis. De una manera importante, la resistencia a la encefalitis en ratones infectados con cepas tipo II de *T. gondii* se ha relacionado con la región *Ld* del gen del complejo de histocompatibilidad tipo I. Esto indica que los péptidos que se puedan presentar por esta ruta y su interacción con el linfocito T CD8+ son de vital importancia para la protección contra la infección(46,48). Las citoquinas de tipo Th2 contrarrestan varios de los efectos positivos de las citoquinas de tipo Th1 y por lo tanto presentan efectos adversos en la inmunidad, como ocurre con la IL-10 que regula al IFN- γ de modo que se bloquea la habilidad de esta citoquina de activar a los macrófagos(49). Sin embargo varios estudios en ratones muestran que la ausencia de citoquinas Th2 tales como la IL-4 y la IL-13 puede resultar en una elevada inmunopatología y mortalidad, por ello en niveles adecuados tiene un efecto de balanza evitando los efectos deletéreos del exceso de respuesta Th1, y por esta razón se dice que el balance entre Th1 y Th2 es claramente delicado(50). En definitiva, estudios en ratón demuestran la importancia de citoquinas como la IL-12, TNF- α e IFN- γ como mediadores de la resistencia del hospedero al parásito (51), y factores como los haplotipos específicos del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) se sabe que son determinantes no solo en la resistencia del hospedero, sino también a la susceptibilidad a la infección.

La respuesta de linfocitos CD4+ y CD8+ definitivamente parece ser uno de los componentes más importantes en la resistencia del hospedero al parásito(52), además de la contribución del sistema inmune innato como se comentó previamente.

Luego de que la resistencia del componente innato y los mecanismos dependientes de IFN- γ han controlado la replicación de los taquizoítos, las células CD4+ y CD8+, son esenciales para mantener a los bradizoítos en un estado de latencia, además de que el control de la fase crónica y aguda también requiere la presencia de subpoblaciones celulares. Un punto importante en el estudio de la inmunidad adquirida contra *Toxoplasma* es conocer cómo se está dando la presentación de antígenos, y en este contexto ya hay reportes de antígenos cuya especificidad por el TCR se conoce, además, también hay herramientas y acercamientos genéticos que permiten estudiar la biología del parásito, lo que permite el análisis de la presentación de antígenos por los CMH I y II y la respuesta de células CD4+ y CD8+ en el contexto de una infección por *T. gondii*⁷⁷.

La importancia de las células CD4+ y CD8+ se reportó a partir de estudios comparativos de infección con *T. gondii* en ratones desnudos SCID y con ratones inmunocompetentes(52). En general, la respuesta inmune en un hospedero inmunocompetente en el curso de una infección por *Toxoplasma* confiere inmunidad protectora en un evento de reinfección. Sin embargo, el parásito persiste en forma de bradizoíto al interior de los quistes intracelulares. Se cree que la ruptura de estos quistes es el origen de la respuesta inmune contra el parásito(53). En el evento de una inmunodeficiencia y en particular en SIDA, los bradizoítos se liberan y se diferencian a taquizoítos, cuya proliferación no es controlada efectivamente por el sistema inmune del hospedero, llevando a un daño cerebral severo(54,55).

Por lo tanto, la inmunidad celular es el componente clave por parte del hospedero para reaccionar ante el ataque por *Toxoplasma*. En un contexto general, los macrófagos, los linfocitos T, los “natural killers” y un perfil de citoquinas son los mayores elementos involucrados en la respuesta inmune contra *T. gondii*. Los anticuerpos por otro lado, juegan un papel menor en la protección pero son de gran importancia para el diagnóstico de la toxoplasmosis en humanos(53).

En la inmunidad adquirida, se plantea que las células dendríticas luego de su activación por los mecanismos efectoras de la inmunidad innata son las que presentan antígenos a los linfocitos T (TL). Sin embargo este mecanismo requiere una estrecha interacción entre las células presentadoras de antígeno (APC) y el TL gracias al mecanismo CD40/CD40L(56,57) y se sabe que la infección por *Toxoplasma* lleva a la activación de CD40 en humanos(58). Estas células efectoras (TL CD4+ y CD8+), que son las involucradas en la resistencia a la infección por *Toxoplasma* ejercen su función vía actividad citotóxica y/o la secreción de citoquinas involucradas en la regulación de la respuesta inmune(59).

En ratones, las TL CD4+ maduras se dividen en 2 subpoblaciones: Th1 (células citotóxicas) y Th2 (células T ayudadoras). Esta diferenciación se basa en la lista de citoquinas secretadas luego de la estimulación. Las células tipo 1 producen IL-2 e IFN- γ mientras que las células tipo 2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Esta subpoblación de CD4+ se requiere para el desarrollo de la resistencia durante la etapa temprana de la infección(60) y para la inmunidad durante la vacunación(61,62).

La resistencia a estas respuestas está relacionada con una inmunidad de tipo-1 promovida por IL-12 e IFN- γ , las cuales se producen luego de la activación de células NK y macrófagos(63–65). Sin embargo, se sabe que el control de la infección por *Toxoplasma* es el resultado de una relación sinérgica entre células T CD4+ y CD8+(62).

Se ha planteado que las células T CD8⁺ se activan por proteínas de superficie del parásito(66) o por proteínas secretorias como GRA6 (67), GRA3, GRA7 y otras(68–70) lo que parece ser un evento esencial en la resistencia durante la fase activa de la infección en humanos y ratones que al final permite ensamblar una respuesta inmune protectora.

Los TL CD8⁺ activados por la IL-2 secretada por los TL CD4⁺, llevan a cabo su actividad citotóxica contra los taquizoítos o las células infectadas(71,72). Esta respuesta es activada por el IFN- γ y está restringida al CMH-I ayudando a que el hospedero adquiera resistencia al parásito durante la fase crónica de la infección(53).

La persistencia de la memoria es un hecho establecido en humanos pues una primoinfección protege al feto ante una posible reinfección, aunque existen reportes ocasionales de reinfección con infección congénita, estos reportes son la excepción a la regla y adicionalmente los niveles de anticuerpos permanecen en niveles detectables a lo largo de la vida del hospedero(73).

Es posible que la persistencia en la memoria de las células T se deba a la ruptura regular de quistes tisulares o infecciones recurrentes por vía oral(53). Esta persistencia en esta subpoblación celular es asegurada por mecanismos de señalización intracelulares que dependen del NF- κ B2(74), seguido por la activación de proteínas de superficie o de otro tipo provenientes del parásito. También se sabe que la activación de los receptores CD28 en los linfocitos y receptores B71 (CD80) y B72 en células dendríticas son esenciales para la adquisición de una buena memoria de linfocitos(75).

9.4 Procesamiento antigénico, memoria inmunología y haplotipos del complejo de histocompatibilidad tipo I y II

El procesamiento de los antígenos microbianos y de los péptidos que se generan en el contexto del complejo de histocompatibilidad de clase I es llevado a cabo por las células presentadoras de antígenos. Este proceso es esencial para la activación de los linfocitos T CD8⁺ los cuales son necesarios para la resistencia a largo plazo contra patógenos intracelulares como *T. gondii*(76). La vía clásica de procesamiento involucra la presentación de antígenos propios y extraños desde el citosol lo que lleva a que los linfocitos T CD8⁺ reconozcan a las células infectadas. Adicionalmente se conoce una ruta alterna las células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) como las células dendríticas (DCs), que reconocen el microambiente que las rodea y procesan antígenos exógenos por presentación cruzada a los linfocitos T CD8⁺ para iniciar una respuesta específica y parece estar relacionada con la activación de linfocitos T CD8⁺ “naive” en infecciones por varios virus, bacterias intracelulares(77) y *Plasmodium yoelii*(78).

En el contexto de los péptidos, el concepto de que estos podrían estar involucrados en diferentes respuestas inmunes no tomó fuerza hasta 1986 cuando se los relacionó con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH I y II)(79). Cuando una célula fue infectada por un microorganismo intracelular, el sistema inmune tiene la gran tarea de seleccionar cuales son los péptidos propios de los péptidos ajenos. En este momento juegan un papel muy importante las células T citotóxicas (CD8⁺), las cuales están en la capacidad de reconocer a las células infectadas. El receptor de las células T (TCR) está diseñado en principio para reconocer de todo, incluyendo péptidos propios. En el timo ocurre un proceso de selección donde las células T son escogidas para reconocer lo que “no es propio” porque si estas reconocen un complejo de histocompatibilidad de tipo I cargado con un péptido propio, recibirán una señal de muerte(80).

Luego, cerca de un 2% de las células T que provienen de la médula ósea sobreviven a este proceso de selección y el resto se eliminan para prevenir enfermedades autoinmunes donde se reconozca lo “propio”. Cuando un péptido corresponde a lo “no propio”, las células T pasan a ser activas y sufren un proceso de selección para luego eliminar a las células infectadas(79).

Para que un péptido pueda ser ensamblado en el CMH-I y expuesto en la superficie celular para su presentación a una célula T debe pasar por una serie de modificaciones que van, desde el procesamiento de la proteína en proteosoma y la acción de varias proteasas. En humanos existen al menos 3 tipos de proteosomas con diferentes sitios de corte(81) que dan como resultado fragmentos de péptidos con longitudes de entre 3-18 aminoácidos(82). De estos fragmentos peptídicos generados, se dice que menos del 1% que escapan a algún proceso de degradación por alguna aminopeptidasa citosólica, tendrán una alta probabilidad de asociarse con una proteína de transporte al retículo endoplasmático (TAP) para poder ser ensamblados a los CMH de tipo I(83). TAP no permite el ingreso al retículo endoplasmático de péptidos con longitudes menores a 8 aminoácidos, de la misma manera que el CMH de tipo I no permite el acoplamiento de péptidos menores a esta longitud(84). Estos péptidos que logran entrar al retículo endoplasmático serán recortados por las aminopeptidasas ERAP1 y ERAP2, las cuales detienen su actividad cuando los péptidos recortados llegan hasta 8 aminoácidos(85). La destrucción de los péptidos por aminopeptidasas citosólicas es un factor esencial el cual toma importancia cuando se habla en términos de números(83). Una sola célula contiene aproximadamente 10^9 proteínas y usualmente entre 10^5 y 10^6 moléculas de CMH clase I. Teniendo en cuenta esto, es muy poco probable que un solo péptido encuentre a su correspondiente CMH-I. Por eso se considera que $<0,1\%$ de los péptidos serán presentados, por tal motivo la probabilidad que tiene un péptido de ser presentado depende de que la proteína de origen se exprese en cantidades significativas, probablemente $>10^4$ copias(79).

La generación de memoria ante estos antígenos que fueron presentados depende de una pequeña población de linfocitos T citotóxicos (LTC) que se diferencian del resto de los LTC por no presentar una función efectora activa, por lo tanto, esta pequeña población de LTC sin una habilidad citotóxica aparente puede sobrevivir preferencialmente para convertirse en células de memoria(86). Se ha planteado la posibilidad de una subpoblación de células T CD8+ “naive” que están predestinadas a convertirse en células de memoria o que la heterogeneidad a nivel de células “naive” podría afectar la función efectora. Sin embargo, eventos estocásticos luego de la activación inicial de una célula T CD8+ podrían determinar la selección de una ruta en particular por la cual una célula hija se diferencia a célula efectora o a célula de memoria. También, varios factores podrían influenciar al nivel celular el control de la transición desde célula T “naive”(86). Por ejemplo y sin ser un hecho determinístico, la expresión de IL-7R α en las células T CD8+ es crítica para el desarrollo de la memoria en infecciones virales. La expresión de IL-7R α se correlaciona con la expresión aumentada o mantenida de bcl-2, la cual es una molécula intracelular anti-apoptótica(87). Otros factores como la expresión de IL-2, IL-7 e IL-15 en células T CD8+ se ha asociado al mantenimiento de las funciones efectoras y de memoria en esta subpoblación celular(88).

En la respuesta a *Toxoplasma gondii* la consecuencia de una activación Th1 es el desarrollo de células T CD8+ de memoria de larga vida. Luego de la activación de células T CD8+ “naive” durante la infección, estas proliferan rápidamente y se diferencia a una población heterogénea de células efectoras compuesta por unas células efectoras de corta vida (SLECs) y células que presentan una vida media más larga que son las células precursoras de memoria (MPECs)(89). Las SLECs proveen los mecanismos de control por medio de la producción de moléculas efectoras dentro de las que se encuentran citoquinas y moléculas que causan citólisis. Luego de esta expansión y diferenciación inicial, el grupo de células T CD8+ activadas pasan por un proceso que se denomina contracción donde las SLECs diferenciadas entran en apoptosis dejando a la pequeña subpoblación de MPECs (89).

Estas células precursoras de memoria luego se diferencian en células de memoria reales y pasan por un proceso de proliferación homeostática y continuamente se están renovando. Muchos factores como la exposición al antígeno, la coestimulación y el nivel de inflamación tienen influencia sobre la ruta de diferenciación que toman estas células(90).

En el contexto de la presentación de antígenos, los péptidos de *T. gondii* deben ser presentados por el complejo de histocompatibilidad que corresponde de acuerdo al origen del epítotope (intracelular o extracelular). En el humano las moléculas encargadas de esta presentación (HLA) están localizadas en el brazo corto del cromosoma 6 y se sabe que es el sistema más polimórfico en humanos. La región clase I en este cromosoma contiene los genes para HLA-A, HLA-B y HLA-C que codifican para las cadenas pesadas de las moléculas de clase I(91).

La importancia de la presentación de antígenos por el complejo de histocompatibilidad II radica en la necesidad de activar la respuesta dependiente de los linfocitos T CD4+ y sus citoquinas asociadas. Experimentos en ratones que no expresan los genes *Ia* o *Ie* (que corresponden al complejo de histocompatibilidad II) muestran un incremento en la mortalidad cuando se les infecta con cepa ME49 en comparación con aquellos ratones que si expresan *Ia* o *Ie*(92). Sin embargo varios estudios muestran que estos determinantes genéticos no se correlacionan con la resistencia a quistes cerebrales y encefalitis(50). Claramente el procesamiento de antígenos por el complejo de histocompatibilidad II es importante en la infección para activar la respuesta mediada por los linfocitos T CD4+, esta subpoblación celular juega un papel crítico relacionado con la producción de IL-2 para el desarrollo de los linfocitos T CD8+(50) (figura 21), los cuales son los responsables de la respuesta inmune protectora contra *Toxoplasma gondii*.

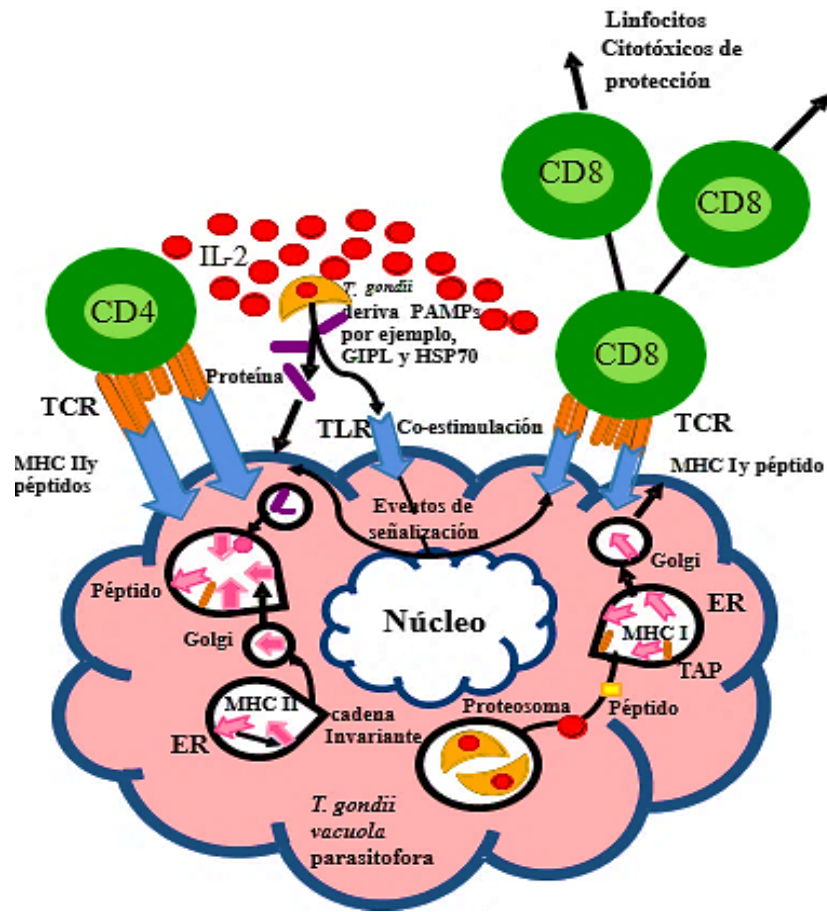


Figura 21 Modelo de respuesta inmune contra *Toxoplasma gondii* en humanos (tomado de Henriquez *et al* 2010 (50), modificada por Sofia Citlali Berumen Solis. *T. gondii* presenta varios PAMPs (patrones moleculares asociados a membrana de patógenos) como la proteína de choque térmico 70 (HSP70), anclas de glicofosfatidil inositol (GIPL) y profilina que cuando son reconocidas por su respectivo TLR inducen una cascada de señalización que resulta en la expresión de varias citoquinas. Varias proteínas provenientes del parásito son procesadas y se presentan por el complejo de histocompatibilidad II al TCR de los linfocitos T CD4+, lo que resulta en producción de IL-2. Por otro lado, los péptidos que ingresan a la ruta de procesamiento y presentación por el complejo de histocompatibilidad I son presentados a los linfocitos T CD8+ para activar una respuesta citotóxica.

9.5 Vacunas basadas en péptidos contra *Toxoplasma gondii*

Una vacuna contra *Toxoplasma* en humanos es importante porque la gran mayoría de la población está en riesgo de presentar infección con este parásito, además los tratamientos actuales son inadecuados porque solamente controlan la fase de taquizoítos y no eliminan los estadios asociados con la infección crónica(93). En países como Colombia la prevalencia de anticuerpos para *Toxoplasma* es mucho más alta que en Europa y los Estados Unidos, debido seguramente a la mayor exposición a factores de riesgo para adquirir la infección, a la posibilidad de mayores dosis de infección y a la presencia de cepas del parásito muy diferentes genotípica y fenotípicamente que pueden tener una capacidad aumentada de proliferación(94–96), de la misma manera, las prevalencias reportadas para Colombia llegan hasta 80%, lo que corresponde a formas de la infección congénita, aguda y crónica (94,97,98) poniendo de manifiesto el grave problema que representa la *Toxoplasmosis* para la población humana.

Se han reportado por más de 50 años estrategias vacunales utilizando preparaciones de antígenos crudos, parásitos inactivados o vacunas de ADN, mientras que las estrategias basadas en subunidades purificadas o productos recombinantes son relativamente nuevas y se vienen reportando entre unos 10 y 20 años. Las vacunas de subunidades tienen la ventaja de que se pueden seleccionar antígenos específicos y evitar antígenos que podrían ser irrelevantes o en el peor de los casos tener la capacidad de inducir cuadros febriles o respuestas inmunes exacerbadas. Además, una respuesta inmune pequeña o moderada inducida por antígenos del parásito podría ser aumentada para mejorar su inmunogenicidad si se aplican en el contexto de un esquema de inmunización. Una desventaja potencial es que las vacunas de subunidades a pesar de ser lo bastante específicas, pueden presentar falta de potencia inmune y por lo tanto se requieren formulaciones con adyuvantes apropiados para aumentar su efectividad (99).

Una búsqueda en el NCBI a julio de 2017 con las palabras clave “*Toxoplasma* vaccine” arroja 829 resultados, mientras que con las palabras clave “*Toxoplasma* vaccine peptides” se encuentran 253 y utilizando las palabras clave “*Toxoplasma* peptide subunit vaccine” se obtiene un total de 23 estudios dentro de los cuales se describen resultados de experimentos que llevan a activar respuesta citotóxica y de anticuerpos y donde de una u otra forma se muestra el uso de diferentes estrategias vacunales y proteínas de donde se derivan varias secuencias antigénicas. Entre las proteínas estudiadas se encuentran: Got1, Ter1p, LMBR, PLA2(100), AMA1, RON2 y RON4(101), GRA4(102) (Wang utilizó GRA4 para buscar epitopes B), TgCDPK1(103), TgGR(104), ROP5(105), MAG1 (antígeno de taquizoíto y bradizoíto)(106), SAG1, ROP1, ROP2, ROP4, GRA1, GRA2, GRA5, GRA6, HF10 (HF10 es un decapeptido inmunodominante derivado de GRA6(67), GRA7, MIC1, MIC4, HSP70, SAG2, SAG3, SRS1, TgPI-1, Actin Depolymerization Factor, TCP, NTPases II, P54 y P24(99)). Lo característico en los estudios con estas proteínas, es que los antígenos se han utilizado como vacuna ya sea individualmente o en cocteles y administrados a ratones humanizados por diferentes rutas usando distintos adyuvantes o en ensayos con células humanas.

Al momento de probar los epítopes inmunogénicos en el modelo animal, la selección de los adyuvantes es crucial y puede influir profundamente sobre la eficacia de la vacuna(99). En ensayos de vacunas para *Toxoplasma* se han utilizado hasta ahora adyuvantes para administración subcutánea como: FCA, FIA, liposomas, saponina QuilA, ISCOMs, SBAS1, Mono-fosforil lípido A, lipopeptidos, PADRE, GLA-SE e IL-12. Para administración intraperitoneal: FCA, FIA, liposomas, VetL-10, Lactobacillus, FMA e hidróxido de aluminio (ALUM). Para administración intramuscular: ALUM, FIA y CpG. Para administración oral: toxina colérica y macropartículas de quitosán. Para administración intranasal: salbutamol, toxina colérica y enterotoxina (99).

Han aparecido nuevas estrategias para desarrollar una respuesta inmune que controle al parásito en el modelo ratón que se basan en la inclusión de péptidos que activan la respuesta Th1, Th2 y humoral con constructos de péptidos con demostrada inmunogenicidad en nanopartículas (107,108). Para el caso de *Toxoplasma* hay reportes donde se demuestra el uso de adyuvantes para TLR2 (Pam2Cys) y TLR4 (GLA-SE), CD4 (PADRE-AKFVAAWTLKAAA) y el diseño o predicción por herramientas bioinformáticas de péptidos con alta afinidad por diferentes haplotipos del complejo de histocompatibilidad en humanos (HLA*A02, HLA*A03, HLA*B7) con los que se pretende desarrollar una vacuna que abarque la mayor parte de la población humana (68–70,100,109).

9.6 Estrategias computacionales para la selección de epítopes inmunogénicos como candidatos a vacuna

La estrategia convencional para el desarrollo de vacunas se basa principalmente en 2 métodos: primero, usar patógenos atenuados por medio de pases seriados *in vitro* para obtener cepas vivas atenuadas que pueden ser usadas como vacunas y segundo, identificar antígenos que confieran inmunidad protectora para que puedan ser usados en vacunas de subunidades “no vivas”(110). La mayor revolución con el desarrollo de las vacunas de subunidades es que se pueden conocer cuáles son los componentes de un microorganismo que son suficientes para activar una respuesta inmune, sin que se aumente el riesgo de efectos secundarios. Las principales características que presentan estas moléculas es su presencia y conservación en el patógeno de interés, su visibilidad por parte del sistema inmune del hospedero y su habilidad de activar una respuesta inmune (111).

La secuenciación de los genomas microbianos ha hecho posible el descubrimiento de todos los posibles epítopes T CD8+ y CD4+ de cada patógeno que pudieran estar disponibles para el desarrollo de vacunas y fundamentó la aparición de la estrategia para identificación de candidatos vacunales llamada vacunología reversa(112). De esta manera, desde que se secuenció el primer genoma de un organismo en 1995 (*Haemophilus influenzae* Rd)(113) se determinó que existía un gran potencial de esta nueva tecnología para identificar proteínas o mezclas de proteínas que pudieran ser usadas para una vacuna. El método de vacunología reversa por lo tanto, ofrece 2 ventajas grandes: primero, favorece la identificación de un espectro más amplio de candidatos, incluyendo proteínas que no se habían identificado antes debido a que estaban enmascaradas por otras más inmunodominantes, y segundo, permite la identificación de blancos vacunales de organismos que son difíciles de cultivar en el laboratorio(111).

La vacunología reversa se basa en el uso combinado de información genética e inmunológica para identificar antígenos relevantes para el diagnóstico o el desarrollo de vacunas. En este contexto, la identificación de epítopes reconocidos por células T CD4+ o T CD8+ se puede utilizar en “reversa” como herramienta para identificar nuevos antígenos. Se pueden diseñar entonces, péptidos con una unión predicha hacia diferentes tipos o supertipos de HLA con el objetivo de cubrir la mayor parte de las poblaciones en zonas endémicas. El efecto o la reactividad inmune de los péptidos se pueden probar con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de individuos expuestos o vacunados. Si el antígeno es inmunodominante o frecuentemente reconocido en el proceso natural de la infección (ya sea luego de una vacunación o exposición natural), esta estrategia podría llevar a un “hit” hasta en casos cuando la precisión de las predicciones bioinformáticas son tan bajas como 10% (112).

Un punto importante que se debe tener en cuenta en el contexto de la predicción de epítopes es la gran cantidad de polimorfismos asociados a las moléculas HLA, de tal manera que cada molécula tiene su grado de especificidad con relación a la unión del péptido, por lo que probar grandes cantidades de epítopes se torna poco práctico. Para resolver este inconveniente, existen 2 soluciones: primero seleccionar un número limitado de alelos (entre 10-15, dependiendo de la clase de HLA y el locus considerado), esto permite la cobertura de parte de la población (114–116). Segundo, se ha visto que aunque diferentes alelos están asociados con diferentes especificidades de unión, la mayoría de los alelos de HLA pueden ser categorizados en “supertipos” los cuales pueden estar asociados con un gran número de péptidos solapantes específicos(117–120). Por lo tanto, si se enfoca la búsqueda hacia este grupo de alelos se favorecería una cobertura de cerca del 90% en la población general con pocas secuencias de péptidos. Además, aunque la frecuencia de los diferentes alelos puede variar dramáticamente en diferentes grupos étnicos, la frecuencia de los “supertipos” es relativamente constante en las diferentes poblaciones (112).

La mayoría de los enfoques vacunales llevan principalmente a la inducción de anticuerpos contra un patógeno específico, lo que en muchos casos es necesario y suficiente para la eficacia de la vacuna, que en estos casos lleva a la inactivación directa del patógeno de interés por la acción neutralizante de los anticuerpos o por cooperación con células inmunes. Sin embargo, bien se sabe que los anticuerpos no pueden inducirse eficientemente en ausencia de células CD4+, las cuales juegan un papel importante en la expansión y diferenciación de las células B. Además, la activación de células CD8+ cuya respuesta celular es un elemento clave para la inmunidad contra patógenos intracelulares como *Toxoplasma*, juegan un rol primordial para la defensa, lo que pone de manifiesto la importancia y la necesidad de la inmunidad celular en el diseño y eficacia de una vacuna. En este punto, se evidencia de nuevo la importancia de la información genómica de los organismos de estudio, con lo que se pueden dilucidar por medio de herramientas bioinformáticas las secuencias de epítopes CD4 o CD8 para el diseño de péptidos.

Un punto álgido en estas metodologías es la demostración de las respuestas citotóxicas inducidas por péptidos sintéticos luego de un diseño bioinformático. En los últimos 10-15 años se han introducido tecnologías como el marcaje con tetrámeros, ELISPOT o marcaje intracelular, lo que ha permitido la medición exacta de las respuestas celulares. El monitoreo de la inmunidad celular es de particular interés en casos donde las respuestas de células CD4+ y CD8+ se creen que son de relevancia para la protección y la eliminación de la infección.

9.7 Referencias

1. Takeuchi, O.; Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010, 140:805–20.
2. Gonzalez RMS, Shehata H, O’Connell MJ, Yang Y, Moreno-Fernandez ME, Chougnet CA, et al. *Toxoplasma gondii*-derived profilin triggers human toll-like receptor 5-dependent cytokine production. *J Innate Immun*. 2014, 6:685–94.
3. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005, 308:1626–9.
4. Plattner F, Yarovinsky F, Romero S, Didry D, Carlier MF, Sher A, et al. *Toxoplasma* Profilin Is Essential for Host Cell Invasion and TLR11-Dependent Induction of an Interleukin-12 Response. *Cell Host Microbe*. 2008, 3:77–87.
5. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*. 2001, 167:416–23.
6. Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2007, 179:1129–37.
7. Aosai F, Rodriguez Pena MS, Mun H-S, Fang H, Mitsunaga T, Norose K, et al. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones*. 2006, 11:13–22.
8. Mun HS, Aosai F, Norose K, Piao LX, Fang H, Akira S, et al. Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. *Infect Immun*. 2005, 73:4634–42.

9. Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, et al. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol.* 2000, 1:83–7.
10. Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168:5997–6001.
11. Yarovinsky F, Kanzler H, Hieny S, Coffman RL, Sher A. Toll-like Receptor Recognition Regulates Immunodominance in an Antimicrobial CD4+ T Cell Response. *Immunity.* 2006, 25:655–64.
12. Jankovic D, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, Collazo CM, Sher A. In the absence of IL-12, CD4+ T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10-/- setting. *Immunity.* 2002, 16:429–39.
13. Hou B, Benson A, Kuzmich L, DeFranco AL, Yarovinsky F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108:278–83.
14. Kim L, Butcher BA, Lee CW, Uematsu S, Akira S, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. *J Immunol.* 2006, 177:2584–91.
15. Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol.* 2014, 14:109–21.
16. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med.* 1983, 158:670–89.
17. Murray HW, Gellene RA, Libby DM, Rothermel CD, Rubin BY. Activation of tissue macrophages from AIDS patients: in vitro response of AIDS alveolar macrophages to lymphokines and interferon-gamma. *J Immunol.* 1985, 135:2374–7.
18. Pfefferkorn ER, Rebhun S, Eckel M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res.* 1986, 6:267–79.
19. Pfefferkorn ER. 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.* 1984, 81:908–12.
20. Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol.* 1990, 144:2725–9.
21. Murray HW, Szuro-Sudol A, Wellner D, Oca MJ, Granger AM, Libby DM, et al. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun.* 1989, 57:845–9.
22. Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis.* 1992, 165:513–7.

23. Gutierrez Escobar AJ, Gómez-Marin JE. *Toxoplasma gondii*: Identification of a putative nitric oxide synthase motif DNA sequence. *Exp Parasitol*. 2005,111:211–8.
24. Gómez JE, Bonhomme A, Guenounouz M, Pinonz JM. Mecanismos efectores del interferón gamma contra la infección por *Toxoplasma gondii*. *Biomedica*. 1999, 19:311–20.
25. Gómez-Marín J. No NO Production during Human *Toxoplasma* Infection. *Parasitol Today*. 2000,16:131.
26. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol*. 2004, 2:820–32.
27. Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol*. 2004, 34:323–31.
28. Murray HW, Juangbhanich CW, Nathan CF, Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J Exp Med*. 1979, 150:950–64.
29. Wilson CB, Tsai V, Remington JS. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *J Exp Med*. 1980, 151:328–46.
30. Bekpen C, Xavier RJ, Eichler EE. Human IRGM gene “to be or not to be.” *Seminars in Immunopathology*. 2010, 32:437–44.
31. Bekpen C, Hunn JP, Rohde C, Parvanova I, Guethlein L, Dunn DM, et al. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol*. 2005,6:92.
32. Khaminets A, Hunn JP, Könen-Waisman S, Zhao YO, Preukschat D, Coers J, et al. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol*. 2010,12:939–61.
33. Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJP, et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Cell Biol*. 2006, 174:2063–71.
34. Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Schell G, Reichmann G, et al. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog*. 2005, 1:0187–201.
35. Melo MB, Jensen KDC, Saeij JPJ. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends in Parasitology*. 201,27: 487–95.
36. Selleck EM, Fentress SJ, Beatty WL, Degrandi D, Pfeffer K, Virgin IV HW, et al. Guanylate-binding Protein 1 (Gbp1) Contributes to Cell-autonomous Immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2013, 9.

37. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008, 40:1107–12.
38. Degrandi D, Konermann C, Beuter-Gunia C, Kresse A, Würthner J, Kurig S, et al. Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol.* 2007,179:7729–40.
39. Kresse A, Konermann C, Degrandi D, Beuter-Gunia C, Wuerthner J, Pfeffer K, et al. Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics.* 2008,9:158.
40. Niedelman W, Sprockholt JK, Clough B, Frickel EM, Saeij JPJ. Cell death of gamma interferon-stimulated human fibroblasts upon *Toxoplasma gondii* infection induces early parasite egress and limits parasite replication. *Infect Immun.* 2013, 81:4341–9.
41. Dimier IH, Bout DT. Interferon- γ -activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: A role for intracellular iron. *Immunology.* 1998,94:488–95.
42. Lees MP, Fuller SJ, McLeod R, Boulter NR, Miller CM, Zakrzewski AM, et al. P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*, by human and murine macrophages. *J Immunol.* 2010,184:7040–6.
43. Witola WH, Mui E, Hargrave A, Liu S, Hypolite M, Montpetit A, et al. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun.* 2011; 79:756–66.
44. Gorfu G, Cirelli KM, Melo MB, Mayer-Barber K, Crown D, Koller BH, et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *MBio.* 2014,5.
45. Johnson JJ, Roberts CW, Pope C, Roberts F, Kirisits MJ, Estes R, et al. In vitro correlates of Ld-restricted resistance to toxoplasmic encephalitis and their critical dependence on parasite strain. *J Immunol.* 2002, 169:966–73.
46. Parker SJ, Roberts CW, Alexander J. CD8⁺ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin Exp Immunol.* 1991, 84:207–12.
47. Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 1990, 145:3438–41.
48. Blackwell JM, Roberts CW, Alexander J. Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in BALB H-2 congenic mice. *Parasite Immunol.* 1993, 15:317–24.
49. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J Immunol.* 1992, 148:1792–6.

50. Henriquez FL, Woods S, Cong H, McLeod R, Roberts CW. Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design. *Trends Parasitol.* 2010,26:550–5.
51. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998,11:569–88.
52. Roberts, Craig; Prasad, Sheela; Khaliq, Farzana; Gazzinelli, Riccardo; Khan, Imtiaz; McLeod R. Adaptive immunity and genetics of the host immune response. In: *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan perspectives and methods* 2 ed. 2014. 819–994.
53. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 2004, 40:71–80.
54. Suzuki Y RJ. Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. *Res Immunol.* 1993, 144:66–7.
55. Subauste CS, Remington JS. Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current Opinion in Immunology.* 1993,5:532–7.
56. Reichmann G, Walker W, Villegas EN, Craig L, Cai G, Alexander J, et al. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. *Infect Immun.* 2000, 68:1312–8.
57. Séguin R, Kasper LH. Sensitized lymphocytes and CD40 ligation augment interleukin-12 production by human dendritic cells in response to *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.* 1999,179:467–74.
58. Subauste CS, Wessendarp M. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell pro. *J Immunol.* 2000, 165:1498–505.
59. Hunter CA, Subauste CS, Remington JS. The role of cytokines in toxoplasmosis. *Biotherapy.* 1994, 7:237–47.
60. Araujo FG. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect Immun.* 1989, 57:2246–8.
61. Brinkmann V, Remington JS, Sharma SD. Vaccination of mice with the protective F3G3 antigen of *Toxoplasma gondii* activates CD4+ but not CD8+ T cells and induces *Toxoplasma* specific IgG antibody. *Mol Immunol.* 1993,30:353–8.
62. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol.* 1991, 146:286–92.
63. Sharma SD, Hofflin JM, Remington JS. In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1985, 135:4160–3.

64. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn T a, Wolf S, Sher a. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, 90:6115–9.
65. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1988,240:516–8.
66. Kasper LH, Khan IA, Ely KH, Buelow R, Boothroyd JC. Antigen-specific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1992,148:1493–8.
67. Blanchard N, Gonzalez F, Schaeffer M, Joncker NT, Cheng T, Shastri AJ, et al. Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol*. 2008,9:937–44.
68. Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, et al. *Toxoplasma gondii* HLA-B*0702-restricted GRA7(20-28) peptide with adjuvants and a universal helper T cell epitope elicits CD8(+) T cells producing interferon- γ and reduces parasite burden in HLA-B*0702 mice. *Hum Immunol*. 2012,73:1–10.
69. Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, et al. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A*0201. *Vaccine*. 2011, 29:754–62.
70. Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, et al. Human immunome, bioinformatic analyses using HLA supermotifs and the parasite genome, binding assays, studies of human T cell responses, and immunization of HLA-A*1101 transgenic mice including novel adjuvants provide a foundation for HLA-A03 restricted C. *Immunome Res*. 2010,6:12.
71. Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol*. 1991, 147:3955–9.
72. Yano A, Aosai F, Ohta M, Hasekura H, Sugane K, Hayashi S. Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. *J Parasitol*. 1989, 75:411–6.
73. Valdès V, Legagneur H, Watrin V, Paris L, Hascoët JM. Toxoplasmose congénitale secondaire à une réinfection maternelle pendant la grossesse. *Arch Pediatr*. 2011, 18:761–3.
74. Caamaño J, Tato C, Cai G, Villegas EN, Speirs K, Craig L, et al. Identification of a role for NF-kappa B2 in the regulation of apoptosis and in maintenance of T cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2000, 165:5720–8.
75. Villegas EN, Elloso MM, Reichmann G, Peach R, Hunter CA. Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1999, 163:3344–53.

76. Dzierszinski F, Pepper M, Stumhofer JS, LaRosa DF, Wilson EH, Turka LA, et al. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. *Infect Immun*. 2007, 75:5200–9.
77. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunological Reviews*. 2005,207:145–57.
78. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano GI, De Los Santos K, Sparwasser T, et al. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002, 17:211–20.
79. Neefjes J, Ovaas H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nat Chem Biol*. 2013, 9:769–75.
80. Lo WL, Allen PM. Self-Peptides in TCR Repertoire Selection and Peripheral T Cell Function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014, 373:49–67.
81. Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2004, 16:76–81.
82. Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J*. 2001, 20:2357–66.
83. Yewdell JW, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2003, 3:952–61.
84. Momburg F, Roelse J, Hämmerling GJ, Neefjes JJ. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med*. 1994,179:1613–23.
85. Chang S-C, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. *Proc Natl Acad Sci*. 2005, 102:17107–12.
86. Lefrançois L, Obar JJ. Once a killer, always a killer: from cytotoxic T cell to memory cell. *Immunol Rev*. 2010, 235:206–18.
87. Obar JJ, Khanna KM, Lefrançois L. Endogenous naive CD8⁺ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity*. 2008, 28:859–69.
88. Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003, 3:269–79.
89. Cui W, Kaech SM. Generation of effector CD8⁺ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev*. 2010, 236:151–66.
90. Gigley JP, Bhadra R, Khan I a. CD8 T Cells and *Toxoplasma gondii*: A New Paradigm. *J Parasitol Res*. 2011, 243796. doi: 10.1155/2011/24379691.

91. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J.* 2007, 48:11–23.
92. Johnson J, Suzuki Y, Mack D, Mui E, Estes R, David C, et al. Genetic analysis of influences on survival following *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol.* 2002, 32:179–85.
93. Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisits MJ, Mui EJ, Finnerty J, et al. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J Infect Dis.* 2002,185:25–36.
94. Cañón-Franco WA, López-Orozco N, Gómez-Marín JE, Dubey JP. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasit Vectors.* 2014,7:427.
95. López-Castillo CA, Díaz-Ramírez J, Gómez-Marín JE. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in Armenia, Colombia. *Rev Salud Pública Bogota.* 2005,7:180-90.
96. Cañón-franco WA, López-orozco N, Gómez-marín JE, Dubey JP. An overview of seventy years of research (1944 – 2014) on toxoplasmosis in Colombia , South America. *Parasit Vectors.* 2014, 4; 7:427. doi: 10.1186/1756-3305-7-427.
97. Gómez-Marín JE, de-la-Torre A, Barrios P, Cardona N, Álvarez C, Herrera C. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. *Acta Trop.* 2012, 122:46–51.
98. Gómez-Marín JE, de-la-Torre A, Angel-Muller E, Rubio J, Arenas J, Osorio E, et al. First Colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5 (5):e1195. doi: 10.1371/journal.pntd.0001195
99. Roberts, CW; McLeod, R; Henriquez, FL.; Alexander J. Vaccination against Toxoplasmosis: Current Status and Future Prospects. In: *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan perspectives and methods* 2 ed. 2014, 995–1045.
100. Cardona NI, Moncada DM, Gómez-Marín JE. A rational approach to select immunogenic peptides that induce IFN- γ response against *Toxoplasma gondii* in human leukocytes. *Immunobiology.* 2015,220:1337-1342.
101. Zhang T-E, Yin L-T, Li R-H, Wang H-L, Meng X-L, Yin G-R. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. *Parasit Vectors.* 2015,8:1–9.
102. Wang Y, Wang G, Ou J, Yin H, Zhang D. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. *Parasit Vectors.* 2014,7:474.
103. Chen J, Li Z-Y, Huang S-Y, Petersen E, Song H-Q, Zhou D-H, et al. Protective efficacy of *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) adjuvated with recombinant IL-15 and IL-21 against experimental toxoplasmosis in mice. *BMC Infect Dis.* 2014, 14:487.
104. Hassan IA, Wang S, Xu L, Yan R, Song X, Li X. Immunoglobulin and cytokine changes induced following immunization with a DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* selenium-dependent glutathione reductase protein. *Exp Parasitol.* 2014, 146:1–10.

105. Zheng B, Lu S, Tong Q, Kong Q, Lou D. The virulence-related rhostry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. 2013, 31:4578–84.
106. Parmley S, Slifer T, Araujo F. Protective effects of immunization with a recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Infect Dis*. 2002, 185:90–5.
107. El Bissati K, Zhou Y, Dasgupta D, Cobb D, Dubey JP, Burkhard P, et al. Effectiveness of a novel immunogenic nanoparticle platform for *Toxoplasma* peptide vaccine in HLA transgenic mice. *Vaccine*. 2014,32:3243–8.
108. El Bissati K, Chentoufi AA, Krishack PA, Zhou Y, Woods S, Dubey JP, et al. Adjuvanted multi-epitope vaccines protect HLA-A*11:01 transgenic mice against *Toxoplasma gondii*. *JCI insight*. 2016, 22;1(15):e85955.
109. Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, et al. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine*. 2010,28:3977–89.
110. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. 2000,3:445–50.
111. Donati C, Rappuoli R. Reverse vaccinology in the 21st century: Improvements over the original design. *Ann N Y Acad Sci*. 2013, 1285:115–32.
112. Sette A, Rappuoli R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity*. 2010, 33:530–41.
113. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. *Science*. 1995, 269:496–512.
114. Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, et al. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol*. 1998,160:3363–73.
115. Sette a, Sidney J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics*. 1999, 50:201–12.
116. Sette A, Sidney J. HLA supertypes and supermotifs: A functional perspective on HLA polymorphism. *Current Opinion in Immunology*. 1998,10: 478–82.
117. Doytchinova IA, Guan P, Flower DR. Identifying human MHC supertypes using bioinformatic methods. *J Immunol*. 2004, 172:4314–23.
118. Doytchinova IA, Flower DR. In silico identification of supertypes for class II MHCs. *J Immunol*. 2005; 174:7085–95.
119. Hertz T, Yanover C. Identifying HLA supertypes by learning distance functions. In: *Bioinformatics*. 2007.

120. Kanguane P, Sakharkar MK, Rajaseger G, Bolisetty S, Sivasekari B, Zhao B, et al. A framework to sub-type HLA supertypes. *Front Biosci.* 2005,10:879–86.

10 Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis humana

GÓMEZ-MARÍN, Jorge Enrique

Centro de Investigaciones Biomédicas Manuel Elkin Patarroyo Murillo en la Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

10 Resumen

La toxoplasmosis es una enfermedad compleja que cubre un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde una forma asintomática a infecciones diseminadas en el paciente inmunosuprimido¹. Recientemente el uso de bioterapias en pacientes con artritis basada en anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) aumentó el grupo de pacientes que pueden presentar manifestaciones cerebrales y oculares².

En ocasiones se pueden observar casos de miositis, miocarditis o neumonitis en personas inmunocompetentes en Guyana Francesa (norte de América del Sur) y en Colombia, llegando incluso a ser fatales o requerir de soporte ventilatorio en unidades de cuidado intensivo^{3,4,5}. Se ha postulado que las cepas de la región amazónica podrían ser más virulentas lo cual explicaría estas presentaciones clínicas tan inusuales. Ninguna de las manifestaciones de la infección es específica y por ello el diagnóstico debe incluir un análisis diferencial utilizando diversas pruebas de laboratorio que permitan confirmar el diagnóstico y poder ofrecer un tratamiento oportuno y adecuado¹.

10.1 Toxoplasmosis ganglionar

La toxoplasmosis ganglionar es una causa frecuente de consulta, usualmente benigna y que se presenta en el 15% de quienes adquieren la infección¹. La intensidad de sus manifestaciones probablemente depende de la dosis y virulencia de la cepa. Se pueden afectar las cadenas cervicales (Figura 22), axilares o inguinales y se acompaña de astenia y adinamia; en algunos casos puede llevar a un síndrome de fatiga crónica. Su importancia clínica radica en el diagnóstico diferencial que se debe hacer con linfoma, aunque recientemente también se le ha dado importancia a la probabilidad de desarrollar retinocoroiditis después de una toxoplasmosis adquirida ganglionar o asintomática.

A pesar de que no hay estudios longitudinales de seguimiento que determinen cual es la probabilidad de desarrollar retinocoroiditis después de una toxoplasmosis ganglionar, existen reportes de brotes y de casos esporádicos que permiten estimar que entre el 3% y 10% de los casos pueden terminar con compromiso de la retina⁶.

Por esta razón, aunque en Europa y Estados Unidos muchos consideran que la toxoplasmosis ganglionar no requiere tratamiento. En el caso de la toxoplasmosis adquirida en Sudamérica dado el riesgo de desarrollar lesiones oculares hasta en un 10% de los casos⁷ se recomienda el tratamiento con antibióticos en todos los casos sintomáticos⁶.

El clínico debe llevar a cabo una evaluación general y descartar otras causas de eventos linfoproliferativos, que puedan ser benignos como en el caso de la mononucleosis o malignos como el linfoma. Por esta razón, en caso de no existir respuesta al tratamiento o presentarse aumento en el tamaño de los ganglios o que las adenopatías se fijen a estructuras profundas o presenten cambios en su consistencia, es necesario llevar a cabo una biopsia⁸.



Figura 22 Adenopatía cervical en un caso de toxoplasmosis adquirida. La flecha indica la zona de adenopatía. Jorge E. Gómez M., archivo personal.

La confirmación de una infección toxoplásmica reciente como causa de la presencia de adenomegalias, se hace con pruebas para la detección positiva de IgG e IgM anti-*Toxoplasma* y un resultado de prueba de avidez baja para IgG específica⁹. La biopsia permite confirmar el diagnóstico y descartar otras etiologías. Los aspectos histopatológicos típicos son la hiperplasia folicular, la presencia de células epitelioides dentro del área paracortical y distensión de los sinusoides por presencia de linfocitos B. Estos mismos hallazgos se pueden encontrar en leishmaniasis, histoplasmosis o mononucleosis infecciosa o ser similares a los hallazgos en el linfoma de Hodgkin⁹. Un tratamiento de un mes con Trimetoprim-Sulfametoxazol (40 mg sulfamethoxazol/ 8 mg trimetoprim per kg) dos veces al día mostró ser eficaz en un estudio doble ciego aleatorio¹⁰.

10.2 Toxoplasmosis congénita

La toxoplasmosis está considerada dentro de las entidades del complejo TORCHs (Toxoplasmosis, Rubeola, Citomegalovirus y Herpesvirus) que son las causas más importantes de infección fetal. Las manifestaciones clínicas tiene un espectro amplio que va desde infecciones asintomáticas hasta lesiones cerebrales y oculares severas. En muchos casos se presenta como un cuadro similar a sepsis neonatal con dificultad respiratoria, ictericia y déficit neurológico. Un metanálisis publicado en 2013 en el Boletín de la Organización mundial de la Salud¹¹ estimó la incidencia anual de toxoplasmosis congénita a nivel mundial en 190,100 casos (95% intervalos de confianza: 179,300-206,300).

Se encontró que las regiones con mayor frecuencia de toxoplasmosis congénita fueron Sudamérica y algunos países de Oriente Medio y de bajos ingresos¹¹.

Los resultados de estudios colaborativos y multicéntricos en toxoplasmosis congénita en los últimos años han aportado nuevos conocimientos y conceptos que han transformado de manera significativa nuestra comprensión del problema, lo cual ha tenido grandes implicaciones para el diseño de los programas de control. Un aspecto clave ha sido el hallazgo de diferencias en el desenlace clínico de los niños con toxoplasmosis congénita de Sudamérica con respecto a los niños europeos y de Norteamérica, lo cual tiene implicaciones en la actitud terapéutica y de seguimiento clínico¹².

La primera evidencia firme de esta diferencia o divergencia geográfica apareció durante el estudio colaborativo “Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis” o SYROCOT¹³. En este estudio se encontró que el riesgo de lesiones oculares fue mucho mayor en las cohortes de niños infectados en Sudamérica (47%; 18/38) que en las cohortes europeas (14%, 79/550). Esto luego fue confirmado en un estudio prospectivo durante cuatro años de cohortes en Europa y Brasil, el cual encontró que los niños brasileños tenían lesiones oculares más grandes y numerosas, comparadas con sus contrapartes en Europa¹⁴. Esto puede explicarse por la diferencia entre las cepas en América del Sur y las de Europa o Norteamérica^{15,16}.

El primer estudio multicéntrico colombiano en toxoplasmosis congénita¹⁷ aportó experiencia para implementar los programas de control y nuevos conocimientos epidemiológicos. En este estudio en 19 hospitales y centros de atención materno infantil de siete ciudades, se recolectaron 15,333 muestras de sangre de cordón umbilical y se aplicaron varios métodos para determinar marcadores de riesgo para la infección. Se encontraron 15 niños con la infección congénita (incidencia de 1 caso por 1,000 recién nacidos).

Entre ellos, ocho casos eran asintomáticos y se les inició tratamiento. De los ocho niños sin síntomas, tres tuvieron tratamiento en el embarazo. En contraste, ocho niños tenían síntomas diversos, ninguno de ellos fue diagnosticado durante el embarazo y ninguno recibió tratamiento antes del nacimiento.

Entre los 15 niños con infección confirmada, 3 murieron antes del primer mes de vida (20% de letalidad). Los pediatras no sospechaban de toxoplasmosis como causa de los síntomas en estos niños y si no se hubiera hecho el programa de tamización no se hubieran detectado. Por primera vez en un estudio epidemiológico sobre toxoplasmosis congénita, se logró descubrir una relación entre alta o baja frecuencia de marcadores de riesgo para toxoplasmosis congénita y alta o baja precipitación de lluvias por ciudad respectivamente¹⁷. Esto fue confirmado recientemente en un estudio metagenómico con muestras de suelo de Norte, Sudamérica y la Antártida y en el cual se halló la correlación entre mayor presencia de ADN de *Toxoplasma* y la humedad del suelo¹⁸.

Dos cuadros clínicos son los más frecuentes: una forma visceral con hepatoesplenomegalia e ictericia similar a sepsis neonatal y un síndrome neurológico acompañado de daño ocular. En el caso del síndrome visceral o similar a sepsis neonatal, la hiperbilirrubinemia característicamente es de predominio de la bilirrubina directa y puede acompañarse de trombocitopenia.

La forma visceral tiende a presentarse de manera separada de la forma neurológica. Las formas neurológicas son indicativas de infecciones maternas adquiridas durante el primer trimestre de embarazo y por tanto de que la infección ocurrió *in utero*.

Las formas neurológicas pueden presentarse con hidrocefalia, microcefalia y microftalmia¹⁹. La triada clásica es hidrocefalia o dilatación ventricular, calcificaciones intracerebrales (Figura 23) y retinocoroiditis.

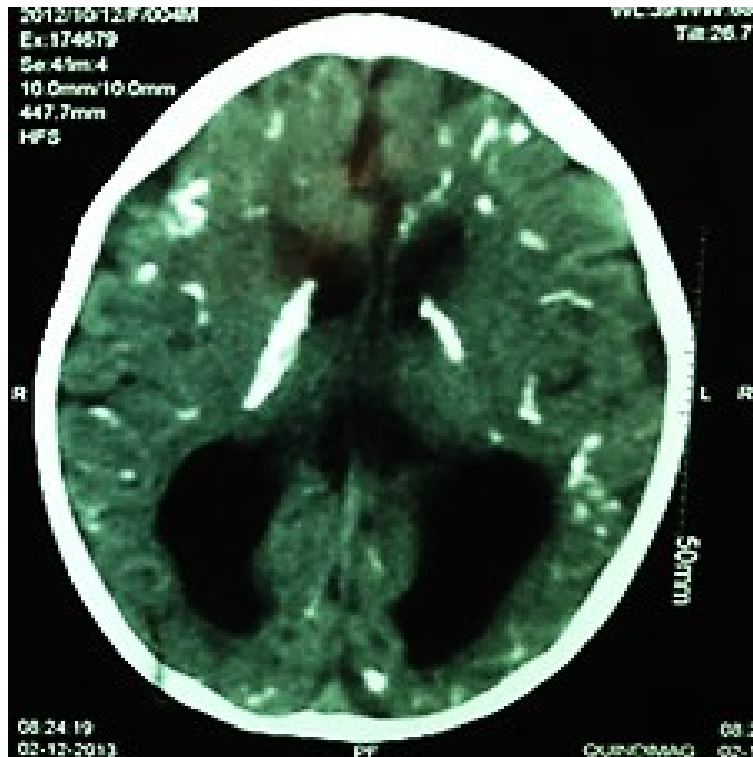


Figura 23 Calcificaciones intracerebrales y dilatación ventricular. La imagen corresponde a una tomografía cerebral de un niño con toxoplasmosis congénita (Jorge E. Gomez-Marin, archivo personal).

Se debe realizar un examen físico buscando alteraciones del perímetro cefálico, hepatoesplenomegalia o ictericia en las primeras 24 horas de vida. Ninguna de las manifestaciones en recién nacidos es patognomónica para toxoplasmosis y también pueden encontrarse en otras infecciones fetales incluyendo citomegalovirus, rubeola, herpes virus y sífilis.

El diagnóstico en el recién nacido entonces recae principalmente en la serología. En todos los niños sintomáticos (con síntomas compatibles con síndrome de TORCH) o asintomáticos es necesario utilizar la detección tanto de IgM como de IgA anti-*Toxoplasma* para el diagnóstico. Existe un grupo de niños en los cuales no se encuentra ni IgM ni IgA y por ello todo niño con sospecha o que su madre haya tenido criterios de infección durante el embarazo debe ser seguido hasta la desaparición de los IgG cuando no se encuentra ni IgM ni IgA específicas¹⁹. Debido que puede detectarse una disminución de la IgM en niños cuya madre se infectó en los primeros meses de gestación o se presenta la inhibición o reducción en la presencia de anticuerpos específicos cuando la madre ha tenido tratamiento, el diagnóstico no se puede hacer basándose sólo en pruebas para IgM, por esta razón la combinación de pruebas permite mejorar la sensibilidad del diagnóstico y se pueden utilizar los siguientes criterios diagnósticos:

- a. Niños con prueba ISAgA o ELISA para IgM o IgA anti-*Toxoplasma* positivas en sangre de cordón (se debe confirmar a los 10 días de vida pues puede haber paso de IgM o IgA maternas durante el parto) o en los meses que siguen al nacimiento.
- b. Niños con persistencia de títulos de IgG anti-*Toxoplasma* más allá del primer año de vida.
- c. Niños que no tienen descenso de los títulos IgG anti-*Toxoplasma* o cuando estos títulos aumentan durante el seguimiento a partir del tercer mes de vida.

Un aporte reciente ha sido el criterio de avidez baja de la IgG anti-*Toxoplasma* adicional a la presencia de IgM o IgA específicas²⁰. Esta avidez baja no es consecuencia de la que tiene la madre, sino que refleja la baja avidez inicial en la respuesta inmune del niño. La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en sangre del recién nacido no aportó criterios adicionales a los métodos de detección de IgM o IgA y se debe tener en cuenta que en niños de madres tratadas con espiramicina durante la gestación, puede existir la infección aunque se presente en una baja probabilidad los marcadores serológicos habituales (IgM e IgA) y por lo tanto es necesario realizar el seguimiento serológico mensual de los niveles de IgG en muchos de estos niños para poder llevar a cabo el diagnóstico²⁰.

En Colombia entre 2011 y 2012 se desarrollaron las primeras guías en el mundo con metodología formal y basadas en evaluación GRADE y que incluyen evaluaciones socioeconómicas^{21,22,23}. Las guías se encuentran disponibles en el sitio web: <http://gpc.minsalud.gov.co>. Una revisión reciente enfatiza el uso de Pirimetamina y Sulfadiazina con ácido folínico (Leucovorin) durante un año como medicamentos de primera línea²⁴. Se da una dosis de Pirimetamina 2 mg/kg el primer día y luego a 1 mg/Kg día (no exceder 15 mg/día) y de Sulfadiazina 100 mg/Kg/día repartido en dos dosis. Se debe realizar un análisis del cuadro hemático mensualmente y se debe discontinuar el tratamiento y cambiar a Azitromicina si los neutrofilos caen por debajo de 800/mm³. Para recurrencias en retinitis en niños, se recomienda la Azitromicina o la Clindamicina como segunda línea junto con pirimetamina. La prednisona (1 mg/kg/día) se puede dar por corto tiempo cuando hay vitreitis en polo posterior afectando la fovea o el nervio óptico o cuando las proteínas en líquido cefalorraquídeo (LCR) son mayores a 1 g/dL²⁴. Los esteroides se empiezan luego de dar las dosis de carga de pirimetamina con sulfadiazina y se mantiene hasta observar la reducción en inflamación vítrea o cuando las proteínas en LCR desciendan por debajo de 1 g/dL²⁴. Las convulsiones en un niño con toxoplasmosis congénita se tratan mejor con Levotiracetam (Kepra), ya que en contraste al fenobarbital no induce enzimas hepáticas que degradan a la pirimetamina, ni desplaza la sulfadiazina de la albumina como la difenihidantoina y no dispara toxicidad en médula ósea asociada a la carbamazepina (Tegretol)²⁴. En caso de convulsiones mioclónicas asociadas a recurrencias en SNC se ha observado mejoría con dieta cetónica²⁴.

Se debe llevar a cabo un seguimiento serológico que permita determinar si hay respuesta terapéutica asociada a una reducción de los niveles de anticuerpos en los niños durante el año de tratamiento. Se considera que hay un rebote inmunológico si se elevan los títulos de IgG por encima de 200 UI, o menos si la última serología para IgG fue negativa²⁴. También puede presentarse una IgM positiva cuando previamente estaba negativa. Estos eventos de rebote inmunológico se pueden correlacionar con suspensión del tratamiento o episodios febriles o malnutrición²⁵. En cohortes francesas los rebotes inmunológicos luego de suspender el tratamiento al completar un año, no estuvieron relacionados con aparición de nuevas lesiones de coriorretinitis²⁵. De hecho se observó negativización de los anticuerpos IgG hasta en un 30% de los niños durante el tratamiento y su reaparición luego de suspenderlo al año²⁵.

10.3 Toxoplasmosis en pacientes inmunosuprimidos

La reactivación de una infección por *Toxoplasma* es la principal causa de daño cerebral en pacientes con SIDA. En 60% de los casos en los pacientes con infección por VIH, se presenta una alteración en el estado mental con síntomas de focalización y con hemiparesia como manifestación más frecuente²⁶. También hay parálisis de pares craneales, ataxia y disimetría.

El riesgo de aparición de esta presentación la tienen los individuos con presencia de anticuerpos séricos IgG anti-*Toxoplasma* y cuentas de CD4+ menores a 200/ml²⁷. El diagnóstico se basa en la presencia de hallazgos clínicos y radiológicos. Existen unos criterios propuestos por el Control Disease Center de Estados Unidos (CDC): I) inicio reciente de una lesión neurológica focalizada o de alteración en el estado de consciencia; II) lesión con efecto de masa demostrada por tomografía cerebral y III) anticuerpos IgG para *T. gondii* positivos o respuesta clínica o radiológica al tratamiento específico²⁸. La lesión típica en la tomografía o TAC es múltiple, hipodensa, con predilección por los ganglios basales y cuando se usa medio de contraste se observa una lesión hipercaptante en “diana”. En lesiones de fosa posterior en ocasiones el TAC no permite visualizar la lesión como sí lo puede hacer la RNM o resonancia magnética nuclear. Sin embargo, los linfomas primarios de cerebro no pueden ser distinguidos de la toxoplasmosis cerebral por estos métodos. En la práctica la confirmación diagnóstica se basa en una respuesta favorable al tratamiento específico. El diagnóstico diferencial se debe hacer con linfoma en primer lugar y con leucoencefaloptia multifocal o abscesos por hongos o por micobacterias²⁶.

Otra población susceptible de reactivación son los pacientes que reciben trasplantes o terapia biológica con anticuerpos anti TNF α . En estos pacientes la sintomatología incluye cefalea (en 49%–55%), fiebre (41%–47%), cambios de conducta (37%–38%), confusión (15%–52%), letargia (12%–43%), hemiparesia (39%–49%), convulsiones (24%–29%), ataxia (~30%) y parálisis de pares craneales (17%–28%)²⁸⁻³⁴. La cefalea es significativamente menos frecuente y los síntomas de focalización significativamente más frecuentes, en toxoplasmosis cerebral que en otras neuroinfecciones³⁵. Se debe tener en cuenta que hasta un 10% de los pacientes pueden presentar encefalitis difusa sin lesiones focales [36-38]. En las imágenes de resonancia magnética nuclear, en T1 las lesiones pueden aparecer como áreas focales de baja intensidad la que aumenta luego de inyectar gadolinium. En T2 las lesiones tienen una intensidad alta relativa³⁶⁻³⁸. La toxoplasmosis extra-cerebral es rara y se ve en inmunosupresiones avanzadas y con lesiones concurrentes en el sistema nerviosos central en el 41% de los casos³⁹⁻⁴¹. En los pacientes con trasplante cardíaco los síntomas ocurren en los primeros tres meses luego del trasplante y consiste en una miocarditis febril con encefalitis o neumonitis²⁸. La incidencia de toxoplasmosis adquirida del donante es menos frecuente en trasplantes de otros órganos sólidos^{32,42}.

El diagnóstico etiológico es crucial para los pacientes con infección por VIH, ya que un tratamiento oportuno es eficaz y mejora la calidad de vida posterior⁴³. Se recomienda usar un algoritmo basado en criterios de hallazgos en las imágenes (TAC o resonancia) junto con una prueba positiva para IgG anti-*Toxoplasma* y confirmado por una respuesta al tratamiento específico con Pirimetamina-Sulfadiazina o Trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) por 14 días⁴⁴. Los niveles elevados de IgG anti-*Toxoplasma* tienen un alto valor predictivo positivo para el diagnóstico^{45,46}. El PCR no es muy útil y tiene sólo una sensibilidad de 18% en sangre periférica y como mucho de 35% en líquido cefalorraquídeo⁴⁷⁻⁵³. Por lo tanto los estudios hasta ahora no muestran utilidad de la prueba de PCR para diagnóstico^{35,47-53}. La falta de mejoría luego del tratamiento debe llevar a realizar una biopsia estereotáxica^{54,55}. La biopsia cerebral permite confirmar otras causas como linfoma o tuberculosis^{54,55}.

La profilaxis primaria se realiza en todo paciente con VIH con terapia antirretroviral o no y con linfocitos CD4+ T <200/ μ L⁵⁶. El antibiótico recomendado es una tableta al día de TMP-SMX (160 mg trimetoprim y 800 mg sulfametoxazol) [56]. Para el tratamiento cuando aparecen los síntomas, se sigue un esquema de seis semanas de pirimetamina más sulfadiazina y ácido fólico⁵⁵, este último se usa para evitar la toxicidad hematopoyética⁵⁷. En países donde no se obtiene la sulfadiazina, se puede utilizar la combinación pirimetamina-sulfadoxina (sulfa de vida media larga) en dosis semanal⁵⁸ o TMP-SMX⁵⁹⁻⁶³.

En los pacientes que no toleran las sulfas una alternativa es combinar pirimetamina con clindamicina (300 mg, cuatro veces al día)⁶⁴. El tratamiento es exitoso en 70%–85% de los pacientes [65-66]. Adicionalmente, el esquema antirretroviral HAART (Highly Active anti Retroviral Therapy) ha aumentado de manera significativa la sobrevida de los pacientes infectados por el VIH y disminuido la incidencia de la toxoplasmosis cerebral⁵⁵. La reacción idiosincrática de Stevens-Johnson se caracteriza por fiebre y lesiones muco-cutáneas en pacientes que utilizan sulfadiazina o sulfadoxina combinadas con pirimetamina o sulfametoxazol con trimetoprim⁶⁷. La frecuencia reportada es de 1,2 por 100,000 exposiciones a la pirimetamina-sulfa y de 1,5 por 100,000 exposiciones para el TMP-SMX. Las tasas son mayores en adultos (1,7 casos por 100,000 exposiciones a la pirimetamina sulfa y 2,6 casos por 100,000 exposiciones al TMP-SMX) y en personas con infección por el VIH (4,9 casos por 100,000 exposiciones a pirimetamina-sulfas y 8,4 casos por 100,000 con TMP-SMX)⁶⁷.

Luego del tratamiento de una infección sintomática en el inmunosuprimido se requiere una profilaxis secundaria para evitar recrudescencias (>50%)^{68,69}. En estos casos la combinación de TMP-SMX no es eficaz y se debe prescribir pirimetamina con sulfadiazina o clindamicina^{68,69}. Esta profilaxis secundaria puede ser discontinuada de manera segura cuando los linfocitos CD4+ T hayan aumentado a > 200 células/mm³ durante tres meses consecutivos⁷⁰⁻⁷².

La toxoplasmosis ocular es responsable del 30 al 50% de los casos de uveitis posterior en personas inmunocompetentes y en algunos países es una de las causas más importantes de trastorno visual^{73,74}. Esta forma clínica de toxoplasmosis lleva a un deterioro importante de la calidad de vida de los pacientes sobre todo si tiene lesiones bilaterales y mayor número de recurrencias⁷⁵. De acuerdo con los reportes de varias series, esta forma clínica es más común en Sudamérica, el Caribe y algunos sitios en África comparado a Europa y Norte América⁷⁶. En Colombia la incidencia se ha estimado en 3 nuevos casos por 100,000 habitantes por año⁷⁷ mientras que en Gran Bretaña es de 0,4 casos por 100,000 habitantes por año⁷⁸. Adicionalmente la forma ocular es más severa en Sudamérica, debido a la presencia de cepas virulentas que llevan a la respuesta inmune a un tipo Th2^{79,80}.

Existe evidencia de acuerdo con reportes de brotes, de los hallazgos de un estudio longitudinal de varios años en Brasil y de estimaciones de prevalencia en la población, que entre un 2% a un 19% de las infecciones postnatales pueden terminar en retinocoroiditis⁸¹⁻⁸³. Según nuestras estimaciones en Colombia, esto ocurre en 5% de las personas infectadas y de ellas el 20% tienen alteración de la función visual en el ojo afectado⁸⁴. Esta amplia variación del riesgo puede ser influida por factores como la dosis del inóculo, la cepa del parásito o la susceptibilidad del hospedero. No existe evidencia que permita atribuir el peso específico de cada uno de estos factores potenciales para determinar el pronóstico de aparición de lesión ocular y por lo tanto no se conocen los factores predisponentes que permitan definir los pacientes con riesgo entre los que adquieren la infección. Se recomienda el seguimiento de los casos de toxoplasmosis ganglionar o recientemente adquirida sin otros síntomas, con fundoscopia periódica. El período entre la adquisición de la infección y la manifestación ocular ha variado entre dos semanas a cuatro meses, por lo tanto debería hacerse un seguimiento mensual durante los primeros seis meses. De acuerdo con el estudio en Brasil pueden aparecer lesiones nuevas entre uno y siete años después, aunque no existe estudio que valide el beneficio del seguimiento más allá del año⁸².

Aunque existen reportes de la existencia de una frecuencia mayor de ciertos polimorfismos en los genes para varias citocinas en personas con lesiones oculares por *Toxoplasma* comparado a controles infectados pero sin lesión ocular⁸⁵⁻⁸⁷ no es posible llegar a conclusiones definitivas sin análisis de ligamiento genético y análisis funcional de las consecuencias de estos polimorfismos para poder establecer si realmente estos son determinantes de la susceptibilidad a la forma ocular.

La mayoría de los casos se distinguen por presentar focos discretos de retinocoroiditis⁸⁸. Las lesiones en su fase inicial se caracterizan por la presencia de un exudado inflamatorio y al terminar la inflamación se inicia un proceso de pigmentación característico (Figura 24).

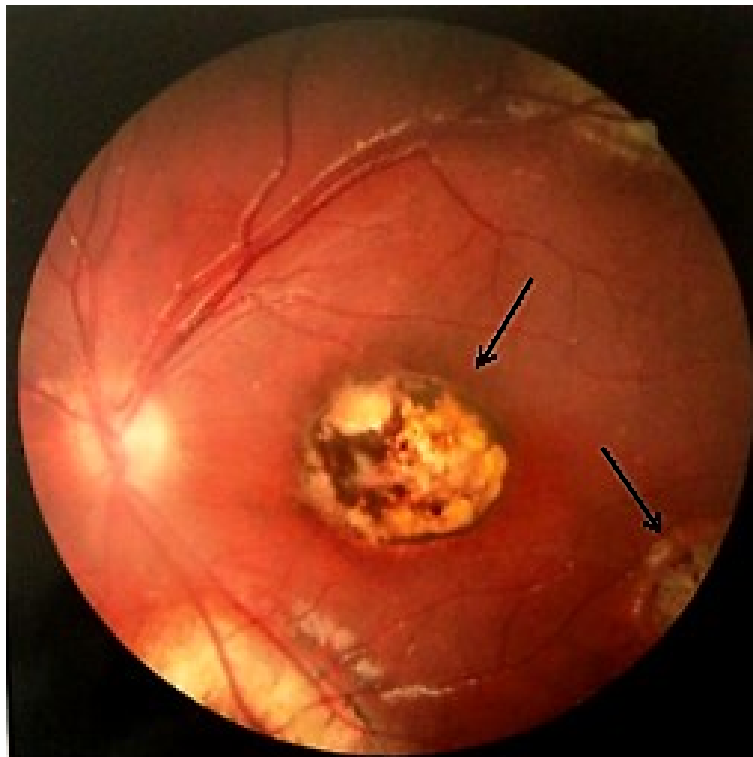


Figura 24 Cicatriz de coriorretinitis pigmentada típica de toxoplasmosis ocular (flechas). Foto de fondo de ojo (Jorge E. Gómez-Marín, archivo personal).

Otra característica de la forma ocular de la toxoplasmosis es su tendencia a recurrir lo cual puede llevar a extensión en el tamaño de la lesión o a la aparición de nuevos focos⁸⁹. Uno de los sitios donde se encuentra con mayor frecuencia la retinocoroiditis es la mácula. El diagnóstico se hace por la sintomatología y el examen clínico. Los pacientes manifiestan visión turbia y disminución de la agudeza visual. Al fondo de ojo durante la fase inflamatoria se encuentra una vitreitis que impide ver la retina, cuando ha disminuido un poco la inflamación se encuentra el signo de la “llamarada en la niebla”, que corresponde al exudado inflamatorio^{88,90}. Las recurrencias suelen tomar lugar en los bordes de estas cicatrices. En un estudio en casos colombianos, el número promedio de recurrencias fue de dos recurrencias cada 11 años⁸⁹. El índice ajustado de recurrencias mostró que los factores asociados a recurrencias fueron el uso previo de esteroides orales sin antibióticos y la inyección subconjuntival de esteroides, por lo tanto es recomendable evitar estas prácticas terapéuticas⁸⁹. El diagnóstico diferencial es muy amplio y debe incluir las causas no infecciosas como las uveitis autoinmunes (predominantes en la tercera y cuarta década de la vida) y las infecciosas como la toxocariasis -indistinguible durante la fase inflamatoria-, tuberculosis, lúes e histoplasmosis ocular⁹¹.

Las lesiones se deben describir de acuerdo con su tamaño con respecto al disco óptico. Durante el examen oftalmológico se puede encontrar vitreitis, uveitis anterior, vasculitis o papilitis. Las complicaciones más frecuentes son el estrabismo, hipertensión ocular, sinequias, cataratas, desprendimiento de retina, iritis o edema macular cistoide^{77,78}.

No hay diferencias en distribución según género o edad^{77,78}. Se encuentra ceguera definitiva unilateral en 24% a 37% de los casos^{77,78}. Una de las consecuencias poco advertidas de la toxoplasmosis ocular es la disminución en el campo visual, todo paciente debería tener un análisis de campimetría⁹².

Esto podría explicar el riesgo aumentado de accidentes de tránsito en los pacientes con toxoplasmosis, incluyendo pacientes que no saben que tienen cicatrices de retinocoroiditis, tal como hemos encontrado en los estudios de tamización por fundoscopia en personas sin historia previa de enfermedad visual^{83,84}.

De acuerdo con los criterios de Holland se realiza una clasificación de la toxoplasmosis ocular según el origen congénito o adquirido, el estado de actividad inflamatoria y la localización⁹¹.

Con base en la manera de adquisición: la toxoplasmosis ocular se clasifica como congénita si es transmitida durante la primoinfección de la madre embarazada a su bebé, estos casos se definen por un diagnóstico hecho desde el nacimiento o por la presencia de síntomas oculares como estrabismo y cicatriz de retinocoroiditis desde el nacimiento. La forma adquirida ocurre si el individuo se infecta luego del nacimiento, a cualquier edad y se define por la presencia de anticuerpos IgM específicos acompañados o no por la IgA específica. Es indeterminada si no es posible precisar el momento de la infección.

De acuerdo con el estado de actividad inflamatoria: La toxoplasmosis ocular se clasifica en activa si se observa la presencia de una lesión inflamatoria color blanco-cremosa retinocoroidea acompañada generalmente de celularidad vítrea, con o sin presencia de uveítis anterior. A su vez la forma activa es primaria si se presenta una lesión de retina color blanco-cremosa focal no asociada a lesiones cicatrizales retinocoroideas en ninguno de los ojos y activa recurrente cuando se presenta una lesión retinocoroidea activa en pacientes con cicatrices retinocoroideas previas, ya sea en el ojo afectado o en el contralateral. El estado cicatrizal inactivo se define por el hallazgo de una lesión retinocoroidea atrófica con bordes hiperpigmentados, o una lesión retinocoroidea hiperpigmentada antigua, sin otros signos de inflamación intraocular⁹¹.

De acuerdo con la localización: las lesiones ocurren frecuentemente cerca de la mácula o perimaculares, también pueden encontrarse papilares o en la periferia de la retina. Estas localizaciones definen el compromiso de la agudeza visual siendo las maculares las que llevan a mayor déficit visual y las periféricas a menor reducción, sin embargo todos los pacientes deberían evaluarse a nivel del campo visual que puede comprometerse en el caso de las lesiones periféricas⁹¹. El diagnóstico no puede ser basado solamente en el examen clínico oftalmológico pues hasta 20-30% de las lesiones características no son toxoplasmosis⁹¹ y lesiones atípicas ocasionales pueden presentarse en la toxoplasmosis, por lo cual se hace necesario el uso de pruebas de laboratorio^{92,93}. Las pruebas en sangre periférica son necesarias pero no son suficientes. Si una prueba es negativa para IgG anti- *Toxoplasma* se debe buscar otra etiología, pero sí la prueba es positiva esto no es confirmatorio. Se puede encontrar IgM específica lo cual indica una infección reciente⁹⁴. También se puede detectar ADN de *Toxoplasma* en sangre pero esto tampoco es confirmatorio, pues también se puede encontrar hasta en el 30% de pacientes asintomáticos y sin lesiones oculares⁸⁰. Por esta razón se propone un algoritmo diagnóstico (Figura 25) que se inicia con las pruebas en sangre periférica.

La Sociedad Internacional de Enfermedades Inflamatorias Oculares propone la adopción de los criterios de diagnóstico por Holland y colaboradores⁹¹.

Estos criterios son: a) lesión fundoscópica altamente sugestiva consistente en lesión de retinocoroiditis con bordes hiperpigmentados o lesión inflamatoria retinocoroidea, b) presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma* IgG positivos y c) la exclusión de otras causas de lesiones necrotizantes en el fondo de ojo⁹¹. De esta manera, si la lesión es típica y los anticuerpos positivos se inicia tratamiento. Luego de cinco semanas de tratamiento con antibióticos y esteroides, sí no hay respuesta evidenciada por disminución en la inflamación o si la lesión no es típica, se indica la punción en humor acuoso. La punción de la cámara anterior se realiza con una aguja de jeringa de insulina.

El procedimiento se realiza bajo anestesia tópica y profilaxis antibiótica. El volumen que puede ser tomado es entre 150 a 200 microlitros. Se debe tomar una muestra de sangre en brazo de manera simultánea. Inicialmente se debe realizar una PCR en humor acuoso, si este es positivo se confirma la infección lo cual se encuentra hasta en el 28% de los casos^{93,95}.

El PCR en humor acuoso es positivo en 30-40% de los casos y confirma el diagnóstico⁹⁵. Si es negativo se determina la presencia de anticuerpos IgG y se compara la carga de anticuerpos entre suero y humor acuoso y pruebas de Western blot para cada isotipo (G, M y A) lo cual permite diagnosticar el 40-60% de los casos^{91,95}.

La presencia de IgM o IgA específicos por Western blot en humor acuoso y su ausencia en suero o la presencia de una banda diferente en el Western blot para IgG en humor acuoso con respecto al suero, son los criterios que confirman el diagnóstico. El uso de la PCR en tiempo real según un estudio en 34 casos y 76 controles, combinado con Western blot y la carga local de anticuerpos permite diagnosticar hasta el 90% de los casos⁹⁵.

Si las pruebas son negativas se busca otra etiología (Toxocara, Herpesvirus, Citomegalovirus, etcétera) según sea indicado por la clínica o antecedentes. Durante las reactivaciones o recurrencias no se observan cambios significativos en los niveles de anticuerpos, por lo tanto el seguimiento es meramente clínico, aunque en estudios previos hemos reportado que puede encontrarse IgM en el 28% o IgA en el 14% de los casos con recurrencias⁹⁶.

Como explicamos más arriba, en la actualidad se sabe que el PCR en sangre periférica no es un criterio útil para diagnóstico de toxoplasmosis ocular ni para el seguimiento, ya que puede ser positivo en personas inmunocompetentes sin lesión ocular o en pacientes con retinocoroiditis por *Toxoplasma* activa o inactiva⁸⁰.

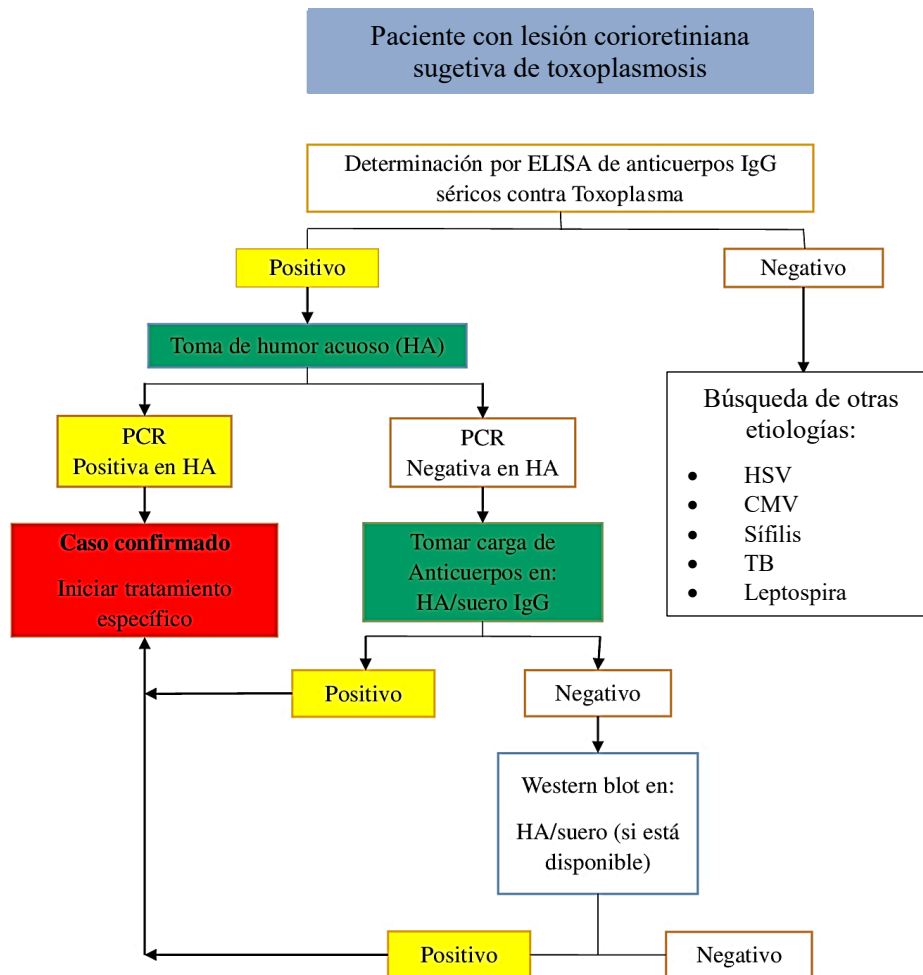


Figura 25 Algoritmo diagnóstico para toxoplasmosis ocular.

Cuando existan muestras de vitrectomía estas pueden utilizarse igualmente para inoculación en ratón. La medición de la carga local de anticuerpos (lo cual es una simple relación entre los niveles de IgG por ELISA entre suero y humor acuoso) ha reemplazado el coeficiente de Desmonts-Witmer. Esta carga se estima dividiendo el resultado en UI/ml de las IgG específicas en suero (diluido 1/300) con las de humor acuoso, también en UI/ml (diluido 1/10). Si el índice es menor a 2 indica infección ocular por *Toxoplasma*, entre 2 y 3 es dudoso y mayor a 3 es negativo.

El coeficiente de Desmonts Witmer implicaba medición de los IgG totales por inmunodifusión radial para las mismas muestras. Lo que si se debe hacer todavía es determinar que la barrera hematocular está intacta, midiendo la presencia de anticuerpos anti sarampión en el humor acuoso, la cual debe ser negativa. Dado el hecho de una alta prevalencia de sarampión en la población y que este virus no produce coriorretinitis, todo anticuerpo anti-sarampión presente en el humor acuoso es de origen sérico y evidencia una transudación pasiva.

De acuerdo con las observaciones realizadas sobre casos en los cuales se han utilizado esteroides sin antibióticos en Sudamérica, se considera como recomendación para una buena práctica clínica utilizar siempre un esquema que incluya antibióticos⁹⁷ a pesar de un metanálisis que no demostraba mayor beneficio con la adición de antibióticos⁹⁸. Esto se debe a la diferencia en presentación clínica entre los casos europeos y sudamericanos.

La recomendación basada con la revisión de la evidencia es la utilización en casos no complicados y como tratamiento inicial en adultos (mayores de 50 kg) una dosis inicial de 100 mg de pirimetamina (tabletas de 25 mg) el primer día, seguido por una dosis diaria de 50 mg de pirimetamina y 1 g de sulfadiazina (tabletas de 500 mg) dos veces al día, por seis semanas, acompañado de una dosis diaria de 25 mg de ácido fólico una vez al día durante todo el tratamiento (Folinato de calcio o factor citrovorum, nombre comercial es Leucovorin o Rescovulin) utilizado para evitar la anemia⁹⁷. Los antibióticos se acompañan de prednisolona oral 1 mg/kg día desde el tercer día de iniciado el tratamiento y con dosis que disminuyen gradualmente por 2 semanas. Este tratamiento debe darse por mínimo 4 a 6 semanas. En Colombia no existe la presentación farmacológica de combinación Pirimetamina/Sulfadiazina y por lo tanto se debe recurrir a preparaciones magistrales. La combinación pirimetamina/ sulfadoxina ha sido evaluada en infección congénita y en el embarazo y se incluye como opción válida dentro de la guía de tratamiento colombiana para toxoplasmosis congénita y en el embarazo, pero no existen estudios en adultos con toxoplasmosis ocular.

El tratamiento alternativo si no se cuenta con Pirimetamina y Sulfadiazina es trimetoprim 160 mg/ sulfametoxazol 800 mg, cada 12 horas por 6 semanas, acompañado de prednisolona oral 1 mg/kg día desde el tercer día y con dosis que disminuyen gradualmente por 2 semanas⁹⁹. Se debe añadir tropicamida y prednisona tópicas si presenta uveítis anterior activa. En caso de alergia a sulfas es una buena opción la azitromicina 500 mg/día, por un período de 5 semanas con prednisolona oral a dosis de 1 mg/kg/día, disminuyendo gradualmente cada semana a la mitad de la dosis, por un período de 4 a 5 semanas⁹⁹. No existe evidencia suficiente para otros antibióticos⁹⁷. En la fase aguda se debe realizar evaluación semanal de la inflamación (Tyndall, celularidad), tamaño de la lesión y la evolución de la agudeza visual. En caso de no respuesta se debe remitir a retinólogo y evaluar punción de humor acuoso para PCR más otros exámenes según historia o antecedentes. Se debe evaluar la necesidad de inyección intravítrea de clindamicina luego de 10 semanas de tratamiento sin respuesta. En pacientes que no toleran la terapia sistémica o en aquellos en los cuales la enfermedad progresa y no es controlada a pesar del tratamiento sistémico la clindamicina intravítrea puede ofrecer una alternativa con buenos resultados en muchos casos¹⁰⁰. Finalmente se debe advertir al paciente sobre el riesgo de recurrencias que puede variar entre 1 episodio cada 5 o 10 años y que existe un mayor riesgo en los tres primeros años luego de un episodio. El uso de esteroides subconjuntivales o de esteroides sistémicos sin antibiótico está contraindicado en el manejo de retinocoroiditis por *Toxoplasma*⁸⁹.

10.4 Toxoplasmosis y enfermedad mental

Metanálisis recientes de estudios descriptivos del tipo casos y controles, han llamado la atención sobre una posible asociación entre toxoplasmosis crónica y esquizofrenia^{101,102}. La asociación más fuerte encontrada fue en el tercer estudio nacional de salud mental de Estados Unidos (NHANES III), hecho en 7,440 personas entre 15–39 años. Los análisis encontraron una asociación con depresión bipolar tipo I (odds ratio ajustado: 2.4; 95% CI: 1.2– 4.8) pero no con depresión mayor¹⁰³. Estudios previos en ratón habían encontrado modificaciones en el comportamiento de ratones con infección crónica que los hacían más lentos o de respuesta retardada y favoreciendo ser apresados por gatos, lo cual sería una ventaja evolutiva para perpetuar la transmisión del parásito¹⁰⁴⁻¹⁰⁸.

Otros estudios en humanos de tipo descriptivo han encontrado asociación entre infección crónica y cierto tipo de personalidad o reactividad motora retardada y aumento en la probabilidad de accidentes de tránsito, aunque esto último podría explicarse también por la reducción en el campo visual en personas con retinocoroiditis^{109,110}. Algunos estudios *in vitro* con células nerviosas apoyan la existencia de desequilibrios en citosinas^{111,112}. Esto podría ser generado por una respuesta crónica inflamatoria de baja intensidad provocada por la presencia persistente del parásito en tejido nervioso central.

La consecuencia de esto sería un desequilibrio en neurotransmisores, notablemente disminución en la dopamina, lo cual da un apoyo teórico a este tipo de asociación¹¹². Se ha encontrado incluso reducción en densidad sustancia gris en pacientes con toxoplasmosis pero no en controles¹¹³. Se ha llegado hasta realizar estudios de tratamiento aleatorios controlados frente a placebo, utilizando antibióticos para *Toxoplasma* y sin encontrar efecto benéfico hasta ahora^{114,115}.

Una relación definitiva entre esquizofrenia y toxoplasmosis queda todavía por ser establecida pues a pesar de la evidencia epidemiológica y de algunos hallazgos en laboratorio, estos no son suficientes y muchas asociaciones pueden ser epidemiológicas pero no de causalidad. Una prueba definitiva requerirá el aislamiento y tipificación de las cepas y demostrar que el tratamiento específico antiparasitario (o una vacuna) previene la aparición de los síntomas.

10.5 Agradecimientos

La investigación en nuestro laboratorio es financiada por la Universidad del Quindío y Colciencias (Código de proyectos: 111351929258, 111356934687, 111356933664 y 111056934589).

10.6 Referencias

1. Gómez-Marin J.E., Toxoplasmosis. In Gomez-Marin, J.E., Protozoología médica: Protozoos parásitos en el contexto latinoamericano, 1st ed. Editorial *Manual Moderno*, Bogotá 2010, 65.
2. Lassoued S, Zabraniecki L, Marin F, Billey T. Toxoplasmic chorioretinitis and antitumor necrosis factor treatment in rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2007, 36:262-263.
3. Carne B, Demar M, Ajzenberg D, Darde ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15:656-658.
4. Sobanski V, Ajzenberg D, Delhaes L, Bautin N, Just N. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2013, 187:1143-1145.

5. Pino L.E., Salinas J.E., López M.C., Descripción de un brote epidémico de toxoplasmosis aguda en pacientes inmunocompetentes miembros de las fuerzas militares de Colombia durante operaciones de selva. *Infectico*. 2009, 13:83-91
6. Sepúlveda-Arias JC, Gómez-Marin JE, Boba B, Naranjo-Galvis CA, Djurković-Djaković O. Toxoplasmosis as a travel risk. *Travel. Med. Infect. Dis.* 2014, 12(6PA):592-601. Doi: 10.1016/j.tmaid.2014.05.007.
7. De-La-Torre A, González G, Díaz-Ramírez J, Gómez-Marín JE. Screening by ophthalmoscopy for *Toxoplasma* retinochoroiditis in Colombia. *Am. J. Ophthalmol.* 2007, 143:354-356.
8. Dorfman RF, Berry GJ. Kikuchi's histiocytic necrotizing lymphadenitis: an analysis of 108 cases with emphasis on differential diagnosis. *Semin. Diagn. Pathol.* 1988, 5:329-345.
9. Durlach RA, Kaufer F, Carral L, Hirt J. Toxoplasmic lymphadenitis--clinical and serologic profile. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003, 9:625-631.
10. Alavi SM, Alavi L. Treatment of toxoplasmic lymphadenitis with co-trimoxazole: double-blind, randomized clinical trial. *Int. J. Infect. Dis.* 2010, 14:67-69.
11. Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2013, 91:501-508.
12. Sauer A, De la Torre A, Gomez-Marin J, Bourcier T, Garweg J, Speeg-Schatz C, Candolfi E. Prevention of Retinochoroiditis in Congenital Toxoplasmosis: Europe Versus South America. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011, 30:601-603.
13. Syrocot. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a metanalysis of individual patient's data. *Lancet.* 2007, 369:115-122.
14. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008, 2:277.
15. Pfaff A, De-La-Torre A, Rochet E, Brunet J, Sabou M, Sauer A, Bourcier T, Gomez-Marin JE, Candolfi E. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 2014, 44:99-107.
16. Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, Petersen E, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.* 2006, 8:2333-2340.
17. Gómez-Marín JE, de-la-Torre A, Angel-Muller E. Et al. First Colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011, 5:e1195.
18. Bates ST, Clemente JC, Flores GE, Walters WA, Parfrey LW, Knight R, Fierer N. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil. *ISME J.* 2013, 7:652-9. Doi: 10.1038/ismej.2012,147.

19. Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011, 30:1056-1061.
20. Torres E, Rivera R, Cardona N, Sanchez V, Lora F, Gómez-Marín JE. Evaluation of IgG anti-*Toxoplasma* avidity and polymerase chain reaction in the postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2013, 32:693-695.
21. Cortés JA, Gómez Marín J, Silva P, Arévalo L, Arévalo I, Álvarez MI, Beltrán S, Corrales I, Ángel Müller E, Ruiz J, Gómez PI, en representación del Grupo Desarrollador de la Guía de atención Integral de embarazo, parto y puerperio. Guía de atención integral para la prevención, detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto y puerperio: sección toxoplasmosis en el embarazo. *Infectio.* 2012, 16:230-246.
22. Chicaíza Becerra L, García Molina M, Oviedo S, Rincón C, Gómez Marín J, Angel Muller E, Rubio A, Arévalo I, Gómez P. Costo efectividad de diferentes estrategias diagnósticas para detección oportuna de infección por *Toxoplasma gondii* en gestantes. Documento Escuela de Economía Universidad nacional de Colombia. N° 36 ISSN 2011-6322 • Junio 2012.
23. Chicaíza L, García Molina M, Oviedo S, Gómez Marín JE, Gómez P. Costo efectividad de diferentes estrategias diagnósticas para detección de toxoplasmosis congénita en el recién nacido. *Infectio.* 2013, 17:53-60
24. McLeod R, Lykins J, Gwendolyn A, et al. Management of Congenital Toxoplasmosis. *Curr. Pediatr. Rep.* 2014, 2:166–194. DOI 10.1007/s40124-014-0055-7
25. Wallon M, Cozon G, Ecochard R, Lewin P, Peyron F. Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. *Eur. J. Pediatr.* 2001, 160:534-540.
26. Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV infected patients. *Future Microbiol.* 2009, 4:1363-1379
27. Pryse-Phillips W. *Companion to Clinical Neurology.* Third Edition. New York: Oxford University Press, 2003.
28. Montoya JG, Giraldo LF, Efron B, Stinson EB, Gamberg P, Hunt S, Giannetti N, Miller J, Remington JS. Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33:629-640.
29. Martino R, Maertens J, Bretagne S, et al. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31:1188-1194.
30. Small TN, Leung L, Stiles J, et al. Disseminated toxoplasmosis following T cell–depleted related and unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marr. Transpl.* 2000, 25:969-973.
31. Lim Z, Baker B, Zuckermann M, et al. Toxoplasmosis following alemtuzumab- based allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J. Infect.* 2007, 54:e83–86.

32. Singh N, Husain S. Infections of the central nervous system in transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 2000, 2:101-111.
33. Au WY, Cheng VCC, Lie AKW. *Toxoplasma gondii* serology and stem cell transplantation in Chinese. *Transplant. Proc.* 2005, 37:4497-4499.
34. Aoun M, Georgala A, Mboumi K, et al. Changing the outcome of toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006, 27:570-575.
35. Cardona N, Basto N, Parra B, Zea AF, Pardo CA, Bonelo A, Gomez-Marin JE. Detection of *Toxoplasma* DNA in the peripheral blood of HIV-positive patients with neuroopportunistic infections by a real time PCR assay. *J. Neuroparasitol.* 2011, 2: Article ID N110402, 6 pages doi:10.4303/jnp/N110402.
36. Menendez JA, Lilien DL, Nanda A, Polin RS. Use of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography for the differentiation of cerebral lesions in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Neurosurg. Focus.* 2000, 8:e2.
37. Kastrup O, Wanke I, Maschke M. *Neuroimaging of infections NeuroRx.* 2005, 2: 324-332.
38. Boska MD, Mosley RL, Nawab M, Nelson JA, Zelivyanskaya M, Poluektova L, Ubert M, Dou H, Lewis TB, Gendelman HE. Advances in neuroimaging for HIV-1 associated neurological dysfunction: clues to the diagnosis, pathogenesis and therapeutic monitoring. *Curr. HIV Res.* 2004, 2: 61-78.
39. Belanger F, Derouin F, Grangeot-Keros L, Meyer L. Incidence and risk factors of toxoplasmosis in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients: 1988-1995. HEMOCO and SEROCO Study Groups. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 28: 575-581.
40. Rabaud C, May T, Lucet JC, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 23: 1249-1254.
41. Rabaud C, May T, Amiel C, Katlama C, Leport C, Ambroise-Thomas P, Canton P. Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. *A French National Survey. Medicine (Baltimore)* 1994, 73: 306-314.
42. Matsuo Y, Takeishi S, Miyamoto T et al. Toxoplasmosis encephalitis following severe graft-vs.-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 17 yr experience in Fukuoka BMT group. *Eur. J. Haematol.* 2007, 79: 317-321.
43. Derouin F. Drugs effective against *Toxoplasma gondii* . Present status and future perspective. In: Amboise-Thomas P, Petersen E, eds. Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management, and control, 1st ed. Paris: *Springer Verlag*, 2000, pp95-110.
44. Pryse-Phillips W Companion to Clinical Neurology. Third Edition. *New York: Oxford University Press.* 2003. pp153-65.

45. Gómez Marín JE, Corredor CA, Murcia MI, López MC, Alvarado F, Anzola I, et al. Valor diagnóstico de la medición de IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma* en pacientes infectados por VIH. *Infectio*. 2000, 4:4-10.
46. Hellerbrand C, Goebel FD, Disko R. High predictive value of *Toxoplasma gondii* IgG antibody levels in HIV-infected patients for diagnosis of cerebral toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996, 15:869-872.
47. Nogui F, Mattas S, Turcato-Júnior G, Lewi D. Neurotoxoplasmosis diagnosis for HIV-1 patients by real-time PCR of cerebrospinal fluid. *Braz. J. Infect. Dis.* 2009, 13:18-23.
48. Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C, Jiménez N, Pinillos T, Dorta-Contreras AJ, Cox R, Capó V, Pomier O, Bandera F, Ginorio D Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrosp. Fluid Res.* 2009, 6:2.
49. Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42:4765-4768.
50. Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43:5044-5047.
51. Pelloux, H, Dupouy-Camet, J, Derouin, F, Aboulker, J, Raffi F, Bio-Toxo Study Group. A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *AIDS* 1997, 11:1888-1890.
52. Kompalic-Cristo A, Nogueira SA, Guedes AL, Frota C, González LF, Brandão A, Amendoeira MR, Britto C, Fernandes O. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2004, 98:92-95.
53. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46:1897-900.
54. Smego RA Jr, Orlovic D, Wadula J. An algorithmic approach to intracranial mass lesions in HIV/AIDS. *Int. J. STD. AIDS.* 2006, 17:271-276.
55. Benson CA, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Holmes KK; CDC; National Institutes of Health; Infectious Diseases Society of America. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *Clinical. Infect. Dis.* 2005, 40:S131-235.

56. Masur H, Kaplan JE, Holmes KK; U.S. Public Health Service; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons--2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *Ann. Intern. Med.* 2002, 137:435-78.
57. Van Delden C, Hirschel B. Folinic acid supplements to pyrimethamine- sulfadiazine for *Toxoplasma* encephalitis are associated with better outcome [Letter]. *J. Infect. Dis.* 1996, 173:1294-1295.
58. Gómez Marín JE, Alvarado F, Hernández C, Cuervo S, Saravia J. Tratamiento de la fase aguda de la toxoplasmosis cerebral con Clindamicina- Falcidar (pirimetamina-sulfadoxina) en pacientes infectados por VIH. *Infectio.* 2001, 5:163-169.
59. Torre D, Casari S, Speranza F, et al. Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42:1346-1349.
60. Béraud G, Pierre-François S, Foltzer A, Abel S, Liautaud B, Smadja D, Cabié A. Cotrimoxazole for treatment of cerebral toxoplasmosis: an observational cohort study during 1994-2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009, 80:583-587.
61. Dedicoat M, Livesley N. Management of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected adults (with an emphasis on resource-poor settings). *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006, 3:CD005420.
62. Kongsangdao S., Samintarapanya K., Oranratnachai K., Prapakarn W., and Apichartpiyakul C. Randomized controlled trial of pyrimethamine plus sulfadiazine versus trimethoprim plus sulfamethoxazole for treatment of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J. Int. Assoc. Physicians AIDS Care (Chic).* 2008, 7:11-16.
63. Francis P, Patel VB, Bill PL, Bhigjee AI. Oral trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients--a prospective study. *S. Afr. Med. J.* 2004, 94:51-3.
64. Katlama C, De Wit S, O'Doherty E, Van Glabeke M, Clumeck N. Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 22:268-275.
65. Dannemann BR, McCutchan JA, Israelski DM, et al. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS: a randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. *Ann. Intern. Med.* 1992, 116:33-43.
66. Leport C, Raffi F, Matheron S, et al. Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulfadiazine combination in 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Efficacy of long-term continuous therapy. *Am. J. Med.* 1988, 84:94-100.
67. Gimnig JE, MacArthur JR, M'bang'ombe M, Kramer MH, Chizani N, Stern RS, Mkandala C, Newman RD, Steketee RW, Campbell CH. Severe cutaneous reactions to sulfadoxine-pyrimethamine and trimethoprim-sulfamethoxazole in Blantyre District, Malawi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006, 74:738-43.

68. Podzamczar D, Miró JM, Ferrer E, Gatell JM, Ramón JM, Ribera E, Sirera G, Cruceta A, Knobel H, Domingo P, Polo R, Leyes M, Cosin J, Fariñas MC, Arrizabalaga J, Martínez-Lacasa J, Gudiol F. Thrice-weekly sulfadiazine-pyrimethamine for maintenance therapy of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. Spanish Toxoplasmosis Study Group. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 19:89-95.
69. Leport C, Tournerie C, Raguin G, et al. Long-term follow-up of patients with AIDS on maintenance therapy for toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1991, 10:191-3.
70. Kirk O, Reiss P, Uberti-Foppa C, et al. Safe interruption of maintenance therapy against previous infection with four common HIV associated opportunistic pathogens during potent antiretroviral therapy. *Ann. Intern. Med.* 2002, 137:239-50.
71. Zeller V, Truffot C, Agher R, et al. Discontinuation of secondary prophylaxis against disseminated *Mycobacterium avium* complex infection and toxoplasmic encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 2002, 34:662-7.
72. Miro JM, Lopez JC, Podzamczar D, Peña JM, Alberdi JC, Martínez E, Domingo P, Cosin J, Claramonte X, Arribas JR, Santín M, Ribera E; GESIDA 04/98 Study Group. Discontinuation of primary and secondary *Toxoplasma gondii* prophylaxis is safe in HIV-infected patients after immunological restoration with highly active antiretroviral therapy: results of an open, randomized, multicenter clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 43:79-89.
73. Arevalo JF, Belfort R Jr, Muccioli C, Espinoza JV. Ocular toxoplasmosis in the developing world. *Int. Ophthalmol. Clin.* 2010, 50:57-69.
74. De-La-Torre A, López-Castillo CA, Rueda JC, Mantilla RD, Gómez-Marín JE, Anaya JM. Clinical patterns of uveitis in two ophthalmology centres in Bogota, Colombia. *Clin. Experiment Ophthalmol.* 2009, 37:458-466.
75. De-La-Torre A, González-López G, Montoya-Gutiérrez JM, Marín-Arango V, Gómez-Marín JE. Quality of life assessment in ocular toxoplasmosis in a Colombian population. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2011, 19:262-266.
76. Petersen E, Kijlstra A, Stanford M. Epidemiology of ocular toxoplasmosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2012, 20:68-75.
77. De-La-Torre A, López-Castillo CA, Gómez-Marín JE. Incidence and clinical characteristics in a Colombian cohort of ocular toxoplasmosis. *Eye.* 2009, 23: 1090-1093.
78. Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, et al. Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol. Infect.* 1999, 123:283-289.
79. De-La-Torre A, Sauer A, Bourcier T, Speeg-Schatz C, Ballonzoli L, Ajzenberg D, Sundar N, Grigg ME, Villard O, Brunet J, Pfaff A, Gomez-Marin J, Candolfi E. Severe Southamerican ocular toxoplasmosis is associated with decreased IFN-gamma/IL-17A and increased IL-6/IL-13 intraocular levels. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 2013, 7:e2541.

80. Sánchez V, de-la-Torre A, Gómez Marín JE. Characterization of ROP18 alleles in human toxoplasmosis. *Parasitol. Int.* 2014, 63:463-469.
81. Smith RE, Ganley JP. Ophthalmic survey of a community 1. Abnormalities of the ocular fundus. *Am J Ophthalmol* 1972, 74:1126-1130.
82. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* 1992, 114:136-144.
83. Gómez-Marín JE, de-la-Torre A, Barrios P, Cardona N, Álvarez C, Herrera C. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. *Acta Trop.* 2012, 122:46-51.
84. De-La-Torre A, Gonzalez G, Diaz-Ramirez J, Gomez-Marin JE. Screening by ophthalmoscopy for *Toxoplasma* retinochoroiditis in Colombia. *Am. J. Ophthalmol.* 2007, 143:354-356.
85. De Albuquerque MC, do Couto Aleixo ALQ, Benchimol EI, Leandro ACCS, das Neves LB, Vicente RT, Bonecini-Almeida MG, and Amendoeira MRR. The IFN- γ +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* 2009, 104:451-455.
86. Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL. TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. *Br. J. Ophthalmol.* 2008, 92:986-988.
87. Cordeiro CA, Moreira PR, Bessa TF, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Young LH, Teixeira AL. Interleukin-6 gene polymorphism (-174 G/C) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Acta. Ophthalmol.* 2013, 91: e31.
88. Bosch-Driessen L, Berendscho T, Ongkosuwito JV, Rothova A. Ocular Toxoplasmosis: Clinical Features and Prognosis of 154 Patients. *Ophthalmology.* 2002, 109:869-878.
89. De-La-Torre A, Rios-Cadavid AC, Cardozo-García CM, Gomez-Marín JE. Frequency and factors associated with recurrences of ocular toxoplasmosis in a referral centre in Colombia. *Br. J. Ophthalmol.* 2009, 93:1001-1004.
90. Dodds EM, Holland GN, Stanford MR, et al. Intraocular inflammation associated with ocular toxoplasmosis: relationships at initial examination. *Am. J. Ophthalmol.* 2008, 146:856-865 e2.
91. Garweg JG, de Groot-Mijnes JD, Montoya JG. Diagnostic approach to ocular toxoplasmosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2011, 19:255-261.
92. Scherrer J, Iliev ME, Halberstadt M, Kodjikian L, Garweg JG. Visual function in human ocular toxoplasmosis. *Br. J. Ophthalmol.* 2007, 91:233-236.
93. Garweg JG, Garweg SD, Flueckiger F, Jacquier P, Boehnke M. Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42:4593-4598.

94. Talabani H, Asseraf M, Yera H, Delair E, Ancelle T, Thulliez P, Brézin AP, Dupouy-Camet J. Contributions of immunoblotting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47:2131-2135.
95. Villard O, Filisetti D, Roch-Derries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41: 3537-3541.
96. Gómez Marín JE, Montoya MT, Castaño JC, Alvarado F, Duque AM, Chemla C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM. Frequency of specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000, 95:89-94
97. De-La-Torre A, Stanford M, Curi A, Jaffe G, Gomez-Marin JE. Therapy for Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunol. Inflamm.* 2011, 19:314-320.
98. Gilbert RE, See SE, Jones LV, Stanford MS. Antibiotics versus control for *Toxoplasma* retinochoroiditis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2002, 1:CD002218.
99. Soheilian M, Sadoughi MM, Ghajarnia M, et al. Prospective randomized trial of trimethoprim/sulfamethoxazole versus pyrimethamine and sulfadiazine in the treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology.* 2005, 11:1876-1882.
100. Soheilian M, Ramezani A, Azimzadeh A, Sadoughi MM, Dehghan MH, Shahghadami R, Yaseri M, Peyman GA. Randomized trial of intravitreal clindamycin and dexamethasone versus pyrimethamine, sulfadiazine, and prednisolone in treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology.* 2011, 118:134-141.
101. Flegr J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends Parasitol.* 2013, 29:156-163.
102. Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR, Yolken RH: Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophr. Bull.* 2007, 33:729-736.
103. Pearce BD, Kruszon-Moran D, Jones JL. The relationship between *Toxoplasma gondii* infection and mood disorders in the third National Health and Nutrition Survey. *Biol. Psychiatry.* 2012, 72: 290-295.
104. Hutchison WM, Aitken PP, Wells WP. Chronic *Toxoplasma* infections and familiarity-novelty discrimination in the mouse. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1980, 74:145-150.
105. Hutchinson WM, Bradley M, Cheyne WM, Wells BW, Hay J. Behavioural abnormalities in *Toxoplasma*-infected mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1980, 74:337-345.
106. Hutchison WM, Aitken PP, Wells BW. Chronic *Toxoplasma* infections and motor performance in the mouse. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1980, 74:507-510.
107. Webster JP, McConkey GA *Toxoplasma gondii* -altered host behaviour: clues as to a mechanism of action. *Folia Parasitol.* 2010, 57:95-104.

108. Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007, 104:6442-6447.
109. Worth AR, Lymbery AJ, Thompson RC. Adaptive host manipulation by *Toxoplasma gondii* : fact or fiction?. *Trends Parasitol*. 2013, 29:150-155.
110. Flegr J. Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. *J. Exp. Biol*. 2013, 216:127-133.
111. Stibbs HH. Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 1985, 79:153-157.
112. Prandovszky E, Gaskell E, Martin H, Dubey JP, Webster JP, McConkey GA. The Neurotropic Parasite *Toxoplasma gondii* Increases Dopamine Metabolism. *PLoS ONE*. 2011, 6: e23866.
113. Horacek J, Flegr J, Tintera J, Verebova K, Spaniel F, Novak T, Brunovsky M, Bubenikova-Valesova V, Holub D, Palenicek T, Höschl C. Latent toxoplasmosis reduces gray matter density in schizophrenia but not in controls: voxel-based-morphometry (VBM) study. *World J. Biol. Psychiatry*. 2012, 13: 501-509.
114. Dickerson FB, Stallings CR, Boronow JJ, Origoni AE, Yolken RH. A double-blind trial of adjunctive azithromycin in individuals with schizophrenia who are seropositive for *Toxoplasma gondii*. *Schizophr. Res*. 2009, 112:198-199.
115. Shibre T, Alem A, Abdulahi A, Araya M, Beyero T, Medhin G, Deyassa N, Negash A, Nigatu A, Kebede D, Fekadu A. Trimethoprim as adjuvant treatment in schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Schizophr. Bull*. 2010, 36:846-851.

11 Patogenia y anatomía patológica

RUÍZ-HERNÁNDEZ, Adela Luisa

Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Dirección General de Personal, Avenida Universidad 3000, Copilco El Bajo, 04510 Coyoacan, CDMX

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

11 Resumen

La patogenia de la toxoplasmosis constituye la respuesta de las células o los tejidos ante este parásito, desde el momento inicial de la infección hasta la expresión final de la enfermedad. En este capítulo se aborda desde la adquisición de la infección, diversos mecanismos de transmisión, su diseminación tisular hasta alcanzar la vía linfática y sanguínea generando parasitemia sistémica. La patogenia donde la virulencia tiene un papel fundamental y depende del genotipo de las cepas. La fisiopatogenia que se presenta desde la invasión celular, multiplicación del parásito hasta la formación de calcificaciones importantes en el cerebro. La infección aguda a partir de la diseminación del parásito y como la infección avanza a pulmón, hígado, ganglios linfáticos entre otros órganos con una variada sintomatología. La infección asintomática y como esta puede complicarse posteriormente en procesos neumónicos intersticiales, hepatitis, miocarditis. Sin embargo, en la etapa subaguda con aparente regresión de lesiones viscerales, se presentan afectación del SNC y ojo. El daño a SNC debido a la escasa propagación de los anticuerpos hacia este tejido. La patología ocular como resultante del rompimiento de quistes tisulares básicamente en la retina, la toxoplasmosis congénita en la fase aguda, diseminada y generalizada y sus consecuencias para el producto según la etapa de gestación en la que la madre adquiere la infección y el papel de oportunista que juega este parásito en los pacientes inmunodeprimidos que puede llevar a estos pacientes a la muerte.

La toxoplasmosis es una infección zoonótica parasitaria con un amplio rango de distribución en el mundo. *Toxoplasma gondii*, es un protozoario intracelular obligado del *phylum* Apicomplexa, grupo al que pertenecen especies que expresan como característica estructuras polarizadas, un citoesqueleto complejo y un arreglo organelar localizado en su extremo apical. El parásito puede infectar a diversos animales terrestres, acuáticos y a las aves, de todos ellos, los mamíferos son considerados como el principal grupo afectado y entre estos queda incluido el hombre. El hombre adquiere la infección por diversos mecanismos (ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida de animales infectados, contaminación con heces de gatos, por vía transplacentaria de una madre infectada al producto, transfusiones sanguíneas, entre otros). Cuando el ingreso es por la vía oral mediante la ingestión de ooquistes maduros o de quistes tisulares conteniendo bradizoítos, las secreciones digestivas actúan sobre la pared que rodea a estas estructuras quísticas, permitiendo la liberación de ocho esporozoítos provenientes de un ooquiste o de cientos de bradizoítos, en el caso de los quistes tisulares. Estas masas quísticas llenas de parásitos constituyen un estado exitoso que favorece la existencia del protozoario y que dentro del hospedero muestran una sobrevivencia mayor al transitar por el tracto gastrointestinal, facilitándose el proceso de invasión del intestino delgado. Aparentemente los quistes no se ven afectados por la acción de la respuesta inmune o por fármacos y los bradizoítos contenidos dentro de los quistes tisulares, persisten como formas infectantes, permaneciendo tisularmente a lo largo de la vida del hospedero^{1,2}.

El primer paso para la invasión celular de esporozoítos y bradizoítos es el reconocimiento de un punto de unión en las células epiteliales (enterocitos) de la mucosa intestinal, para su posterior invasión, incluso de células extraintestinales, llevándose a cabo un ciclo de reproducción incompleta. La infección aguda inicial lleva a la diferenciación rápida a taquizoítos, formas intensamente dinámicas e invasivas que cruzan eficientemente el epitelio. Cuando en el hospedero se desarrolla una respuesta inmune como resultado de la infección con *Toxoplasma*, el proceso evoluciona hacia la cronicidad y se forman los quistes tisulares con múltiples bradizoítos. Los parásitos liberados de ooquistes y los liberados de los quistes tisulares se multiplicarán y éstos nuevos trofozoítos pasarán al torrente sanguíneo e incluso a la circulación linfática diseminándose por todo el organismo.

Durante la diseminación tisular, los parásitos llegan a diversos órganos, con un tropismo particular hacia el músculo esquelético, miocardio, sistema nervioso central (SNC), ojo y placenta, entre otros. Se desconoce a la fecha cuáles son las moléculas y ligandos tanto del hospedero como del parásito involucrados en dicho tropismo tisular. En algunos de estos sitios parasitados se observa una regeneración celular a manera de mecanismo compensador de la acelerada multiplicación del parásito, a partir de los nuevos parásitos liberados por rompimiento de la célula invadida, se lleva a cabo la invasión de células cercanas al sitio primario o incluso en células alejadas de éste, para alcanzar de alguna forma la vía linfática y la sanguínea a fin de generar una parasitemia sistémica.

Toxoplasma gondii invade a las células en un proceso que es independiente de la fagocitosis normal, el complejo apical del parásito rápidamente diferenciado en taquizoito, se adhiere y fija a la membrana celular, induciendo diversos cambios en su superficie, penetra generando una invaginación de la membrana plasmática, y formando una unión móvil de las membranas de la célula blanco y del parásito, y en donde se ha encontrado un papel de la producción de hialuronidasas y lisozimas. Como resultado de este proceso se forma un compartimento especializado, una vacuola parasitófora inicialmente originada de la membrana de la célula hospedera y posteriormente modificada por la inserción transmembranal de moléculas secretadas por el parásito intravacuolar y derivada de la membrana de la célula hospedera y del deslizamiento que. La naturaleza molecular de la vacuola parasitófora, evita la fusión de los lisosomas y del efecto lítico por las hidrolasas alojadas en el interior de este organelo. Esta situación que favorece al parásito y permite que prolifere de una manera activa, sin peligro de ser destruido y escapando a las células efectoras y citocinas y anticuerpos generados por la inducción de la respuesta inmune^{3, 4, 5, 6}.

Entre los organelos que tiene el parásito, destacan de manera importante: las roptrias, debido a su papel biológico en la invasión celular, los micronemas por su participación en el proceso de adhesión así como, los gránulos densos que presentan diversos componentes como las proteínas GRA y el inhibidor de serín proteasa-1 (TgPI-1) los cuales son secretados al interior de la vacuola parasitófora. Al ser *T. gondii* un organismo intracelular obligado, la invasión es un hecho trascendental que permitirá su sobrevivencia en el hospedero y donde su proliferación se lleva a cabo básicamente por la multiplicación asexual denominada endodiogenia (intravacuolar), que dará por resultado la formación de células hijas que contendrán todos los elementos requeridos para generar parásitos hijas con las mismas propiedades de virulencia. Cuando el número de taquizoítos dentro de la vacuola parasitófora es elevado, ésta se rompe y provoca lisis, necrosis y consecuentemente una reacción inflamatoria, donde los parásitos liberados iniciarán un proceso repetitivo de invasión en células vecinas que para su multiplicación rápida intravacuolar durante los primeros días de la infección y posteriormente su diseminación hacia ganglios linfáticos mesentéricos y de ahí a todos los órganos del sistema. Aproximadamente diez días después de la infección la proliferación de taquizoítos disminuye gradualmente, dando lugar a la formación progresiva de quistes tisulares⁷.

La capacidad de *T. gondii* para invadir y diseminarse hacia la economía orgánica es su principal efecto patogénico. El esporozoíto, el bradizoíto y el taquizoito pueden tener esa capacidad invasivo-celular; sin embargo, éste último por sus características dinámicas lo hacen la forma más invasiva. Dentro de la patogenicidad de *T. gondii*, la virulencia juega un papel importante, los linajes genéticos del parásito han sido estudiados experimentalmente utilizando modelos animales, encontrándose variedades como los genotipos I, II y III de las diferentes cepas de *T. gondii*. Se han utilizado marcadores microsatélites e isoenzimáticos, mostrándose que los parásitos del tipo II predominan en un 84.6% de pacientes con toxoplasmosis congénita, al igual que en los casos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)⁸.

En modelos murinos, se ha podido determinar que los taquizoítos de las cepas de tipo I muestran la mayor virulencia. Otra causa relacionada con la patogenia es su elevada diseminación, a través de la cual, el parásito realiza migraciones transcelulares, prolifera, destruye a la célula, se libera y alcanza la microcirculación en el tejido conectivo, para su distribución tisular⁹. Se ha analizado la presencia de una proteína chaperone Hsp90 que podría estar vinculada con diversos procesos esenciales del parásito y con la invasión de la célula hospedera, su replicación e incluso con la interconversión de taquizoíto-bradizoíto¹⁰.

El parásito muestra especial afinidad por células del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) y deslizándose por el endotelio vascular, el proceso fisiopatogénico que se presenta en los sitios se debe a la clara invasión celular, multiplicación del parásito, lisis celular, necrosis, desarrollo de zonas focales de consolidación con formación de una lesión granulomatosa, que más adelante consolida en el desarrollo y formación de calcificaciones, particularmente notables en el cerebro. En los sitios en los que la defensa inmune es débil, como es el caso del SNC, los astrocitos comparten propiedades funcionales con los macrófagos, de hecho la barrera hematoencefálica retarda el paso de diversos elementos como los anticuerpos específicos o el interferón gamma, necesarios para bloquear e impedir la multiplicación del parásito. Una Situación semejante se presenta en el ojo.

11.1 Infección aguda

Inicialmente en la infección aguda, la diseminación del parásito es de forma rápida, en sí la etapa intestinal en el hombre es de corta duración y prácticamente asintomática, alcanzando pulmón, hígado, ganglios linfáticos, entre otros órganos. Los taquizoítos se multiplican en la mayoría de células nucleadas, como macrófagos, fibroblastos, células reticulares, células sinusoides de revestimiento, células alveolares y fibras musculares. Es sorprendente la capacidad que muestra esta fase del parásito en su multiplicación celular así como, en su diseminación a diversos tejidos, lo que se ve reflejado en un espectro clínico de variada sintomatología, que genera un síndrome infeccioso indeterminado^{11, 12,13}.

La formación de anticuerpos anti-*Toxoplasma* suele ocurrir entre 7 y 14 días después de la infección y la respuesta inmune mediada por células generalmente se presenta entre 14 y 30 días después. En condiciones de inmunosupresión del hospedero, es frecuente que se genere una importante destrucción celular mucho antes que el individuo elabore una adecuada respuesta inmune llegando incluso a causarse estados graves como encefalitis y muerte. La presentación y la tendencia a evolucionar hacia la gravedad del paciente se deben a la producción de severas zonas de necrosis por infarto y trombosis vascular. En el SNC el parásito puede localizarse tanto en la neurona, como en la microglia. Las lesiones más frecuentes que se aprecian en esta fase son miocarditis, encefalitis, neumonitis intersticial y hepatitis.

El número de parásitos es variable, así como el grado de reacción celular y necrosis, y está asociado a la resistencia que muestra el hospedero y a la virulencia del protozooario. La edad del individuo y el estado inmunológico son importantes, ya que las alteraciones anatomopatológicas serán de mayor intensidad en la infancia, al igual que en aquellos procesos que generen un inmunocompromiso como el SIDA, leucemias y diversos tipos de neoplasias o condiciones con tratamientos farmacológicos inmunosupresores como por ejemplo, el empleo de una terapia prolongada con esteroides, entre otros¹⁴.

11.2 Infección asintomática

En el curso de una infección asintomática o con manifestaciones clínicas poco aparentes, suele observarse la presencia de una hiperplasia linforreticular o histiocitaria, inclusive puede apreciarse la presencia típica de elementos quísticos tisulares. En el caso de tratarse de un cuadro de severa infección es factible el desarrollo de procesos neumónicos intersticiales, hepatitis, miocarditis entre otros. El estudio histopatológico no muestra una imagen típica de las lesiones generadas por el parásito; sin embargo, es posible observar daños focales característicos y una respuesta acompañada con incremento de linfocitos, células mononucleares y células plasmáticas^{12,15}.

En un periodo subagudo del padecimiento, se pueden incluir los casos que presentan lesiones en una fase de aparente regresión de lesiones viscerales, no así las de los casos de afectación del SNC y del ojo, en donde el parásito puede continuar su proliferación. Es probable que un elevado número de individuos en estas condiciones hayan adquirido la infección de forma congénita o, poco tiempo después del nacimiento, mostrándose en ellos poca resistencia al parásito. Puede haber evidencia de una infección aguda previa a manera de acumulaciones focales de linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos, o con proliferación de fibroblastos y consecuentemente el establecimiento de zonas de necrosis¹⁵.

11.3 Toxoplasmosis en el sistema Nervioso Central

La aparente desaparición del parásito en algunas vísceras puede deberse a fenómenos inmunológicos, no así cuando se encuentra en SNC, donde la persistencia y proliferación de *T. gondii* se debe a la escasa propagación de los anticuerpos hacia este tejido. Puede apreciarse localmente un área de alteraciones periventriculares, delimitadas por la presencia de infiltrados celulares, trombosis de pequeños y grandes vasos, con grados variables del proceso necrótico. Hay intensa multiplicación de células de la microglia, muerte de astrocitos y la formación de infiltrados linfocítico y granulocítico, así como, la presencia de material fibroso que afecta capilares cercanos. Las manifestaciones clínicas de una toxoplasmosis subaguda puede estar asociada con hidrocefalia, crisis convulsivas, así como daño en coroides^{4,14,16}.

En la infección crónica, ya sea con presencia o ausencia de manifestaciones clínicas, los quistes conteniendo bradizoítos y que están localizados en SNC, retina y corazón y, por diversos mecanismos no totalmente comprendidos, pueden sufrir rompimiento en alguna etapa de la vida del individuo provocando necrosis tisular^{4,17}. En el SNC la actividad lítica del parásito, induce a la formación de nódulos microgliales focales, así como a la necrosis paraventricular y daño en las células ependimarias y del sistema ventricular, lo que se traduce en la formación de una ependimitis obstructiva e hidrocefalia, donde la vasculitis y el cuadro trombótico conducen a la referida necrosis y posteriormente a la formación de calcificaciones^{1,9} (Figura 26).



Figura 26 Toxoplasmosis congénita. Calcificaciones intracraneales Múltiples, debida a toxoplasmosis congénita tardía en un escolar.

11.4 Toxoplasmosis ocular

La patología ocular que se describe en la toxoplasmosis, es generalmente el resultado del rompimiento de quistes tisulares situados básicamente en la retina, produciéndose en ella lesiones focales. Esta zona se considera un sitio primario de infecciones en ojo; sin embargo, el daño también puede ubicarse en coroides, cámara anterior, vítreo y nervio óptico. Aproximadamente un 10% de las lesiones en ojo tienden a la cronicidad, donde los taquizoítos juegan un papel importante debido su activa proliferación y en consecuencia a la citolisis retiniana. Cuando la infección es congénita, puede afectarse un solo ojo o a ambos, observándose que un elevado número de individuos que cursan con coriorretinitis toxoplásmica, son candidatos a presentar uveítis posterior, síndrome manifiesto, entre población afectada que habita diversas zonas endémicas del padecimiento. Las infecciones que se presentan en edades posteriores habitualmente no afectan ojo, si se trata de infecciones agudas; pero suele presentarse la misma coriorretinitis si se trata de un proceso de infección crónica. El daño en la retina se debe a las lesiones necróticas y es posible la observación del parásito en el tejido retiniano, fundamentalmente puede apreciarse deterioro en el área macular y la típica lesión coriorretiniana pigmentada en “sacabocados; (Figura 27), a través de la cual es posible observar la esclerótica. Este proceso coriorretiniano evoluciona dejando cicatrices en retina y coroides; si el área afectada ocurre a nivel de la mácula, el individuo sufrirá pérdida permanente de la visión. Las lesiones pueden ser solitarias, múltiples o cercanas a un proceso de cicatrización, la cual se describe como maculopatía idiopática aguda, donde la lesión primordial es la de una coriorretinitis necrozante y que dada la severidad del daño puede desarrollar hemorragias en el humor vítreo, desprendimiento de retina y en consecuencia ceguera total^{18,19,20,21,22}.



Figura 27 Fondoscopia. Coriorretinitis bilateral. A) Ojo derecho, se observa una lesión subretiniana blanca con un halo blanco, en la arcada vascular temporal inferior, vemos una cicatriz coriorretiniana con pigmento circundante. B) ojo izquierdo, observamos una lesión inferior que presenta bordes irregulares y fibrosis subretiniana. Donada por la Dra. Carmen Olivier Romo Huerta, Jefa del Departamento de Oftalmología y Banco de Ojos del Nuevo Hospital Civil Hospital Civil of Guadalajara “Dr. Juan I. Menchaca, Guadalajara, Jalisco, Mexico.

11.5 Toxoplasmosis y linfadenopatía

También posterior a la infección aguda y en una fase latente, *T. gondii* puede generar aproximadamente entre el 3 y el 20% una linfadenopatía cervical, siendo éste un dato clínico característico. Las dimensiones de los ganglios son variables oscilando en promedio un diámetro entre 1 y 3 cm. Los ganglios afectados muestran hiperplasia histiocitaria, con formación de conglomerados rodeados por estos histiocitos, que pueden estar presentes en corteza y en médula ganglionar, eventualmente pueden observarse células gigantes multinucleadas. Es posible contar con la confirmación serológica de toxoplasmosis, con la evidencia de la patología tisular y no así, la detección del parásito en el tejido. La formación de granulomas, es una patología que requiere rápido diagnóstico, inicialmente serológico, aunado al estudio histopatológico con la finalidad de descartar procesos linfomatosos diversos, trátese de pacientes inmunocompetentes o inmunocomprometidos. En algunos casos de recién nacidos de madres infectadas y en donde el niño presenta adenopatías, debe establecerse el diagnóstico temprano, debido a que pueden producirse cuadros de meningoencefalitis y daño en otras vísceras ^{12,14,23}.

11.6 Toxoplasmosis congénita

La toxoplasmosis congénita puede circunscribirse a tres fases fundamentales: a) generalizada, b) aguda y c) diseminada, descrita por Pinkerton y Henderson en 1941; la encefalitis aguda resulta en un daño cerebral. Básicamente la infección intrauterina está relacionada con la etapa gestacional en la que el producto la adquiere. Durante el primer trimestre del embarazo el riesgo de infección del producto es aproximadamente del 20%; para el segundo es del 25% y para el tercero del 65%. A diferencia de este riesgo de infección, la patología que se produce en el producto, será inversa considerando los mismos períodos; es decir, en el primer trimestre del embarazo el daño es grave en el 60% de los productos, medianamente grave en el 20% y asintomática en el 20%; para el segundo trimestre el daño será grave en el 30%, medianamente grave en el 25% y un 45% será asintomático. En el caso del último trimestre de la gestación, los casos graves son ocasionales, los de gravedad intermedia se presentarán en un 8% y, el 92% restantes asintomáticos.

Si se considera la totalidad del embarazo se señala que el 72% de los recién nacidos tendrán un curso asintomático, 17% mediana gravedad y el 11% cuadros de magnitud severa ^{18,24}.

Para la infección y patogenia, la genética del parásito es importante ya que determina la replicación rápida del taquizoíto, adicionalmente durante la infección, diversos genes de la respuesta inmune innata y adaptativos son inducidos para su expresión. La presencia y actividad de una respuesta inmune Th1 como célula de respuesta protectora, debe ser también modulada para evitar daño en el hospedero por el proceso inflamatorio; paradójicamente en la toxoplasmosis congénita este patrón de respuesta podría estar modificado, tener un papel protector o, de daño, inducir un aborto o favorecer el paso transplacentario del parásito. La respuesta inmune tipo Th1 no solo es importante para el control de procesos infecciosos, sino también, es fundamental en la implantación exitosa y de apoyo en la supervivencia del trofoblasto. El polimorfismo de genes en ambos fenómenos podría estar relacionado con la susceptibilidad de *T. gondii* y su transmisión vertical, en el aborto o en las diversas patologías en el feto ²⁵. Generalmente los cuadros de toxoplasmosis congénita son debidos a una infección de la madre durante el curso del embarazo, se ha señalado que la infección en la mujer antes de la concepción no es un elemento sustentable para transmitir la parasitosis al niño; sin embargo, la literatura señala casos comprobados que avalan esta situación ²⁶. Por otro lado, en los casos de aborto desencadenados a partir del primer trimestre gestacional, es probable que la mujer cuente con un historial clínico de abortos de repetición y que sin causa anatómica o endocrinológica, puedan deberse en su caso a la toxoplasmosis.

Los productos infectados que sobreviven pueden mostrar lesiones multisistémicas en SNC irreversibles como hidrocefalia, microcefalia, anencefalia, calcificaciones intracraneales y coriorretinitis. En el segundo y tercer trimestre los productos pueden nacer asintomáticos o algunos casos el desarrollo posterior de lesiones oftálmicas como coriorretinitis bilateral. El daño en SNC se manifiesta con el desarrollo de productos que pueden mostrar macrocefalia con hidrocefalia y encefalitis, de nuevo la reacción inflamatoria está presente, conformada por mononucleares y con taquizoítos en la periferia de las mismas ^{24,27,28}. La extensa lesión necrótico-inflamatoria en la toxoplasmosis congénita no es proporcional al número de parásitos presentes en el parénquima, los cuales son de hecho relativamente escasos. La placenta es un órgano regulador dinámico y fuerte, que inicialmente actúa como frontera entre el trofoblasto fetal, las células de la madre y el tejido con el que entra en contacto. El grosor de la barrera placentaria varía según la evolución del embarazo, hacia el final del mismo muestra un espesor de 1 a 2 μm , esta barrera no es estática y su comportamiento dinámico se debe al movimiento de la sangre que ingresa de manera pulsátil al espacio intervelloso. Al final del embarazo existe escaso tejido conectivo dentro de las vellosidades y esto podría explicar el mayor riesgo que existe en las infecciones verticales. La identificación de la zona principal de penetración de *T. gondii* hacia la placenta se desconoce y su identificación permitiría avanzar en la comprensión de la forma este protozoario difunde hacia el feto ^{14,29}.

11.7 Toxoplasmosis en el trasplante de órganos

La incidencia de toxoplasmosis en trasplante de órganos sólidos es mayor en los receptores seronegativos, particularmente cuando se trata de trasplante de corazón y cuyo donante es seropositivo. Es menor en receptores de trasplante de órgano no cardíaco. Los quistes pueden ser transferidos en el órgano y reactivarse en el receptor inmunodeprimido. Los principales problemas a los que se enfrenta un paciente sometido a trasplante son, el rechazo del órgano y a las infecciones. Las novedades terapéuticas inmunosupresoras han disminuido el riesgo de rechazo; sin embargo, las infecciones son un determinante importante en la morbilidad y mortalidad de los pacientes.

Las infecciones causadas por *T. gondii* puede presentarse en el receptor de forma primaria o por la reactivación de una infección latente, ambas situaciones están asociadas en los trasplantes con la aplicación de terapia inmunosupresora, observándose en el paciente periodos de presentación bien definidos o el de un riesgo posterior al trasplante. Inicialmente la presentación de la enfermedad es atípica, generalmente un corazón puede contener masas quísticas en el tejido, a partir del cual el estado proliferativo del parásito se activa y pasan directamente a una fase de diseminación en el individuo receptor, manifestándose más adelante con el desarrollo de focos distantes. Es importante considerar el factor de riesgo en un receptor seronegativo y donador seropositivo. La infección puede adquirirse también con injertos renales o hepáticos, aunque con este último órgano son raros los casos adquiridos mediante la recepción de este órgano. Entre los principales cuadros clínicos que manifiestan a una toxoplasmosis en sujetos trasplantados están la neumonitis necrozante, miocarditis y encefalitis ^{30,31,32}.

11.8 Toxoplasmosis en el paciente inmunodeprimido

Toda la secuencia de eventos que desencadena la respuesta inmune tratando de controlar la fase proliferativa del parásito (taquizoítos) y su paso a la fase quística y ruptura de estas masas, es constante, donde el hospedero se enfrenta además a un proceso de deterioro inmunológico a expensas de la respuesta celular, hasta el desarrollo en la mayoría de los casos a daño encefálico. La toxoplasmosis asociada con el paciente inmunocomprometido, es posible que conlleve a una evolución mortal de la infección, derivada de una reactivación toxoplásmica.

El espectro clínico es manifestado por la patología neurológica, con importante reacción granulomatosa asociada a gliosis y desarrollo de nódulos microgliales, hasta el progreso de una encefalitis con carácter necrosante. La instalación de un proceso granulomatoso se aprecia por la presencia de un abundante infiltrado linfocitario, así como, la presencia de neutrófilos y monocitos que favorecen el desarrollo de lesiones centrales en el área que conforma la necrosis. El estado inmunodepresivo y la constante proliferación de *T. gondii* en paredes vasculares cerebrales apuntan al desarrollo de una hiperplasia fibrótica focal. El daño también puede encontrarse a nivel de plexos coroideos en donde la lesión necrótica persiste y debe considerarse esta ubicación para diferenciarla de las lesiones intra o periventriculares en pacientes con SIDA ya que el tránsito del líquido céfalo raquídeo (LCR) podría ser el vehículo que ofrezca diseminación de la infección ^{4,6,33}. En sí la toxoplasmosis cerebral puede ser la manifestación inicial del SIDA, consecuencia de una reactivación de infección previa y latente, hasta la presentación del estado inmunosupresivo del padecimiento.

11.9 Reactivación de la toxoplasmosis

Una situación particular que demanda atención es la que se observa en las recaídas, es decir individuos que tuvieron toxoplasmosis congénita con largos periodos asintomáticos y con una reactivación posterior. Aún no son claros los mecanismos fisiopatogénicos que originan esta recaída, ni el por qué el daño fundamentalmente se presenta en la retina y no en cerebro; ahora bien, caso contrario sucede en pacientes con SIDA cuya deficiencia de células T induce a la formación de lesiones con elevada proporción de daño en el SNC. La razón de ésta diferencia es aún desconocida, si se considera que los quistes localizados en cerebro y en retina, aparentemente son iguales y que la coriorretinitis y la patología del SNC es producto de procesos inflamatorios y necróticos que rodean al quiste ³⁴. La patología que se origina en sitios diferentes a SNC, ojo o miocardio, esta poco estudiada, solo en situaciones especiales y en casos particulares como el SIDA, es necesaria una vigilancia médica continua sobre las manifestaciones que pudieran presentarse.

Es posible la presencia de daño primario en otro órgano diferente a los que comúnmente se estudia en la toxoplasmosis, por ejemplo cuando la infección se localiza en pulmón o en tubo digestivo, particularmente en este último sitio se ha demostrado una infección activa por *Toxoplasma*, causando parálisis que afecta a células del tracto gástrico como las que se ubican en la capa muscular, macrófagos tisulares y en células endoteliales, apreciándose en estas zonas la presencia de abundantes quistes y los característicos focos necróticos ³⁵ (Figura 28).

La patogenia y la anatomopatología en la toxoplasmosis, no son eventos que se estudien de forma aislada, su mejor entendimiento requiere del conocimiento de la biología del parásito, de la inmunología, biología molecular y la acción multidisciplinaria involucrada. La toxoplasmosis es un proceso dinámico, dado que se da una fluctuación constante en la triada ecológica hospedero, parásito y ambiente. Lo que se conocía sobre el padecimiento se ha reforzado con las nuevas tecnologías, pero también se debe considerar que el ambiente y patrones biológicos, epidemiológicos y derivados de múltiples cambios, podrían ir modificando perceptible o imperceptiblemente la patogenia y la patología en esta enfermedad, donde para algunos especialistas *Toxoplasma gondii* es una especie oportunista y para otros, un auténtico patógeno. En México la toxoplasmosis está presente en todas las áreas aunque con una mayor prevalencia en las zonas costeras, donde el parásito se mantiene infectante, tanto en animales como en el humano. El escaso control de los felinos domésticos y las pobres medidas de control en las unidades de producción de animales de consumo humano están favoreciendo la diseminación del parásito, la infección y el desarrollo de la enfermedad ^{36, 37}.

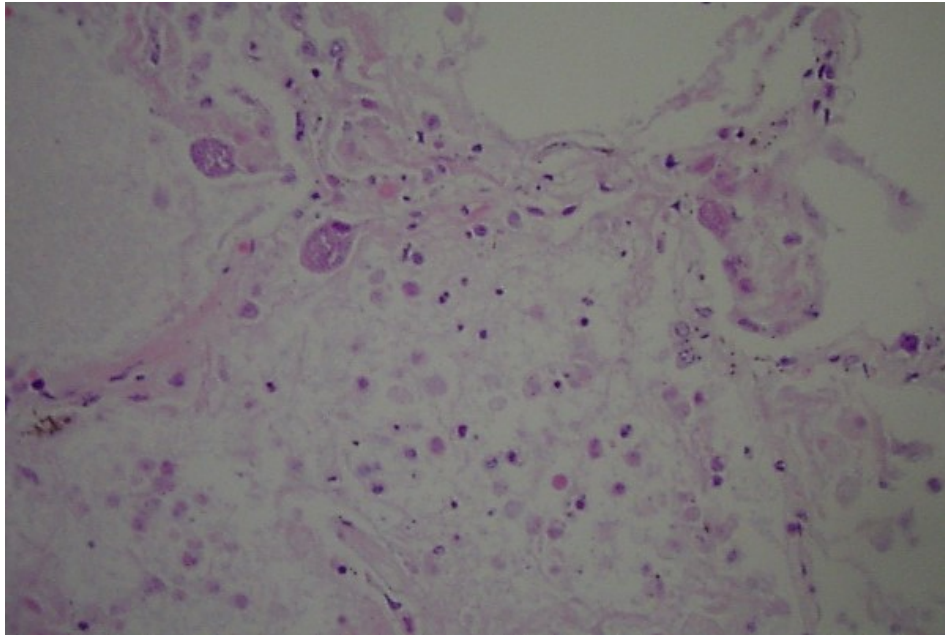


Figura 28 Corte histológico de pulmón (400x) en el que se observan algunos quistes de *Toxoplasma* en el epitelio alveolar con datos de necrosis en las células adyacentes, detritus, algunas células inflamatorias y material proteináceo. Donada por Dr. Ramón Franco Topete Médico Patólogo, Departamento de Microbiología y Patología del CUCS, Jefe del Departamento de Patología del Nuevo Hospital Civil de Guadalajara.

11.10 Referencias

1. Kamekar S. & Davis P.H. *Toxoplasma* on de Brain: Understanding Host-Pathogen Interactions in Chronic CNS Infection. *J. Parasitol. Res.* 2012: ID 589295, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/589295>.
2. Dubey J. The History of *Toxoplasma gondii* – The first 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2008, 55:467-475.
3. Stites D., Terr A., Parslow T. *Inmunología básica y clínica*. 2003, 10a ed. Edit. Manual Moderno.
4. Werner Apt. *Parasitología Humana*. 1a Ed. Edit Mc Graw Hill. 2013. ISBN 978-607-15-0876-8.
5. Martín H.G.I. y García I.S.M. *Toxoplasmosis en el hombre*. *Bioquímica* 2003, 28:19-27.
6. Longo D. y Cols. *Harrison Principios de Medicina Interna*, 18ª. Ed. 2012. McGrawHill Interamericana Editores S. A. de C. V.
7. Alonso Y. *Aplicación de herramientas moleculares para la detección y caracterización genética de Toxoplasma gondii en muestras de pacientes con SIDA*. En tesis.repo.sld.cu/601/1/tesis completa Yenisey Alfonso.pdf. Fecha de acceso 29 de mayo de 2015.
8. Ajzenberg D., Cogné N., Paris L., Bessièrès M.H., Thulliez P., Filisetti D., et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 2002, 186:684-689.

9. Muñiz H.S. y Mondragón F.R. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *REB*. 2009, 28:52-8.
10. Angel S.O., Figueras M.J., Alomar M.L., Echeverria P.C. & Deng B. *Toxoplasma gondii* Hsp90: potential roles in essential cellular processes of the parasite. *Parasitol*. 2014, 141:1138-47.
11. Dardé M.L. & Peyron F. *Toxoplasma* y Toxoplasmosis. *EMC-Pediatr*. 2013, 48:1-12.
12. Gómez A.S., Quaranta A.M., Pirota M.F. y Quaranta T.R. Toxoplasmosis: Sus formas Clínicas. *Rev. Posg. Via Cát. Med*. 2007,165:15-19.
13. Samalvides S.K., Milla L.M., Vila J.R., Espinoza I.O. y Guillén D. Tres formas clínico radiológicas de compromiso neurológico por toxoplasmosis congénita. *Rev Neuropsiquiatr*. 2014, 77:188-195.
14. Perner C., Rodríguez Y., Morales C., Rodríguez J., Hardisson D. y Viquer J.M. Revisión de casos con diagnóstico de toxoplasmosis en el Hospital La Paz de Madrid (1967-2010). *Rev. Esp. Patol*. 2012, 45:5-13.
15. Frenkel J.K., Escjadillo A. Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmosis encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1987, 36:517-22.
16. Frenkel J.K. La Inmunidad en la Toxoplasmosis. *Bol. Sanit. Panam*. 1986, 100:283-299.
17. Bhopale G.M. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*. 2003, 26:213-222.
18. Wilson C.R. Development of adverse sequele in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics*. 1980, 66:767-74.
19. Vaughan D., Asbury T., Riordan P., Cunningham E., Domínguez A. *Oftalmología General*. 2012. 18ª Ed. McGraw-Hill/Interamericana.
20. Dodds E.M. Toxoplasmosis ocular. *Arch. Soc. Exp. Oftalmol*. 2003, 78: 531-41.
21. Dupouy C.J., Talabani H., Delair E., Leslé F., Yera H. and Brézin A.P. Risk Factors, pathogenesis and diagnosis of ocular toxoplasmosis. Cap 7. 2012. INTECH. En <http://dx.doi.org/10.5772/50267>.
22. Bodaghi B., Touitou V., Fardeau C., Paris L. and LeHoang P. Toxoplasmosis: new challenges for an old disease. *Eye*. 2012, 26:241-244; doi: 10.1038/eye.2011.331.
23. González N., Macías P., Gómez T. y Zuyino M. Toxoplasmosis ganglionar. Presentación atípica en un niño inmunocompetente: reporte de caso. *Rev. Enf. Infecc. Pediatr*. 2012, 25:114-117.
24. Díaz L., Zambrano B., Chacon G., Rocha A. Toxoplasmosis y embarazo. *Rev. Obst. Ginecol. Venez*. 2010, 70:190-205.
25. Ortiz L., Caballero H., Cañedo I., Rico C.P., Sahagún A., Medina M. & Correa D. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes. Immun*. 2010, 11:363-373.

26. Vogel N., Kirisits M., Mack D. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 23; 5:55-60.
27. Wong S.Y. and Remington J.S. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 1994, 18:853-62.
28. Frenkel J.K. Congenital toxoplasmosis: prevention or palliation? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1981, 141:359-61.
29. Bayat P., Eslamirad Z. & Shojaees S. Toxoplasmosis: Experimental Vaginal Infection in NMRI Mice and Its Effect on Uterin, Placenta and Fetus Tissues. *Iran Red. Crescent. Med. J.* 2013, 15: 595–599.
30. Cuellar J. y Sierra J. Infecciones en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido. *Rev. Inv. Clín.* 2005, 57:368-380.
31. Contreras J.L., Chan C., Vilatoba M., Anthon F.J., Podgaetz E. y Eckhoof D. Transplante hepático: Consideraciones generales. *Rev. Gastroenterol. Méx.* 2003, 68:7-18.
32. Filloy A., García O. and Lorente L. Chorioretinitis as the first sign of acquired toxoplasmosis transmitted from donor following kidney transplantation: case report and review of the literature. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2013, 21:34-5.
33. Laguna L., Capó de Paz V., Rodríguez M., Torres G., Salazar D., Limonta D. y López M.C. Utilización de la inmunohistoquímica en el diagnóstico anatomopatológico de la neurotoxoplasmosis en pacientes VIH/SIDA. Actas Hispanoamericanas de Patología 2006, 1-4. En <http://conganat.es/urjc.es> Patología Del SIDA.
34. Ferreira M. & Borges A. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002, 97: 443-457.
35. Alpert L., Miller M., Alpert E. Gastric toxoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome: antemortem diagnosis with histopathologic characterization. *Gastroenterol.* 1996, 110; 1:258-64.
36. Galván M., Troyo R., Roman S., Calvillo C. & Bernal R. A systemic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. *Parasit. Vect.* 2012, 5:1-12.
37. Hernández I., Acosta K., Ortega A., Guzmán E., Aguilar A. & Jiménez M. Toxoplasmosis in Mexico. Epidemiological situation in human and animals. *Rev Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2015, 57:93-103

12 Diagnóstico por métodos directos, inmunológicos y moleculares

GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz & SÁNCHEZ-OROZCO, Laura Verónica

Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Av. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México.

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

12 Resumen

El diagnóstico de toxoplasmosis es de gran importancia debido a los daños causados por este parásito en personas inmunodeprimidas o en mujeres embarazadas, el diagnóstico de toxoplasmosis activa representa un signo para iniciar un tratamiento farmacológico de inmediato. En este capítulo se aborda el arsenal de diagnóstico para la infección de *Toxoplasma*. Se desglosa en métodos directos en los cuales podemos demostrar la presencia del *Toxoplasma* en sus formas de taquizoítos ó quistes. Los métodos indirectos de detección de los anticuerpos IgM e IgG contra *Toxoplasma* que han sido las herramientas más utilizadas y han llevado a discriminar entre una infección primaria, aguda ó crónica.

Los métodos moleculares para la identificación de ADN-*Toxoplasma* a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). La prueba de fragmentos de restricción de reacción en cadena de polimerasa (PCR-RFLPs) para identificar cepas. Así como el método de fusión de alta resolución para determinar el genotipo de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras biológicas.

El diagnóstico de la toxoplasmosis representa un punto muy importante en la decisión de iniciar o no un tratamiento antiparasitario. Los métodos inmunológicos que detectan a los isotipos IgM e IgG contra *Toxoplasma* han sido las herramientas mas utilizadas y que han permitido discriminar entre una toxoplasmosis activa o aguda de una crónica. En personas inmunosuprimidas o en mujeres embarazadas, el diagnóstico de una toxoplasmosis activa representa una señal para iniciar de inmediato una tratamiento farmacológico.

Históricamente se han desarrollado diversas metodologías que incluyen desde el aislamiento del parásito en muestras biológicas y evaluación por xenodiagnóstico mediante la inoculación intraperitoneal de suero, o líquido cefalorraquídeo en ratones susceptibles evaluando la supervivencia y la detección de los taquizoítos en el líquido peritoneal, hasta la determinación de anticuerpos IgM e IgG séricos anti-*Toxoplasma* y recientemente la detección del DNA del organismo mediante técnicas de biología molecular como la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) que permite incluso detectar a un solo parásito en un volumen de muestra ensayada. A continuación, se señalan las diversas pruebas y estudios que permiten el diagnóstico de esta parasitosis.

12.1 Aislamiento del parásito ó bioensayo

El diagnóstico de la toxoplasmosis aguda puede hacerse mediante la inoculación de muestras sospechosas de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), material ganglionar y otros líquidos o tejidos corporales, en la cavidad peritoneal de ratones inmunosuprimidos ó susceptibles como la cepa BalB/c. La presencia de los taquizoítos en el líquido peritoneal de los ratones se detecta mediante microscopia de contraste de fases de 6 a 10 días después de la inoculación. Los parásitos se observan con su forma característica de media luna con membrana y citoplasma refringente y un núcleo redondo denso ubicado en el centro del parásito, en algunos casos presentando una motilidad en forma de serpentín o de movimientos rotatorios, aunque también los parásitos pueden solo presentar un movimiento vibratorio tipo browniano. Se recomienda realizar un frotis del exudado peritoneal del ratón, la muestra se fija con metanol y se tiñe con colorante de Wright, Giemsa o May-Grunwald, y se observa al microscopio. Los parásitos se presentan una membrana a veces granulosa, un citoplasma teñido de azul y el núcleo de rojo centrado en el citoplasma. También pueden hacerse frotis de líquidos corporales. Si no se encuentran toxoplasmas en el líquido peritoneal del ratón, pueden determinarse los títulos séricos de anticuerpos anti-*Toxoplasma* a las 4 y 6 semanas post- inoculación.

El aislamiento de *T. gondii* a partir de líquidos corporales del paciente representa una infección aguda. La sensibilidad de este método en el diagnóstico de toxoplasmosis aguda se ha considerado de casi del 90%, sin embargo la detección de los parásitos en las muestras biológicas es de muy baja frecuencia ya que en general los parásitos están ubicados a nivel intracelular.

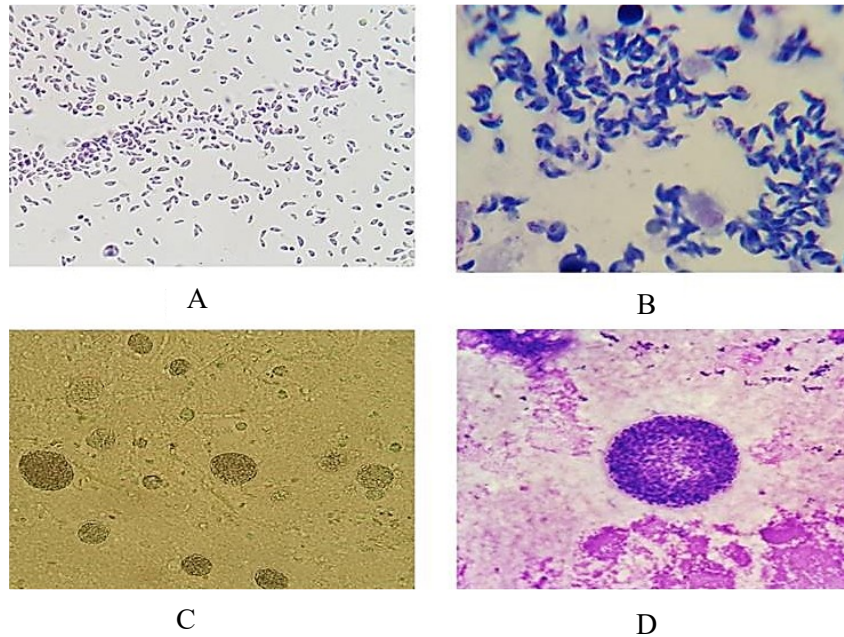


Figura 29 A) Taquizoítos a partir de exudado peritoneal de ratón, tinción Diff-Quick, objetivo 10X.T2. B) Taquizoítos a partir de exudado peritoneal de ratón, tinción Azul de metileno alcalino (Sabin-Feldman), objetivo 100X.C) Múltiples quistes tisulares en encéfalo de ratón, sin tinción, objetivo 20 X. D) Quiste tisular en encéfalo de ratón, tinción Diff-Quick, objetivo 40 X. E). Cortesía del M. en Cs. Gustavo Salas Lais. Estudiante del doctorado en ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular, ENCB-IPN.Mexico. The Laboratory Diagnosis in Toxoplasma Infection, Toxoplasmosis, Dr. Isin Akyar (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/67999. Available from: <https://www.intechopen>.

En el caso de recién nacidos con toxoplasmosis, la inoculación de ratones con la sangre del niño en la primera semana de nacimiento, alcanza un 75% de resultados positivos; sin embargo, al mes solo un 52%. Una desventaja de este método es que se requiere de personal especializado en el manejo de *T. gondii*, por el riesgo de contaminación, además de que es necesario esperar de cierto tiempo para obtener el resultado¹⁻⁵.

12.2 Cultivo celular

Los cultivos celulares cada día son más utilizados para el diagnóstico y aislamiento de parásitos *in vitro*^{5,6}, el parásito ha sido aislado de fluidos pulmonares^{5,6} así como de fluido cerebrospinal en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)⁷⁻¹². El diagnóstico mediante cultivos también se ha utilizado en casos de toxoplasmosis ocular^{13, 14}. Otros usos del cultivo celular son para el estudio de la interacción hospedero-parásito, para la búsqueda de factores implicados en la resistencia innata, para la caracterización molecular y genética de los diferentes aislados¹⁵, para la búsqueda de moléculas candidato para vacuna y para determinar la eficacia de fármacos antiparasitarios¹⁶.

Es necesario tener las condiciones de infraestructura para este procedimiento, como sería campanas de bioseguridad clase II, incubadoras de 37°C con suministro de CO₂, así como líneas celulares susceptibles para ser invadidas y permitan la proliferación de los parásitos como las células Vero de mono verde de África, fibroblastos humanos (HFF) entre otras. El procedimiento consiste en crecer las células hospederas en medios de cultivo complementados con suero fetal bovino a fin de aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento y en condiciones de 37°C y con atmósfera de 5% de CO₂.

Cuando las células alcanzan una confluencia del 80% (es decir que el 80% del área de la caja de cultivo esté cubierta con células), se adicionan los líquidos corporales bajo estudio y se mantienen en cultivo por 5 a 8 días.

Dependiendo de la cantidad de parásitos presentes en la biopsia o líquido corporal del paciente será la destrucción de la monocapa celular y la cantidad de taquizoítos recuperados en el sobrenadante. En el diagnóstico de líquidos intraoculares (humor acuoso y vítreo), la correlación con el diagnóstico de coriorretinitis y ELISA es del 67% y con cultivo celular es del 91%.

12.3 Histología

La detección de taquizoítos en cortes histológicos de biopsias sospechosas es indicativo de que una infección activa está presente, en contraste, la detección de quistes tisulares que contengan bradizoítos en muestras histológicas confirma solo una infección en estado crónico de toxoplasmosis. La presencia de quistes en la placenta, en fetos ó en recién nacidos es indicativa de una infección congénita, de acuerdo al número de quistes en los cortes histológicos se puede sugerir el caso de una infección activa e inicio inmediato del tratamiento farmacológico.

En material de biopsia ó autopsia, los taquizoítos y bradizoítos enquistados son usualmente demostrables con la tinción de Wright, Hematoxilina & Eosina, Figura 30 A y B. En donde los bradizoítos contienen un vacuolas de glucógeno, el tamaño del quiste es importante como puede observarse en cortes histológicos de cerebro. Existen otras técnicas de tinción como la de Schiff-ácido peryódico, inmunofluorescencia específica y tinción con inmunoperoxidasa que son igualmente eficientes.

Los procedimientos anteriores tienen un gran valor diagnóstico, pero son limitados debido a la dificultad que entraña tanto el crecimiento de parásitos *in vivo* como la identificación de taquizoítos por métodos histoquímicos^{3,5,8}

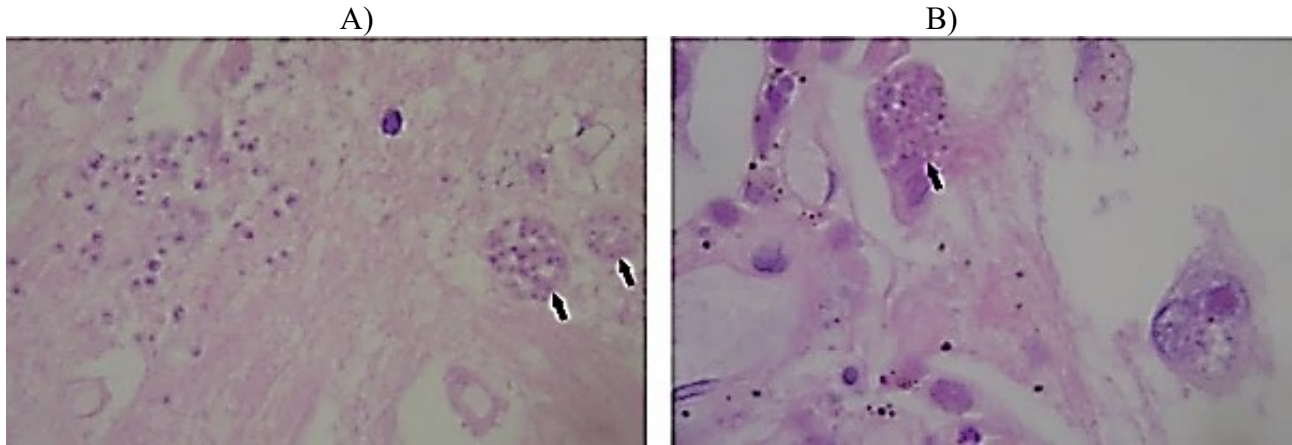


Figura 30 A) Fotomicrografía de corte de cerebro (1000x) que muestra dos quistes, adyacentes múltiples taquizoítos liberados entre la sustancia blanca adyacente sin respuesta inflamatoria evidente. B) Fotomicrografía (1000x) de pared alveolar que muestra células del epitelio con quistes de *Toxoplasma* así como una inclusión citomegálica en el núcleo de una de las dos células epiteliales, un macrófago alveolar en la parte superior de este caso de infección con VIH-SIDA. Ambas con tinción de Hematoxilina & Eosina. Donada por Dr. Ramón Franco Topete Médico Patólogo, Departamento de Microbiología y Patología del CUCS, Jefe del Departamento de Patología del Nuevo Hospital Civil de Guadalajara.

12.4 Inmunodiagnóstico

El primer intento para realizar el diagnóstico serológico para toxoplasmosis se llevó a cabo en 1937 por Sabin y Olitzky con una prueba que se conoció con el nombre de neutralización en la piel de conejo, la cual posteriormente fue abandonada¹, ese mismo año Nicolau y Ravello¹⁷ describieron una prueba de fijación de complemento aplicable al diagnóstico de esta parasitosis, como el antígeno era prácticamente anti-complemento fue remplazada ventajosamente por la descrita por Warren y Russ¹⁸. En 1948 Sabin y Feldman idearon una reacción basada en la coloración de los toxoplasmas puestos en presencia de anticuerpos específicos¹⁹. En el siguiente año MacDonald en 1949 desarrollaron la técnica denominada como “Pock Counting”, que tiene como base la reducción del número de colonias de toxoplasmas observables en la membrana coriolantoidea del embrión de pollo, por acción de los anticuerpos²⁰.

El método de hemaglutinación indirecta fue concebido por Jacobs y Lunde en 1957, técnica que alcanzó gran difusión y que consistió en la inhibición de la aglutinación de eritrocitos de carnero en presencia de anticuerpos antitoxoplásmicos²¹.

O'Connor en 1957 propuso un procedimiento de precipitación en gelosa, método que si bien no cumplió con las expectativas, dio las bases para investigar presencia de anticuerpos antitoxoplásmicos en el humor acuoso²²; con ciertas variantes, este método fue empleado para este fin por Desmonts en Paris. Fulton y Turk publicaron en 1959 su prueba de seroaglutinación en tubo, muy sencilla pero con fuentes de error²³, basándose en el consumo de oxígeno por una suspensión de toxoplasmas vivos, en 1960 describieron una reacción de floculación sobre lámina que fue modificada y perfeccionada por Engelbrecht²⁴ y en 1964 Garin y Despeiges publicaron una reacción basada en la aglutinación de partículas de bentonita sensibilizadas con antígeno toxoplásmico²⁵ y posteriormente se sentaron las bases para el uso de anticuerpos fluorescentes, hoy en día tan aplicados en el diagnóstico inmunológico.

12.5 Diagnóstico de rutina

A continuación, se mencionan las pruebas que han tenido mayor aplicación en el diagnóstico serológico y que se han convertido en métodos de rutina en el laboratorio clínico. Actualmente se dispone en el mercado de una amplia variedad de pruebas serológicas que pueden usarse para medir anticuerpos frente a *T. gondii*. La prueba de tinción de Sabin-Feldman¹⁹, Fijación de complemento (FC) prácticamente ha caído en desuso²⁶. El método de hemaglutinación indirecta (HIA)²⁷⁻²⁸, la prueba de los anticuerpos fluorescentes indirectos²⁹ (IFI), y el inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)³⁰⁻³³ todas ellas, miden de forma satisfactoria la presencia de anticuerpos circulantes del isotipo IgG contra *T. gondii*. Pueden detectarse titulaciones positivas de IgG mayores a diluciones tan solo en 2 a 3 semanas después de la infección y se suele alcanzar su máximo a las 6 a 8 semanas, declinando lentamente hasta una nueva línea basal, la cual generalmente permanece de por vida. Es necesario obtener una titulación sérica de IgM a la vez que la titulación de IgG para establecer si la infección se encuentra en un estado activo agudo o en uno crónico³³. Los métodos de que se dispone actualmente para esta determinación son, ELISA para IgM de doble anticuerpo y el ensayo inmunoabsorbente de IgM (IgM-ISAGA). Estos ensayos son específicos, sensibles y evitan los resultados falsos positivos asociados al factor reumatoide y los anticuerpos antinucleares. La IgA-ELISA es más sensible que la IgM-ELISA en la detección de la infección congénita en el feto y el recién nacido.

En el paciente que presenta sólo linfadenopatía, la titulación positiva de IgM es una indicación de infección aguda. La titulación sérica debe valorarse de nuevo a las 3 semanas. La elevación de IgG sin aumento de la IgM sugiere que existe una infección crónica (latente). Si existe un aumento de la IgG o de la IgM deben valorarse de nuevo titulaciones a las 3 ó 4 semanas y se debe de sospechar en una toxoplasmosis activa que implicaría el inicio inmediato del tratamiento antiparasitario.

12.6 Prueba de Sabin y Feldman

La reacción de Sabin y Feldman se considera como un ensayo fundamental o clásico. También conocida como la "prueba del colorante", está basada en exponer a una suspensión de taquizoítos vivos al suero del paciente y posteriormente al colorante azul de metileno. Cuando hay anticuerpos anti-*Toxoplasma* en dicho suero, por efecto de los factores del complemento, se lisan los parásitos perdiendo su propiedad de captar al colorante permaneciendo como estructuras incoloras bajo el microscopio (resultado positivo a toxoplasmosis). Cuando no hay anticuerpos anti-*Toxoplasma* en el suero ensayado, los parásitos permanecen vivos con una membrana celular intacta y por lo tanto captan al colorante tiñéndose de color azul (Resultado negativo a toxoplasmosis).

De todas las reacciones, la prueba de Sabin y Feldman es considerada como la de mayor valor diagnóstico y de especial interés por haber introducido en las técnicas de laboratorio un nuevo fenómeno serológico; es además la primera vez en la serología humana que se usa la properdina (Globulina y presente en el suero humano) en una reacción antígeno anticuerpo. La principal desventaja de esta prueba es que se utilizan parásitos vivos, lo cual es un inconveniente por el riesgo de contaminación o accidentes de laboratorio y requiere de una infraestructura muy especializada para el mantenimiento de los parásitos, por lo que solo se realiza en centros de referencia y laboratorios de investigación.

Interpretación de los resultados. Parásitos teñidos de azul (negativo) y más del 50% de parásitos no teñidos (positiva), hasta la dilución a la que se presente esta reacción¹⁹.

12.7 Reacción de fijación de complemento

Este método consiste en una reacción *in vitro* del antígeno (taquizoítos de *T. gondii*) y de anticuerpos (presentes en el suero problema), en presencia de complemento de cobayo. En presencia de anticuerpos positivos anti-*Toxoplasma*, los componentes del complemento participarán y experimentarán fijación. Esta reacción se visualiza con un sistema indicador que consiste en eritrocitos más anticuerpos (amboceptor hemolisina) específicos para los hematíes. Si todo el complemento se consumió en la reacción antígeno-anticuerpo los eritrocitos no experimentarán lisis. Por otra parte, en caso de no haber anticuerpos específicos en el suero problema no ocurrirá unión antígeno-anticuerpo en la reacción, y el complemento no experimentará fijación ni será utilizado, quedando en libertad para lisar los eritrocitos (Figura 29, E)¹⁸. En la actualidad esta prueba ha caído prácticamente en desuso.

Interpretación de la prueba: Si hay hemólisis se considera negativa, y si no existe hemólisis se considera positiva, llevándose la lectura a la máxima dilución.

12.8 Hemoaglutinación

La prueba de hemoaglutinación fue descrita por primera vez por Jacobs L, en 1957. El fundamento de esta prueba se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-*T. gondii* de producir aglutinación en presencia de eritrocitos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito. Esta prueba es útil, presenta una alta sensibilidad pero no parece tener ventajas sobre inmunofluorescencia, pudiendo interferir en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita, ya que los anticuerpos detectados son IgG.

Las ventajas que ofrece son rapidez y alta sensibilidad, óptima para ser usada en asociación con fijación de complemento e inmunofluorescencia indirecta²⁸.

Interpretación de la prueba: Si existe aglutinación la prueba es positiva, y si hay inhibición a la aglutinación la prueba es negativa. Llevándose su lectura a la más alta dilución. Posteriormente Yamamoto en 1991, estandarizó una prueba para la determinación de anticuerpos IgM, con una sensibilidad de 98% y especificidad de 95%²⁹.

12.9 Prueba de aglutinación modificada (MAT)

Para esta prueba, se fijan los taquizoítos con formaldehído en placas de microtitulación en forma de U a los cuales se adiciona el suero diluido.

En muestras de suero positivas, se produce una capa delgada de aglutinación, mientras que en las muestras negativas se produce un sedimento compacto de precipitados de taquizoítos en el fondo del pozo²⁶. Esta prueba fue descrita primero por Fulton y Turk²³ con una baja especificidad y sensibilidad, debido a la unión de IgM normal a la superficie del parásito, y mejorado por la preparación del antígeno usando un amortiguador con 2-mercaptoetanol el cual elimina las IgM no específicas. Esta prueba detecta los anticuerpos IgG, sin limitación de la especie del hospedero, pero los resultados falsos negativos pueden ocurrir durante las primeras etapas de la infección aguda²⁷.

La especificidad y la sensibilidad de MAT son comparables a la prueba de Sabin y Feldman, en la mayoría de las especies. Además, MAT también se puede utilizar en fluidos corporales, siendo muy útil en trabajo de campo.

12.10 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Esta prueba consiste en la fijación de los taquizoítos en portaobjetos los cuales se ponen en contacto con el suero de pacientes y con anticuerpos conjugados a moléculas fluorescentes. La reacción antígeno-anticuerpo se evidencia por microscopia de fluorescencia. En los casos positivos se ve una fluorescencia amarillo verdoso brillante y un color rojo sin fluorescencia en los negativos. El color de a fluorescencia dependerá del fluorocromo que esté conjugado a los anticuerpos.

La inmunofluorescencia es una prueba que muestra alta precisión cuando se adapta para anticuerpos específicos. Se sabe que el ser humano al infectarse responde primero con la producción de IgM, misma que desaparece posteriormente. La detección de IgM específica en el recién nacido diferencia los anticuerpos transmitidos de la madre al producto (IgG atraviesa barrera placentaria y los IgM son incapaces de hacerlo). Puede decirse que la detección de IgG específica contribuye al diagnóstico la mayoría de las veces; sin embargo, pueden persistir títulos considerables de anticuerpos durante meses y algunos años. Pueden existir resultados falsos negativos en presencia de toxoplasmosis congénita, en pacientes inmunosuprimidos ó en casos de toxoplasmosis de forma ocular. Además suelen darse falsos positivos por presencia de factor reumatoide y anticuerpos antinucleares, ya que estos causan fluorescencia no específica en la detección de IgM, por lo que es recomendable hacer estas dos determinaciones antes de pasar a la inmunofluorescencia²⁵. Interpretación de la prueba: Si los toxoplasmas presentan fluorescencia amarillo verdoso brillante es indicativo que la prueba es positiva y si presentan un color rojo, indican que son negativos²⁵.

12.11 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

El ensayo inmuno enzimático (ELISA) descrito inicialmente en 1971 por Engvall y Perlman, utiliza anticuerpos conjugados a una enzima²⁷. El anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de una reacción de óxido-reducción, en la cual el sustrato se precipita en un producto colorido. En este sistema, el antígeno o el anticuerpo se absorben a una fase sólida insoluble (microplacas de poliestireno).

Existen diversas variantes de ELISA: Directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos a excepción del método indirecto con el que sólo se detectan anticuerpos. En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima, en cambio, en los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual reaccionó previamente con el antígeno.

En los ensayos de captura, el conjugado enzima anticuerpo se une al antígeno previamente fijado a un primer anticuerpo absorbido en la fase sólida. Se agrega el sustrato de la enzima y se mide la intensidad del color desarrollado, la cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.

Las enzimas más empleadas son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG), debido a su estabilidad y reproducibilidad de resultados. Los sustratos para la enzima HPR son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos hacen que ciertos cromógenos se oxiden en la reacción enzimática desarrollando un producto colorido. La orto-fenildiamina, continúa soluble después de ser oxidada y es la más utilizada. Los sustratos para la FA son el p-nitrofenil fosfato, que produce color al ser degradado por la enzima a temperaturas mayores de 30°C, el 5 bromo-4cloro-3-indoilsfosfato se puede emplear en los ELISA en tubo o en dot-ELISA.

Una ventaja importante de este método es su alta sensibilidad frente a las pruebas de colorante de Sabin y Feldman e IgM-IFI, ya que en estudios serológicos que se han realizado en los cuales ambas pruebas resultaron negativas, por la técnica de ELISA el 92.8% de dichos sueros fueron positivos, ya que están diseñadas para detectar bajas concentraciones de antígenos de *Toxoplasma gondii*. Esta prueba suele dar al igual que IgM-IFI resultados falsos positivos en presencia de factor reumatoide y también en algunos casos de infección crónica. Es una prueba rápida y sencilla para detectar antígenos circulantes o bien anticuerpos anti-*Toxoplasma* clase IgG o IgM en suero, que nos permite distinguir una infección reciente de una pasada.

El método de ELISA detecta del 70 al 80% de casos de niños infectados congénitamente, un aumento de la titulación de IgM que se extienda más allá de la primera semana es indicativo de infección aguda, ya que el promedio de duración de la IgM materna es de 3 a 5 días. Además, se puede determinar anticuerpos en suero y humor acuoso. En la actualidad es la prueba más empleada para determinar IgG e IgM contra *T. gondii*, siendo utilizada con éxito en el serodiagnóstico de una variedad de infecciones.

Interpretación de la prueba: Si el ELISA es cualitativo únicamente se observa desarrollo de color en la seropositividad. Si la prueba es cuantitativa, se mide la intensidad del color desarrollado a una determinada longitud de onda (nanómetros) y la lectura de absorbancia es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo, cada casa comercial marca su valor de corte así como si el método es cuantitativo ó cualitativo. Para el método de ELISA en el laboratorio, hay que estandarizar la técnica y compararla con otras previamente probadas antes de ser utilizada en el diagnóstico³¹.

A finales del siglo XIX varios antígenos recombinantes, de diferentes sitios del parásito fueron analizados^{32,33}; Los antígenos de gránulos densos GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7 y GRA8, de proteínas de roptra ROP1 y ROP2, la proteína de la matriz MAG1, de proteínas de micronemos MIC2, MIC3, MIC4 y MIC5 y los antígenos de superficie SAG1 y SAG226, se evaluaron como marcadores de diagnóstico en seres humanos o animales mediante ELISA para detectar anticuerpos específicos IgG e IgM^{32,33}. Las combinaciones de antígenos recombinantes han mostrado más sensibilidad y especificidad que el uso de un solo antígeno. Por ejemplo, las combinaciones de SAG2A, GRA2, GRA4, ROP2, GRA8 y GRA7 son potencialmente útiles para detectar anticuerpos IgG en los seres humanos con la infección recientemente adquirida³²⁻³⁶, ROP1, SAG1, GRA7, GRA8 y GRA6 son prometedores para detectar anticuerpos específicos IgM³⁷ mientras que GRA7 y GRA8 se utilizan para detectar anticuerpos IgA específicos³²⁻³⁷. En un estudio se identificó una proteína específica de esporozoítos relacionada con la embriogénesis-(TgERP), que puede reaccionar con anticuerpos específicos de ooquistes, y ser usado para detectar una infección temprana por esporozoítos implicando a los ooquistes como fuente de infección³⁸.

12.12 Prueba de avidéz

La prueba de avidéz de IgG, fue descrita por Hedman et al.³⁹ Esta prueba mide la avidéz del anticuerpos específicos para unirse al antígeno de *T. gondii*. Para desnaturalizar los agentes protéicos presentes en el suero, éste se trata previamente con una solución de urea. La avidéz puede ser variable durante el curso de la infección⁴⁰. En la etapa temprana de la infección, los valores de avidéz son bajos, y aumentan con la duración de la infección⁴¹. Por lo tanto, la prueba de avidéz puede distinguir la infección aguda de la crónica. La prueba es aplicable por diferentes procedimientos serológicos, tales como ELISA y WB^{42, 43}. Sin embargo, hay limitaciones de la prueba IgG en las mujeres embarazadas, ya que éstos anticuerpos pueden persistir durante meses^{44, 45}, y el tratamiento de *T. gondii* puede alterar los resultados⁴⁶⁻⁵⁵. La interpretación de los diferentes métodos diagnósticos presentados en este capítulo, pueden ser observados en la Tabla 2.

Tabla 2 Interpretación de los métodos diagnósticos para *toxoplasmosis* humana.

| MÉTODO | REPORTE | UNIDADES | INTERPRETACIÓN |
|---|--|-----------------------------|---|
| DIRECTO y BIOPSIA | Observación de parásitos | número/campo | Infección Aguda |
| BIOENSAYO con diferentes fluidos corporales | Aislamiento de parásitos 7 ó > días de inoculación. | número/campo | Infección Aguda |
| CULTIVO CELULAR Para fluidos corporales | Crecimiento de parásitos | | Infección Aguda |
| HISTOLOGÍA | Hallazgo de taquizoítos | número/campo | Infección reciente |
| | Hallazgo de quistes | número/campo | Infección crónica |
| SABIN Y FELDMAN | Observación de parásitos no coloreados | Dilución con valor de corte | Dilución mayor a 1:256, infección reciente |
| HEMOAGLUTINACIÓN | Positiva en altas diluciones | Dilución con valor de corte | Infección reciente |
| INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA | Positiva 1:64 IgG ó IgM Positiva > 1:256 | Dilución con valor de corte | Infección pasada Infección reciente. |
| ELISA | Positiva IgG bajos títulos Positiva IgM | µgr/ml ó UI/ml | Infección pasada Infección reciente |
| AVIDÉZ DE IgG | Baja avidéz y Alta avidéz (según reporte de casa comercial) | Densidad óptica | Infección reciente Infección pasada |
| WESTERN BLOT | 2 ó más bandas reveladas con Acs IgG 2 ó más bandas reveladas con Acs IgM | Número bandas KDa | Infección pasada Infección reciente |
| INMUNOCITOQUÍMICA INMUNOHISTOQUÍMICA | Presencia de taquizoítos | | Infección reciente |
| | Presencia de quistes | | Infección pasada |
| PCR | Presencia de ADN | ADN | Infección reciente |
| PCR TIEMPO REAL Fluidos corporales | Aumento de copias de ADN Disminución de copias de ADN | ADN | Intensidad de infección Disminución/ tratamiento |
| PCR-RFLP, MS, HRM con diferentes fluidos corporales | Aislamiento del parásito y genotipificación de cepas I, II ó III | ADN | Cepa I Mayormente patógena |

12.13 Western blot

El Western blot es una técnica inmunoenzimática, basada en la unión de anticuerpos específicos presentes en el suero de los pacientes al estar en contacto antígenos de *Toxoplasma* fijados en papel de nitrocelulosa. Primeramente, los antígenos protéicos deben ser separados mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), posteriormente deben ser transferidos e inmovilizados en una fase sólida (membrana de nitrocelulosa). Se debe bloquear ó saturar el papel de nitrocelulosa con alguna proteína no antigénica (albúmina sérica bovina) para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos que se emplean. A la reacción antígeno-anticuerpo que corresponde a la primer etapa de la reacción, se le agrega un segundo anticuerpo unido a una enzima como peroxidada de rábano ó fosfatasa alcalina, siendo visible la reacción mediante un sustrato y un cromógeno que participe *in situ*, mismo que revelará bandas (proteínas antigénicas de *T. gondii*) en la membrana de nitrocelulosa que reconocieron los anticuerpos específicos⁵⁶.

El diagnóstico serológico en pacientes con SIDA, no siempre corresponde a la titulación de anticuerpos en suero y líquido cefalorraquídeo, por lo que la técnica de Western blot ha sido utilizado para caracterizar antígenos y el reconocimiento de éstos por los anticuerpos IgG, IgM e IgA en suero y fluido cerebral de pacientes con toxoplasmosis crónica y aguda⁵⁶⁻⁵⁸, éste método también se ha utilizado en pacientes inmunocompetentes en la búsqueda de proteínas del parásito que puedan ser utilizadas como marcadores de diagnóstico de infección aguda ó crónica, indicando si las proteínas reconocidas por los anticuerpos del suero de pacientes en diferentes fases de infección, son específicas del *Toxoplasma*⁵⁹⁻⁶¹. Otras aplicaciones recientes para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita en sueros y calostros de mujeres que habían dado a luz, en estos ensayos se encontraron correlación significativa entre los anticuerpos IgG e IgA de calostro y suero, además se observó que los anticuerpos IgA reconocen un mayor número de antígenos en calostro que en suero⁶². Este método también ha sido utilizado con otros líquidos corporales como la saliva⁶³.

12.14 Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

La inmunocitoquímica se basa en la localización de moléculas (antígenos de *Toxoplasma* en células en cultivo mediante anticuerpos específicos marcados, además de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa ó fosfatasa (Figura 31). La inmunohistoquímica tiene el mismo fundamento de la inmunocitoquímica la diferencia es que esta se realiza en tejidos. Se han realizado estudios para examen neuropatológico del tejido cerebral en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana VIH/SIDA, para valorar lesiones del tejido cerebral multifocal difundido y difuso⁶⁴. Mediante inmunohistoquímica también se han realizado estudios en diferentes tejidos para la demostración de *Toxoplasma gondii*, como es en toxoplasmosis ocular⁶⁵⁻⁶⁷.

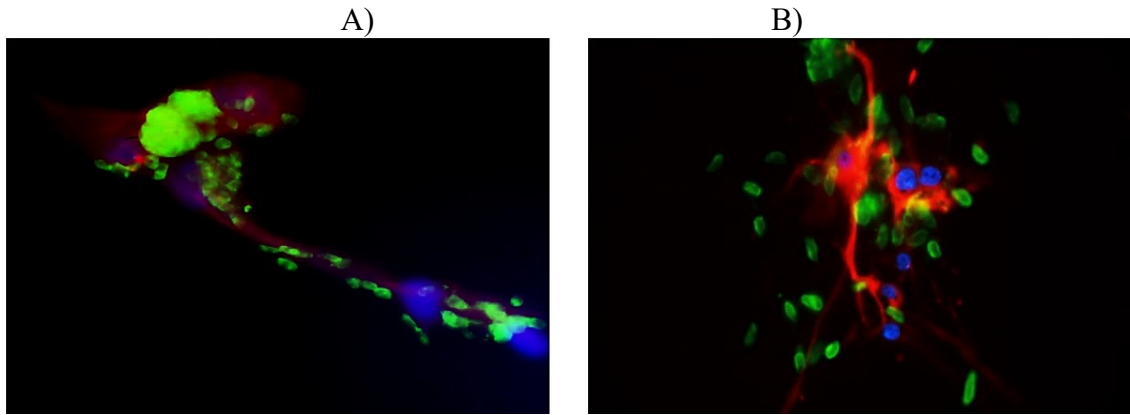


Figura 31 A) Inmunocitoquímica de Neuronas (color rojo) infectadas con Taquizoítos de *Toxoplasma* (Color verde), B) Astrocitos infectados (Color Rojo) con taquizoítos, núcleos marcados con Dapi (Color Azul). Tomado con objetivo de 40 X.

12.15 Técnicas moleculares

12.16 Generalidades del genoma del *Toxoplasma gondii*

La biología molecular ha permitido el avance en el conocimiento molecular de *T. gondii*. Su genoma contiene una longitud total de aproximadamente 65 megabases (MB), distribuido en 14 cromosomas que van de los 1.9 a 7.4 MB. Su contenido de GC es del 52.3% y codifica para aproximadamente 7,988 proteínas y contiene 296 genes no codificantes pequeños (Ensembl Protists: *T. gondii*:^{68,69}).

La secuencia del genoma completo de las cepas GT1, ME49 y VEG lo clasifica en tres tipos, I, II y III respectivamente. A la fecha, el análisis mediante polimorfismos de longitud variable generados por enzimas de restricción (RFLPs) utilizando más de 900 cepas del parásito, permiten su clasificación en 140 genotipos agrupados en 12 grupos principales. Resultados similares se obtuvieron mediante la secuenciación de intrones de un número más pequeño de muestras y también utilizando marcadores de microsatélites. A pesar de estos avances, se requiere de secuenciar más genomas completos para una mayor precisión en la clasificación de los linajes (información obtenida de la página de J. Craig Venter Institute)⁷⁰.

12.17 Diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en efectuar una replicación repetitiva *in vitro* de una secuencia específica de ADN. Al amplificar o copiar varias veces un fragmento de ADN, aumenta en forma proporcional la sensibilidad de la misma. El producto amplificado se analiza en un gel de agarosa o poliacrilamida con tinciones especiales. Esta técnica es útil en la detección del parásito en muestras de suero, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), orina, placenta, líquido amniótico, cerebroespinal y cefalorraquídeo⁷¹⁻⁷⁷. La sensibilidad y especificidad del PCR depende de la técnica que se utiliza en la extracción del ADN, los iniciadores que se utilizan en el PCR y los parámetros de la reacción de amplificación^{73,75,78,79}. Los genes de *Toxoplasma* más conservados por lo tanto que se utilizan en la detección del ADN de este parásito son primeramente el Gen B1 del cual existen 35 copias en el genoma del parásito, seguido por la región repetitiva REP de 529 pares de bases (pb), la cual tiene alrededor de 300 copias en el genoma.

Otras secuencias de copia única que se utilizan en laboratorios de investigación principalmente para genotipificar, son las correspondientes a los genes SAG1, SAG2, SAG3, SAG4 y GRA4⁷⁸. Este método diagnóstico es muy valioso en infecciones agudas, cuando el parásito cruza la placenta e infecta al feto o en infecciones en pacientes con SIDA⁷¹⁻⁷⁹ y otras inmunosupresiones en donde se presente una reactivación del parásito⁷⁶. Desafortunadamente, es difícil tener un valor de confiabilidad en los ensayos de PCR. Para un diagnóstico pre-natal la sensibilidad reportada va del 64% al 97.4% con un valor predictivo negativo del 87.7% al 99.7% respectivamente; en el caso de pacientes con VIH con toxoplasmosis la sensibilidad reportada va desde el 13% al 87.5%^{78,80}. Con la detección de la secuencia REP 529 pb se ha reportado una sensibilidad hasta del 100% en fluido amniótico⁷³.

La secuencia REP 529 pb, está teniendo un mayor auge para utilizarla en el diagnóstico de *T. gondii* mediante PCR por demostrar mayor sensibilidad^{74,76}, posiblemente el alto número de repeticiones en la secuencia del parásito aumenta las posibilidades de detección. Las variaciones en los resultados son debidas a que no todos los pacientes tienen el mismo tiempo de infección, además del tipo de muestra clínica, las condiciones de almacenamiento que afectan la sensibilidad.

Además, actualmente no hay un consenso para los iniciadores que se deben de utilizar en la PCR, una de las regiones más conservada es el gen B1, aun así existen algunos polimorfismos y las cepas de *Toxoplasma* en muestras clínicas no son del mismo genotipo, factores que pueden afectar en la detección del parásito. Se requiere un mayor número de estudios que comparen al gen B1 y la secuencia REP529 pb para llegar a un consenso con la selección de iniciadores. Un factor más que puede afectar los resultados obtenidos es la variabilidad reportada en las técnicas de extracción de ADN.

En pacientes con SIDA, el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral se basa en la presencia de manifestaciones clínicas de síndrome de hipertensión intracraneal, una cuenta de linfocitos T CD4+ menor a 200/ml, la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en suero y líquido cerebroespinal, lesiones granulomatosas obtenidas por estudios de neuro-imagen y una respuesta positiva al tratamiento.

En estos pacientes la detección de *T. gondii* mediante PCR en líquido cerebroespinal ha mostrado diferentes sensibilidades, llegando a una sensibilidad del 87% cuando la muestra se toma lo más pronto posible de preferencia durante los tres primeros días y a un máximo de siete días después de comenzar el tratamiento específico⁷³.

Una gran ventaja de la técnica del PCR, es que permite descartar otro tipo de patologías que presentan la misma sintomatología tales como linfoma primario en líquido cefalorraquídeo, neuro-tuberculosis o reactivación por enfermedad de Chagas.

La PCR puede ser en el futuro, indudablemente una herramienta exitosa de diagnóstico en la toxoplasmosis, cuando exista una correlación satisfactoria entre el cuadro clínico del paciente y la presencia de ADN de *T. gondii*, aspectos que aún deben ser más estudiados y estandarizados. Además, que en los países en vías de desarrollo y aún en muchos desarrollados no se ha implementado para el uso diario del diagnóstico debido a su elevado costo.

12.18 PCR en tiempo real

A diferencia del PCR convencional, el PCR en tiempo real, mediante el uso de sondas o colorantes intercalantes mide el producto de amplificación en cada ciclo y puede ser cuantificado con el uso de estándares de concentración conocida. El PCR en tiempo real ha sido utilizado con éxito para detectar el ADN de *T. gondii* en sangre humana, fluido cerebroespinal, humor acuoso, líquido amniótico, y otras muestras^{74,76,80,81,82}. Además se utiliza para evaluar la progresión de la toxoplasmosis y la eficacia del tratamiento, ya que puede estimar la intensidad de la infección por *T. gondii*^{72,83}. El ensayo de PCR en tiempo real con la región de fragmentos de 529pb es considerada como la técnica de mejor rendimiento para el diagnóstico de toxoplasmosis en comparación con la detección del gen B1⁸³.

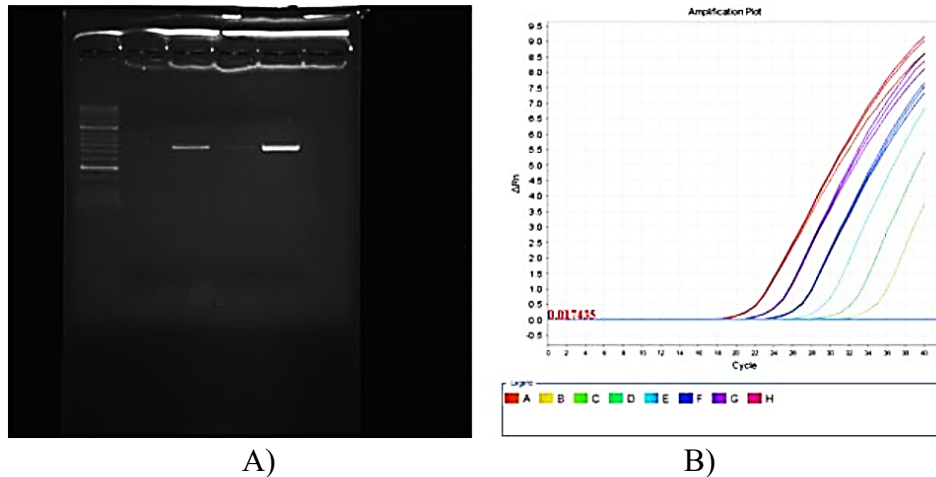


Figura 32 Se observa en A) Reacción en cadena de la polimerasa convencional, DNA de *Toxoplasma gondii* ampliando el elemento RE, carriles 3 y 5 y en 1 Control. B) Gráfica de plot ampliado de diferentes ciclos de copias de DNA, con un Δ_{rN} 0,01743 que significa que la muestra es positiva.

12.19 Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

LAMP es una técnica de amplificación de ADN bajo condiciones isotérmicas, que combina rapidez, eficiencia y una alta especificidad. La amplificación del ADN procede de la repetición de dos reacciones de elongación en una estructura que tiene forma de bucle. Utiliza una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra y dos iniciadores internos y dos externos. Los iniciadores internos contienen secuencias de las cadenas sentido y anti sentido del molde de ADN e inician la reacción LAMP.

Los iniciadores externos hibridan a unas cuantas bases de los internos e inician la síntesis de ADN con desplazamiento de hebra, formando una estructura en forma de bucle, que inicia una síntesis de ADN por auto reconocimiento. Se pueden producir hasta 10 copias del ADN molde en menos de una hora⁸⁴. Los productos finales son ADN con múltiples bucles formados por alineación entre las secuencias repetidas invertidas alternas presentes en la misma cadena⁸⁵. Solo requiere de un baño de agua o un termoblock para realizar la amplificación del ADN y los amplicones se pueden analizar en un equipo de PCR en tiempo real o mediante electroforesis⁸⁶. Este método es ligeramente más sensible que la PCR convencional, pero ligeramente inferior a la PCR en tiempo real⁸⁷.

El ensayo de LAMP ha sido evaluado mediante la detección de regiones de los genes REP529pb, SAG1, SAG2 y B1 de *T. gondii* a partir de muestras de sangre periférica humana⁸⁷⁻⁸⁸. La sensibilidad reportada fue de 0.1 taquizoíta y no se encontró reactividad cruzada con otros parásitos. La detección de SAG2 mostró mayor sensibilidad (87.5%), seguida de SAG-1 (80%) y B1 (80%). En todos la especificidad fue del 100%⁸⁷. Sin embargo, como todas las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, su alta sensibilidad requieren de un riguroso control de calidad para descartar falsos positivos.

12.20 Reacción en cadena de la polimerasa – fragmentos polimórficos de longitud variable generados por enzimas de restricción (PCR-RFLPs)

La PCR-RFLP se basa en la capacidad de las endonucleasas de restricción que reconocen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que al digerir los productos de PCR generan fragmentos polimórficos de longitud variable que se visualizan como patrones de bandas de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida⁸⁹. En 1995 Howe y Sibley identificaron tres linajes predominantes (los tipos I, II y III) a partir de 106 cepas de *T. gondii* aisladas de seres humanos y animales por medio de PCR-RFLP utilizando 6 marcadores⁸⁷.

Desde entonces en diferentes laboratorios, se han seleccionado varios conjuntos diferentes de multilocus marcadores, para caracterizar a *T. gondii* en aislamientos de individuos mediante PCR-RFLP⁹⁰. Actualmente para la clasificación de genotipo de *T. gondii* se desarrolló un PCR nested multiplex (Mn-PCR-RFLPs) que utiliza 10 marcadores genéticos, incluyendo los genes SAG1, SAG2, SAG3, Btub, GRA6, C22-8, c29-2, L358, PK1 Y apico⁹¹. El Mn-PCR-RFLP se ha aplicado ampliamente en la tipificación genética de muestras clínicamente positivas, y ha generado una gran cantidad de datos sobre la diversidad genética del parásito⁹²⁻⁹⁵. Al igual que todas las técnicas en las que hay amplificación de ADN, se deben incluir varios controles negativos para tener un estricto control de calidad.

12.21 Análisis de microsatélites

Los microsatélites (MS) son secuencias de ADN corto (2 a 6 pb) con repeticiones en tándem. Se encuentran a lo largo del genoma y generan cambios en la longitud debido a la inserción o deleción de una o múltiples unidades de repetición, lo que genera múltiples alelos en un locus MS en una población.

Las repeticiones en tándem en *T. gondii* son a menudo simples, con tan sólo repeticiones de dos nucleótidos, que ocurren de 2 a 20 veces⁸⁹⁻⁹². Se han utilizado un total de 15 marcadores de MS, incluyendo (tub2, W35, TgM-A, B18, B17; M33, IV.1, XI.1, M48, M102, N60, N82, AA, N61, N83) para determinar el genotipo de *T. gondii* en diferentes laboratorios⁹³⁻⁹⁴. Ajzenberg et al. desarrollaron un método fácil para genotipificar *T. gondii* en un solo PCR-multiplex utilizando 15 marcadores MS, en que los 8 marcadores MS (tub2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1 y XI.1) podrían diferenciar los tipos I, II, y III de todos los genotipos atípicos, y los otros 7 marcadores (M48, M102, N60, N82, AA, N61, N83) podrían mejorar la resolución en la diferenciación genética en aislamientos estrechamente relacionados dentro de un haplogrupo o linaje clonal⁹²⁻⁹³. El ensayo multiplex 15-MS es la mejor herramienta disponible para identificar *T. gondii* de aislamientos genéticamente diferentes o idénticos, es decir, para identificar la fuente de la infección en un brote, contaminación de laboratorio e infecciones mixtas. La limitación de este ensayo es el requisito de un secuenciador automatizado con la aplicación del “*gene scan*”. La desventaja es que muestras escasas en ADN, podrían causar la ausencia de picos o picos de baja intensidad, generando productos de PCR no específicos^{93,94}.

12.22 Fusión de alta resolución

En una muestra homogénea, este método puede analizar variaciones genéticas, lo que permite caracterizar polimorfismos con base en la temperatura de fusión de la secuencia generada por su longitud y contenido de GC⁸⁹. Sobre la base de un único SNP del gen B1 que se encuentra en múltiples copias, el HRM puede clasificar correctamente tres tipos distintos de cepas de *T. gondii*⁹⁵. Este ensayo fue desarrollado para determinar el genotipo de la infección por *T. gondii* directamente a partir de muestras biológicas, con una genotipificación de mayor capacidad al utilizar genes de múltiples copias en comparación con genes de una sola copia, evitando así cultivo celular o bioensayo.

12.23 Referencias

1. Sabin AB. & Olitzky PK. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science*. 1937, 85:336. DOI: 10.1126/science.85.2205.336
2. Chai JY., Lin A., Shin EH., Oh MD., Han ET., Nan HW., Lee SH. Laboratory passage and characterization of an isolate of *Toxoplasma gondii* from an ocular patient in Korea. *Korean. J. Parasitol.* 2003, 41:147-154. doi: 10.3347/kjp.2003.41.3.147
3. Stajner T., Vasiljević Z., Vujić D., Marković M., Ristić G., Mičić D., Pasić S., Ivović V., Ajzenberg D., Djurković-Djaković O. Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51:2686-2690. Doi: 10.1128/JCM.01077-13.
4. Ibebuike K1, Mantanga L, Emereole O, Ndolo P, Kajee A, Gopal R, Pather S. Cerebellar toxoplasmosis in HIV/AIDS infant: case report and review of the literature *Neurol. Sci.* 2012, 33:1423-1428.
5. Monaco SE, Monaghan SA, Stamm JA, Khalbuss WE, Nichols L, Pantanowitz .Toxoplasmosis in a post-transplant bronchoalveolar lavage: a case report. *Diagn. Cytopathol.* 2012, 40:629-634. doi: 10.1002/dc.21646.
6. Değirmenci A1, Döşkaya M, Caner A, Çiçek C, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Exp. Parasitol.* 2011,128:1-8. doi: 10.1016/j.exppara.2011.01.019.
7. Caramello P, Forno B, Lucchini A, Pollono AM, Sinicco A, Giannini P. Meningoencephalitis caused by *Toxoplasma gondii* diagnosed by isolation from cerebrospinal fluid in an HIV-positive patient. *Scand. J. Infect. Dis.* 1993, 25:663-666.
8. LNg'walali PM, Kibayashi K, Mbonde MP, Makata AM, Kitinya JN, Tsunenari S *Toxoplasma* encephalitis in HIV: case report. *East. Afr. Med. J.* 2001, 78:275-276
9. Zamora DO, Rosenbaum JT, Smith JR. Invasion of human retinal vascular endothelial cells by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Br. J. Ophthalmol.* 2008, 92:852-855. doi: 10.1136/bjo.2007.133314.

10. Mahadevan M, Ramalingaiah AH, Parthasarathy S, Nath A, Ranga U, Krishna SS. Neuropathological correlate of the “concentric target sign” in MRI of HIV associated cerebral toxoplasmosis. *J. Mag. Res. Imag. JMRI*. 2013, 38:488-495. doi:10.1002/jmri.24036.
11. Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum PA, Hayde M, Naessens A. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999, 181:843-847. doi: 10.1016/S0002-9378(99)70311-X
12. Pujol-Riqué M, Gómez-López L, Tudó G, Falgueras T, Costa J, Rodríguez-Miguélez JM, Coll O, Valls ME. Analysis of a case of severe congenital toxoplasmosis. *Med. Clin. (Barc)*. 1999, 113:701-703.
13. Garweg J.G. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol.* 2005, 27:61–68. Doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00747.x
14. Miller D, Davis J, Rosa R, Diaz M, & Perez, E. Utility of tissue culture for detection of *Toxoplasma gondii* in vitreous humor of patients diagnosed with toxoplasmic retinochoroiditis. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38:10, 3840-3842.
15. Peyron F., Lobry JR., Musset K., Ferrandiz J., Gomez-Marin JE., Petersen E., Meroni V., Rausher B., Mercier C., Picot S., Cesbron-Delauw MF. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.* 2006, 8:2333-40. doi:10.1016/j.micinf.2006.03.023
16. Fuentes I., Rubio JM., Ramírez C., Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39; 4:1566-1570. doi: 10.1128/JCM.39.4.1566-1570.2001.
17. Nicolau S. & Ravelo A. La reaction de fixation du complement dans le serum et dans des extraits d'organes d'animaux atteints de toxoplasmose expérimentale. *Bull. Soc. Path. Exot.* 1937, 30:855-859.
18. Warren J. & Russ AB. Cultivation of *Toxoplasma* in embryonated egg antigen derived from choriolantoide membrana. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948, 67:85.
19. Sabin A. & Feldman H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 1948, 108:660-3. DOI: 10.1126/science.108.2815.660
20. Macdonald A. Serological diagnosis of human toxoplasmosis. *Lancet.* 1949, 1:950-953. doi:10.1016/S0140-6736(49)92050-4
21. Jacobs L. & Lunde M.N. A Hemoagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.* 1957, 43:308-314.
22. O'Connor GR. Precipitating antibody to *Toxoplasma* Anolow-up study on findings in the blood and aqueous humor. *Am. J. Ophtalm.* 1957, 44:75-83.

23. Fulton J.D. & Turck J. Prueba directa de aglutinación con *Toxoplasma gondii* . Lancet. 1959,12:1063-1069.
24. Engelbecht E. Nueva reacción para el diagnóstico de toxoplasmosis: la floculación sobre lámina. Comunicación al 24º Congreso de la Sociedad Suiza de Microbiología 1965, Lucerna 11-13.
25. Garin J.P. & Despeinges J. Une méthode de diagnostic de la toxoplasmose. L' aglutinación de particules de betonite sensiblees. *Press. Medic.* 1964,72:217-220.
26. Desmouts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 1980, 11:562-568.
27. Montoya JG, Berry A, Rosso F, Remington JS. The differential agglutination test as a diagnostic aid in cases of toxoplasmic lymphadenitis. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45:1463-1468.
28. Yamamoto YI, Hoshino-Shimizu S, Camargo ME. A novel IgM-indirect hemagglutination test for the serodiagnosis of acute toxoplasmosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 1991, 5:127-132.
29. Garin J.P., Ambroise T.P., Cornet A.M., Dien-Truong T. & Despeinges J. Interet de la fluorescence et de l'immuno-fluorescence dans le diagnostic Parasitologique et serologique de la Toxoplasmosis. *Revue de l' Institut Pasteur de Lyon* 1967, 68:179-205.
30. Engvall E. & Perlman O. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 1971, 8871-8879.
31. Voller A., Bidwell D.E., Balett A., Fleck D.G., Perkins M., Oladehin B. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J. Clin. Pathol.* 1976, 29:150-153.
32. Walls K.W., Bullock S.L., English D.K. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and this micro-adaptation for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 1977, 5:273.
33. Noaty: IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. *J. Pediatr.* 1981, 98:32.
34. Liu Q, Wang Z-D, Huang S-Y, Zhu X-Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii* . *Parasites & Vectors.* 2015; 8:292. doi:10.1186/s13071-015-0902-6.
35. Kotresha D Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS.* 2010, 118:529-542.
36. Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii* -specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38:1144-1150.
37. Li S, Galvan G, Araujo FG, Suzuki Y, Remington JS, Parmley S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 2000, 7:781-787.

38. Hill D, Coss C, Dubey JP, Wroblewski K, Sautter M, Hosten T, et al. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 2011, 97:328-337.
39. Hedman K, Lappalainen M, Seppaia I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Infect. Dis.* 1989, 159:736-740.
40. Pfrepper KI, Enders G, Gohl M, Krczal D, Hlobil H, Wassenberg D, et al. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 2005, 12:977-982.
41. de Ory F, Casas I, Domingo CJ, Echevarria J. Application of fluoroimmunoassay to the identification of low avidity specific IgG against pathogenic human viruses and *Toxoplasma gondii*. *Clin. Diagn. Virol.* 1995, 3:323-332.
42. Gutierrez J, Rodríguez M, Piedrola G, del Carmen MM. Detection of IgA and low-avidity IgG antibodies for the diagnosis of recent active toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 1997, 3:658-662.
43. Ali-Heydari S, Keshavarz H, Shojaee S, Mohebbali M. Diagnosis of antigenic markers of acute toxoplasmosis by IgG avidity immunoblotting. *Parasite.* 2013, 20:18.
44. Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy? *J. Clin. Pathol.* 1998, 51:312-315.
45. Deshpande PS, Kotresha D, Noordin R, Yunus MH, Saadatnia G, Golkar M, et al. IgG avidity Western blot using *Toxoplasma gondii* rGRA-7 cloned from nucleotides 39–711 for serodiagnosis of acute toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2013, 55:79-83.
46. Rossi CL. A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin G antibody avidity in toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998, 30:25-30.
47. Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1998, 17:32-36.
48. Buffolano W, Lappalainen M, Hedman L, Ciccimarra F, Del Pezzo M, Rescaldani R, et al. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2004, 23:825-830.
49. Meroni V, Genco F, Tinelli C, Lanzarini P, Bollani L, Stronati M, et al. Spiramycin treatment of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women impairs the production and the avidity maturation of *T. gondii*-specific Immunoglobulin G antibodies. *Clin. Vacc. Immunol.* 2009, 16:1517-1520.
50. Lefevre-Pettazzoni M, Bissery A, Wallon M, Cozon G, Peyron F, Rabilloud M. Impact of spiramycin treatment and gestational age on maturation of *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity in pregnant women. *Clin Vacc Immunol.* 2007, 14:239-243.
51. Lefevre-Pettazzoni M, Le Cam S, Wallon M, Peyron F. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2006, 25:687-693.

52. Bobic B, Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary *Toxoplasma* infection. Case report. *Gynecol. Obstet. Investig.* 1991, 31:182-184.
53. Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34:1506-1511.
54. Meek B, Diepersloot RJ, van Gool T, Speijer D, Peek R. IgM recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by sera of acutely or latently infected humans. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 45:45-52.
55. Bonyadi MR, Bastani P. Modification and evaluation of avidity IgG testing for differentiating of *Toxoplasma gondii* infection in early stage of pregnancy. *Cell J.* 2013, 15:238-243.
56. Weiss L.M., Udem S.A. Western-blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and *Toxoplasma* encephalitis: antigenic diversity among *Toxoplasma* strains. *J. Infect. Dis.* 1988, 157:7-13.
57. Franck J., Mary C., Jarroux E., Dumon H. & Quilici M. Contribution of immunoblot to the diagnosis and monitoring of toxoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome. *Pathol. Biol. Paris.* 1993, 41:865-872.
58. Potasman I., Araujo F.G., Demeson G. & Remington J.S. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J. Infect. Dis.* 1986, 154:650-657.
59. Woodison G. & Smith J.E. Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 1990, 100:389-392.
60. Verhofstede C., Van Gelder P. & Rabaey M. The infection stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by immunoblotting. *Parasitol. Res.* 1988, 74:516-520.
61. Galván R.M.L., Guillen V.C., Saavedra D.R. & Islas R. A. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* 1998, 31(3):271-277.
62. de Moraes Oliveira AC, Silva Borges DS, Reis Carvalho F, Gomes de Macêdo A, Mota CM, de Moraes Oliveira AM, Santiago FM et al. Evaluation of colostrum as an alternative biological sample for the diagnosis of human congenital toxoplasmosis. *BMC Infect. Dis.* 2015; 15:519. Published online 2015 doi: 10.1186/s12879-015-1242-z.
63. Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, Naguleswaran A, Hemphill A Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *J. Parasitol.* 2005, 91:561-563.
64. Lang W, Miklossy J, Deruaz JP, Pizzolato GP, Probst A, Schaffner T, Gessaga E, Kleihues P. Neuropathology of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS): a report of 135 consecutive autopsy cases from Switzerland. *Acta Neuropathol.* 1989, 77:379-90.

65. Budka H1, Costanzi G, Cristina S, Lechi A, Parravicini C, Trabattoni R, Vago L. Brain pathology induced by infection with the human immunodeficiency virus (HIV). A histological, immunocytochemical, and electron microscopical study of 100 autopsy cases. *Acta. Neuropathol.* 1987, 75:185-198.
66. Lavrard I, C. Chouaid, P. Roux, J. L. Poirot, M. Marteau, B. Lemarchand, M. C. Meyohas, J. L. Olivier. Miyamoto C1, Mattos Neto RB, Cesare SD, Belfort Junior R, Burnier MN. Use of CD25 as an immunohistochemical marker for acquired ocular toxoplasmosis. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2010, 73:443-446.
67. Furtado JM, Ashander LM, Mohs K, Chipps TJ, Appukuttan B, Smith JR. *Toxoplasma gondii* Migration within and Infection of Human Retina. Tanowitz HB, ed. *PLoS ONE*. 2013;8:e54358. doi:10.1371/journal.pone.0054358.
68. http://protists.ensembl.org/Toxoplasma_gondii/Info/Annotation/)
69. <http://www.toxodatabase.org/>
70. <http://www.jcvi.org/cms/home/>.
71. Anselmo LM, Vilar FC, Lima JE, Yamamoto AY, Bollela VR, Takayanagui OM. Usefulness and limitations of polymerase chain reaction in the etiologic diagnosis of neurotoxoplasmosis in immunocompromised patients. *J. Neurol. Sci.* 2014, 346:231-234.
72. Jalal S, Nord CE, Lappalainen M, Evengard B, on behalf of the ESCMID, Study Group on Toxoplasmosis. Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10:937-939.
73. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, Reischer GH, Kratochwill K, Förster-Waldl E, Gerstl N, Hayde M, Pollak A, Herkner KR. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2009, 63:10-15.
74. Blay EA, Ghansah A, Otchere J, Koku R, Kwofie KD, Bimi L, Takashi S, Ohta N, Ayi I. Congenital toxoplasmosis and pregnancy malaria detection post-partum: Effective diagnosis and its implication for efficient management of congenital infection. *Parasitol. Int.* 2015, 64:603-608.
75. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53:1294-1300.
76. Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, Accoceberry I, Menotti J, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Hennequin C, Delhaes L, Bonhomme J, Villena I, Scherer E, Dalle F, Touafek F, Filisetti D, Varlet-Marie E, Pelloux H, Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53:1677-1684.
77. Fuentes I, Rodriguez M, Domingo CJ, del Castillo F, Juncosa T, Alvar J. Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34:2368-2371.

78. Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, 11:170-176.
79. Bretagne S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003, 9:505-511.
80. Zainodini N, Zare-Bidaki M, Abdollahi SH, Afrooz M, Ziaali N, Ebrahimian M, Kazemi Arababadi M. Molecular and serological detection of acute and latent toxoplasmosis using real-time PCR and ELISA techniques in blood donors of rafsanjan city, Iran, 2013. *Iran J. Parasitol.* 2014, 9:336-341.
81. Dworkin LL, Gibler TM, Van Gelder RN. Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. *Arch. Ophthalmol.* 2002,120:1534-1539.
82. Menotti J, Vilela G, Romand S, Garin YJ, Ades L, Gluckman E, et al. Comparison of PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 2003,41:5313-5316.
83. Sukthana Y, Mahittikorn A, Wickert H, Tansuphaswasdikul S. A promising diagnostic tool for toxoplasmic encephalitis: tachyzoite/bradyzoite stage-specific RT-PCR. *Int. J. Infect. Dis.* 2012,16:e 279-284.
84. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28:e63.
85. Lau YL, Meganathan P, Sonaimuthu P, Thiruvengadam G, Nissapatorn V, Chen Y. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48:3698-3702.
86. Zhang H, Thekiso OM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N, et al. *Toxoplasma gondii* : sensitive and rapid detection of infection by loop mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Exp. Parasitol.* 2009,122:47-50.
87. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 1995, 172:1561-1566.
88. Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 2002, 186:684-689.
89. Khan A, Su C, German M, Storch GA, Clifford DB, Sibley LD. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43:5881-5887.
90. Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 2006, 36:841-848.

91. Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, de Oliveira AC P, et al. *Toxoplasma gondii* : genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp. Parasitol.* 2008, 118:221-227.
92. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Darde ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48:4641-4645.
93. Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Darde ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 2002, 32:27-38.
94. Ferreira Ade M, Vitor RW, Carneiro AC, Brandao GP, Melo MN. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infect. Gen. Evol.* 2004, 4:131-142.
95. Costa JM, Cabaret O, Moukoury S, Bretagne S. Genotyping of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* using high-resolution melting analysis of the repeated B1 gene. *J. Microbiol. Meth.* 2011, 86:357-363.

13 Tratamiento

GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz & BERUMEN-SOLÍS, Sofia Citlalli

Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Av. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México.

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

13 Resumen

La infección por *Toxoplasma gondii* causa al ser humano daños importantes como el aborto, afectaciones al Sistema Nervioso Central y Ocular. Por lo anterior el tratamiento es de suma importancia para limitar el daño.

En este capítulo se describen diferentes agentes terapéuticos que han sido utilizados para el tratamiento de la toxoplasmosis. Se aborda el mecanismo de acción y su efectividad. Los Inhibidores de la dihidrofolato reductasa incluyen a la pirimetamina quién ha sido la principal protagonista sola o en combinación de otros agentes en el tratamiento de la toxoplasmosis. En pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida la infección por *Toxoplasma* es causante de daños importantes en Sistema Nervioso Central, esto llevó a uso de terapéuticas conbinadas con la pirimetamina como las combinaciones con sulfonamidas como la sulfadiacina, sulfametacina y sulfameracina. Otro agente utilizado es la clindamicina y su eficacia ha sido comparada con la combinación de pirimetamina y sulfadiacina. Otro grupo importante de agentes terapéuticos son los macrólidos y azalidos en los cuales se encuentra la roxitromicina, eritromicina y la azitromicina. La combinación del Trimetropin con pirimetamina ha sido beneficiosa respecto a la mortalidad en pacientes con VIH. El trimetropin con sulfametazoxol es utilizado como profiláctico para evitar encefalitis toxoplasmica en pacientes con inmunosupresión.

13.1 Agentes antimicrobianos

Los avances científicos en relación al conocimiento de la biología de *T. gondii* han permitido algunas aportaciones sobre aplicaciones en el tratamiento y la prevención de la toxoplasmosis. El aumento en el número de pacientes con encefalitis toxoplásmica (ET), debido al SIDA pandémico, ha despertado el interés en el estudio de los mecanismos de acción de agentes antimicrobianos y su actividad contra *T. gondii*¹.

Se han realizado estudios en modelos de ratones con ET aguda e infección crónica causada por *Toxoplasma*, con un modelo adecuado que simula de manera detallada la encefalitis de reactivación crónica que se presenta en la ET en pacientes con SIDA: Por otra parte, se ha demostrado que cepas diferentes de *T. gondii* pueden tener susceptibilidades diferentes a un agente antimicrobiano dado². Esto evita la extrapolación de los resultados a partir de una sola cepa de *T. gondii*.

13.2 Inhibidores de dihidrofolato reductasa (DHFR)

Debido a que *T. gondii* es un protozooario intracelular obligado que lo hace completamente dependiente del hospedero para su abastecimiento de purinas, se han investigado de manera extensa estos agentes. Estos incluyen la pirimetamina, que se ha estudiado principalmente en combinación con otros agentes. La combinación de pirimetamina y sulfadiacina sigue siendo la mejor terapia para pacientes con ET³ y la pirimetamina es el estándar con el cual se compara la mayor parte de los estudios experimentales. Así mismo, se ha demostrado que el trimetoprim tiene actividad contra *T. gondii*, pero su habilidad para inhibir la reproducción de los parásitos fue menor que una concentración comparable de pirimetamina⁴. Estudios retrospectivos sugieren que el trimetoprim con sulfametoxazol son eficaces en el tratamiento de ET⁵ pero estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la pirimetamina con sulfadiacina tienen mayor eficacia^{4,6}. El trimetrexato tiene una actividad considerablemente mayor en la inhibición de DHFR de *T. gondii* que la pirimetamina o trimetoprim⁷⁻⁹. Sin embargo, un estudio clínico en donde se utilizó trimetrexato como terapia activa demostró una respuesta clínica inicial, pero un alto índice de recaídas cuando se utilizó este agente solo¹⁰.

Piritrexin, un inhibidor de la DHFR soluble en lípidos, tiene actividad *in vivo* e *in vitro* contra *T. gondii*⁹⁻¹¹. El tratamiento de ratones infectados sólo prolongó el tiempo anterior a la muerte. Cuando se combinó con sulfadiacina, esta combinación protegió de manera significativa contra la muerte a los ratones¹¹.

En el modelo murino se ha probado la combinación de sulfadiazina más pirimetamina con fluconazol y pirimetamina con fluconazol. El fluconazol es un importante triazol antifúngico utilizado en contra de otros patógenos oportunistas. Las combinaciones de sulfadiazina más fluconazol y la pirimetamina o fluconazol por 10 días con 10 mg / kg / día de fluconazol combinado con 40/1 mg / kg / día de sulfadiazina y pirimetamina generó un 93% de supervivencia en ratones CF1 infectados con la cepa RH de *T. gondii*, frente al 36% de los ratones tratados con sólo sulfadiazina y pirimetamina¹².

Un estudio reciente en el modelo murino tratado con nanocápsulas lipídicas de pirimetamina (PYR-enLNC), en el cual se observó aumento de la tasa de supervivencia de ratones y se presentaron menos efectos secundarios versus animales que solo fueron tratados con las mismas dosis de pirimetamina no-encapsulados. Con este estudio se demostró que la nanotecnología puede ayudar a dar un enfoque prometedor para el desarrollo de formulaciones más eficaces y con mayor tolerabilidad¹³.

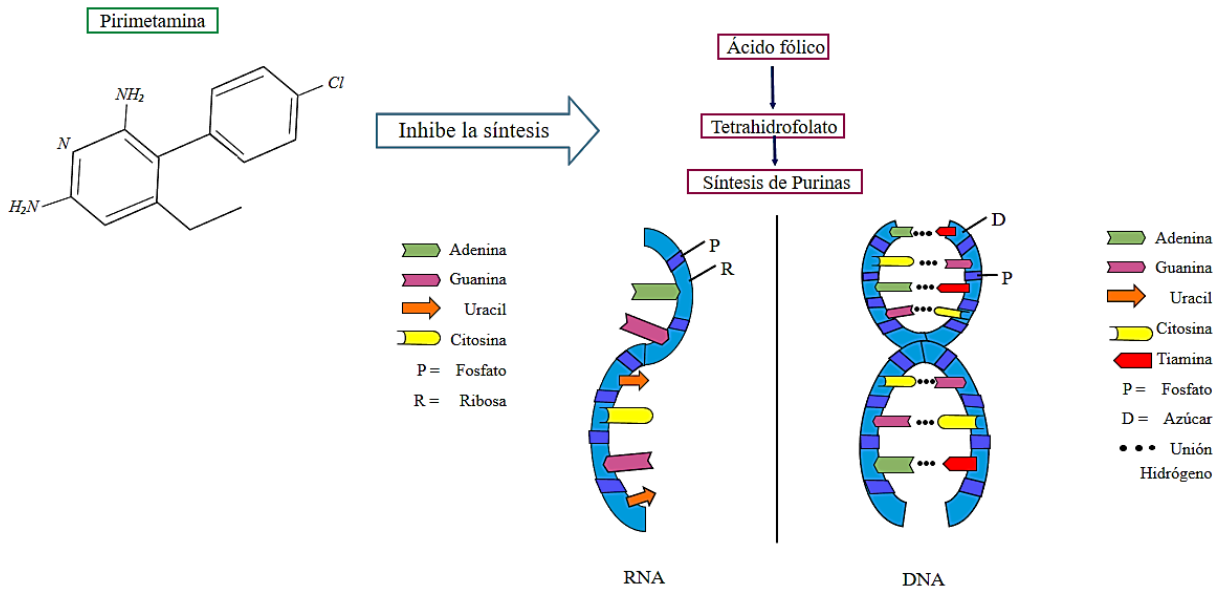


Figura 33 Fórmula química de la Pirimetamina $C_{12}H_{13}N_4Cl$. Su mecanismo de acción se lleva a cabo inhibiendo la síntesis de tetrahidrofolato que es indispensable para la síntesis de purinas presentes en el DNA y RNA del parásito.

13.3 Sulfonamidas

El mecanismo de acción de las sulfonamidas se basa en la inhibición de la sintetasa del ácido dihidrofolico que interfiere con la habilidad del parásito para utilizar el ácido paraaminobenzóico. En combinación con los inhibidores DHFR, proporcionan un bloqueo secuencial del metabolismo de folatos a dos niveles, con lo cual explica su actividad sinérgica contra *T. gondii*. Entre las sulfonamidas probadas, la sulfadiazina, sulfametacina y sulfameracina tuvieron mayor eficacia¹⁴⁻¹⁶.

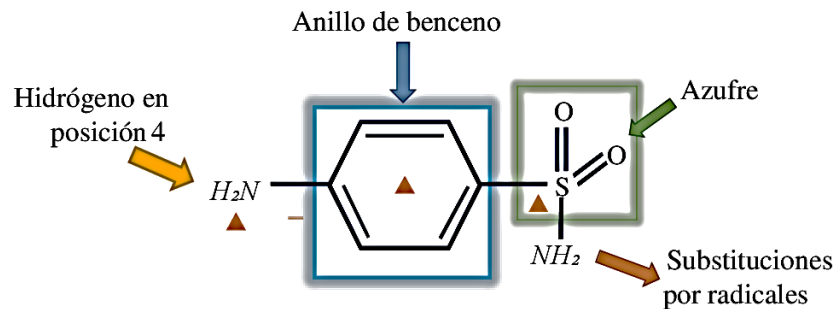
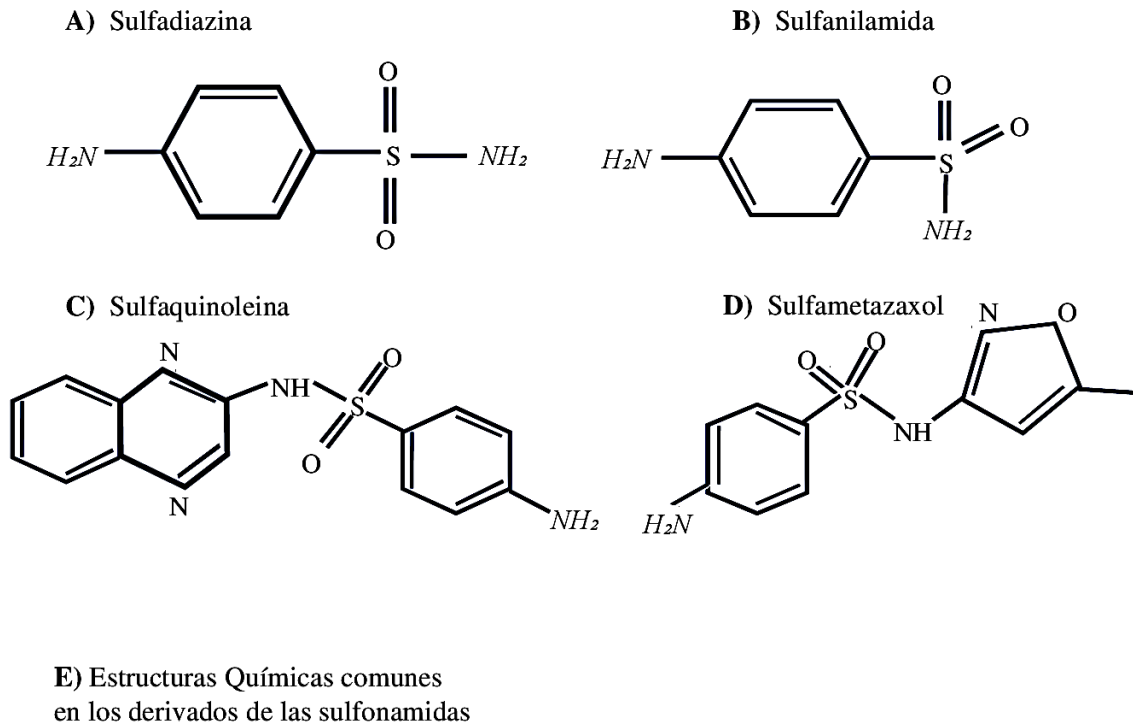


Figura 34 Estructura de las sulfonamidas A) Sulfadiazina, B) Sulfanilamida, C) Sulfaquinoleina, D) Sulfametazaxol, E) Estructuras Químicas comunes en los derivados de las sulfanamidas, que tienen en común en su estructura química el nitrógeno en la posición 4, un anillo de benceno y una azufre con dos enlaces dobles unidos al oxígeno. Lo que siempre se sustituye es la amida(NH₂) por otros radicales. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis del ácido hidrofólico y cofactores FAH4 para la síntesis de timidina, purinas y metionina que participan en la formación de DNA, RNA y proteínas respectivamente, por lo que el parásito muere.

13.4 Clindamicina

En modelos experimentales de infección aguda y crónica causada por *Toxoplasma*, el tratamiento con clindamicina redujo en forma significativa la mortalidad^{17,18} En un modelo de toxoplasmosis intracerebral, Hofflin y Remington¹⁹ demostraron la habilidad de la clindamicina para reducir la cantidad de taquizoítos y la inflamación del cerebro afectado. Estos resultados sirvieron como estímulo para dos estudios clínicos en perspectiva, los cuales demostraron que la combinación de pirimetamina y colindancia se pudo comparar con la de la pirimetamina con la sulfadiazina²⁰⁻²¹ para el tratamiento de ET en SIDA: No se conoce el mecanismo de acción de la clindamicina contra la infección causada por *T. gondii*.

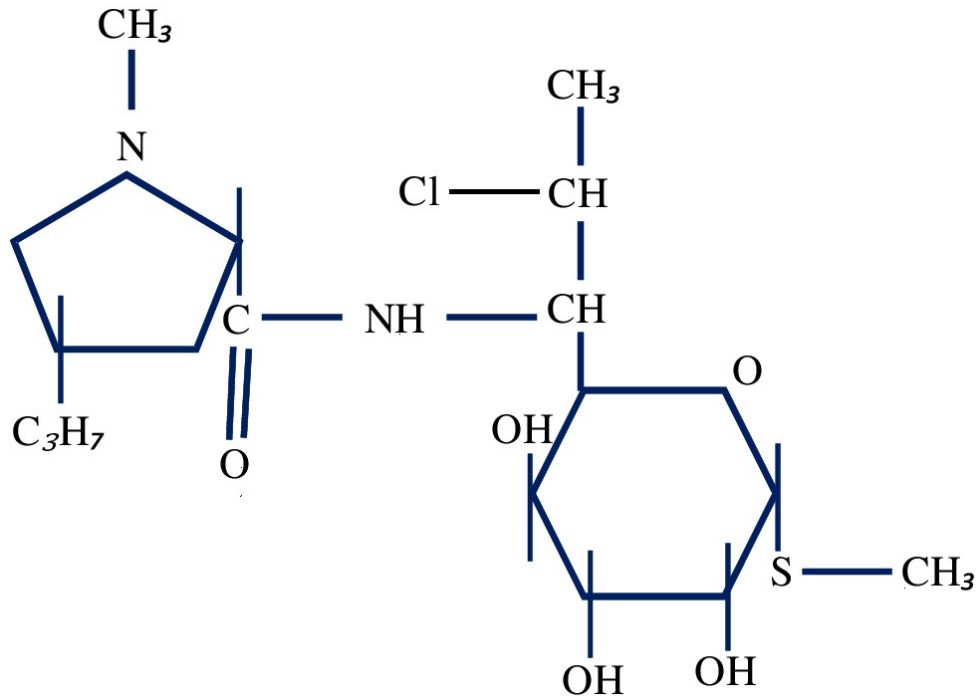


Figura 35 Estructura química de la Clindamicina.

La clindamicina, tiene un efecto bacteriostático. Interfiere con la síntesis de las proteínas, en una manera similar a la eritromicina, uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Esto causa el antagonismo si son administrados simultáneamente y hace posible una resistencia cruzada.

13.5 Macrólidos y azalidos

La roxitromicina, un derivado de la eritromicina, protegió a los ratones contra una infección letal causada por *T. gondii*²²⁻²³. La azitromicina, un nuevo macrólido de 15 miembros, tiene actividad *in vitro* contra *T. gondii*²⁴⁻²⁵ y una actividad *in vivo* contra la toxoplasmosis murina^{2,21}. Probada en forma paralela con otros macrólidos, la azitromicina fue considerablemente más activa que la roxitromicina y eritromicina². Es interesante que el grado de protección varió del 40 al 100%, dependiendo de la cepa de *T.gondii* utilizada².

La habilidad de la claritromicina para inhibir *T. gondii* se demostró tanto en ratones como en modelos *in vitro*²⁶⁻²⁷. En estudios clínicos se ha reportado que pacientes tratados con una combinación de pirimetamina y claritromicina mostraron una respuesta clínica con una resolución parcial o total de las lesiones en la TC.

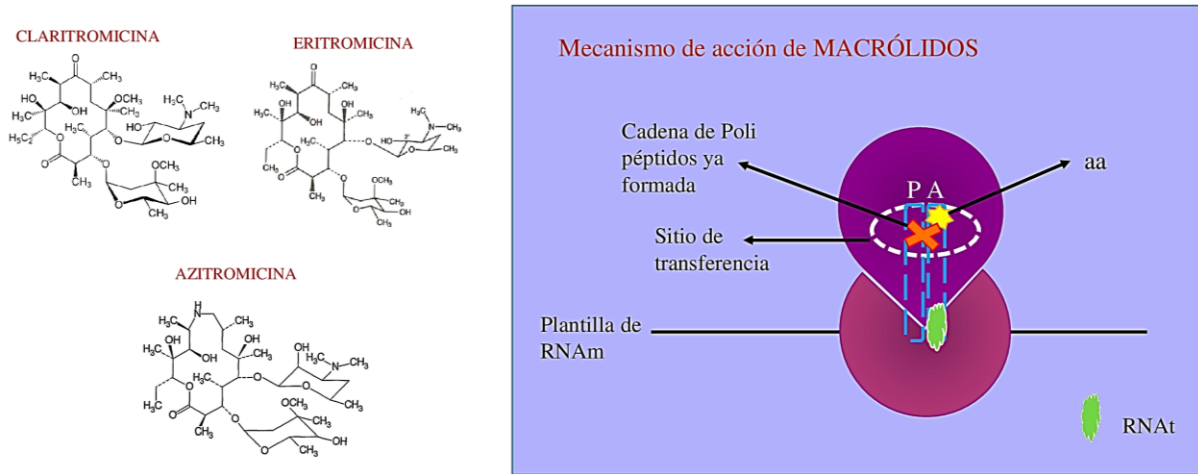


Figura 36 Estructura molecular de los marcóolidos eritromicina, claritromicina y Azitromicina.

Su mecanismo de acción se basa en que la inhibición de la síntesis de proteínas de las bacterias por unirse al sitio P de la subunidad 50S: Bloqueando el proceso de translocación del peptidil-ARNt.

13.6 Tetraciclinas

Tanto la doxiciclina como la miociclina tienen actividad *in vivo* e *in vitro* contra la infección causada por *T. gondii* en ratones su mecanismo de acción se basa en que la inhibición de la síntesis de proteínas de las bacterias por unirse al sitio P de la subunidad 30S Figura 37²⁹.

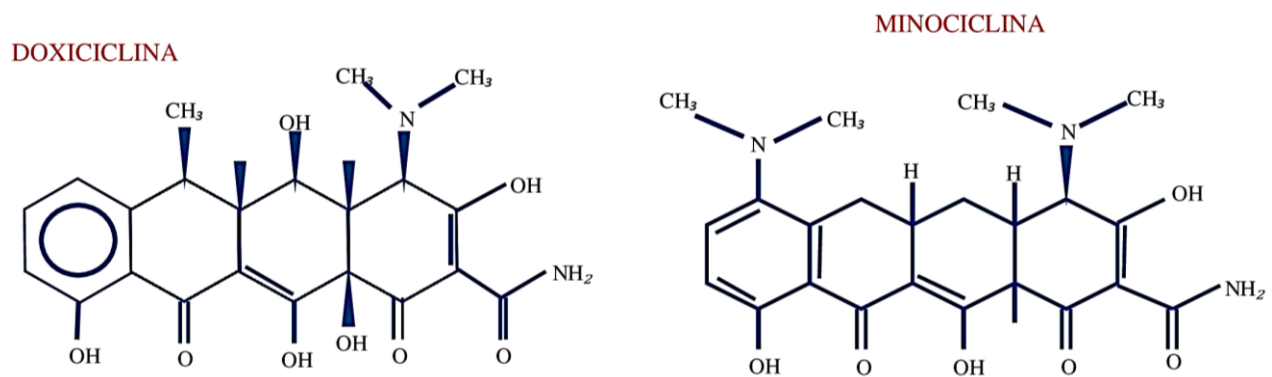


Figura 37 Derivados de las tetraciclinas A) Doxicilina y B) Minociclina.

13.7 Hidroxinaptoquinona

La hidroxinaptoquinona, atovaquinona (anteriormente designada 566c80), tiene una actividad potente *in vitro* tanto contra los taquizoítos como contra los quistes^{30,31}.

En la toxoplasmosis murina, el tratamiento con atovaquinona redujo de manera significativa la mortalidad, ya que presentó una actividad notable contra las siete cepas de *T. gondii* estudiadas, informaron que seis de ocho pacientes con SIDA con ET a los que no les sirvió la terapia estándar o no fueron tolerantes a ella mejoraron clínica y radiológicamente mediante el tratamiento con atovaquinona³¹⁻³². Por desgracia, tres de los pacientes recayeron mientras recibían monoterapia con atovaquinona.

La mayor parte de los casos de ET en pacientes inmunocomprometidos fueron el resultado de una infección latente anterior. Los regímenes recomendados en la actualidad son activos sólo contra los taquizoítos. Debido a su notable actividad contra los quistes, atovaquinona tiene el potencial para evitar la reactivación de ET en pacientes con SIDA: Esto sugiere que en el futuro podrá elaborarse un fármaco o una combinación de fármacos para evitar la necesidad de una terapia de mantenimiento que impida la recaída.

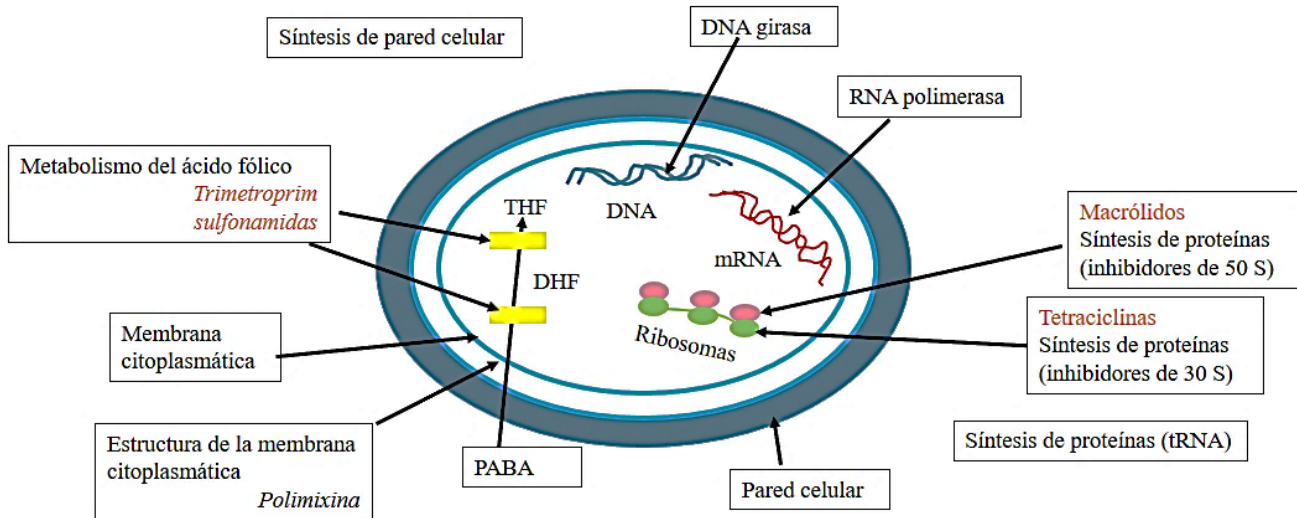


Figura 38 Mecanismo de acción de diferentes drogas usadas en el tratamiento de la toxoplasmosis.

Los inhibidores de la síntesis de ácido para-aminobenzoico (PABA), sulfamidas y pirimetamina inhiben el ácido dihidrofólico que da origen al tetrahidrofolato y finalmente inhibe la síntesis de DNA y RNA del parásito.

13.8 Otros medicamentos

Pfefferkorn (1989) reportó que la Emicina, un inhibidor potente de la síntesis de DNA y RNA, tiene actividad *in vitro* contra *T. gondii*. Arprinocid, un análogo de la purina, inhibe el transporte de hipoxantina en la transmembrana y tiene una actividad notable *in vitro* contra *T. gondii*³³. y actividad *in vivo* contra la toxoplasmosis murina³⁴. No se ha utilizado en humanos.

Dapsone, un inhibidor potente de sintetasa del dihidropteroato de *T. gondii*, tiene actividad *in vitro* contra *T. gondii* y redujo de manera significativa la mortalidad cuando se usó en toxoplasmosis murina³⁵⁻³⁷. Qinghaosu y pentamidina tienen actividad contra *T. gondii*. El potencial terapéutico de estos tres agentes yace en la experiencia clínica considerable que ya se tiene por usarlo en otras enfermedades infecciosas³⁸⁻³⁹.

En un estudio con Sulfacoropirazina (SPZ) se trataron taquizoítos de *T. gondii* a dosis de (250 mg / ml) durante 2 h a 37 ° C. para medir el efecto y los cambios ultraestructurales de los taquizoítos, se observó que la morfología y ultraestructura de los taquizoítos pueden verse afectados de manera significativa por SPZ, mediante la inhibición de su metabolismo energético, la inducción de la apoptosis y dañar su estructura. Sin embargo, ningún mecanismo de este fármaco ha sido estudiado. El estudio proporciona una base experimental para el estudio adicional sobre el mecanismo de SPZ contra *T. gondii*⁴⁰.

En un estudio realizado en astrocitos de rata cultivados *in vitro* e infectados con taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, fueron tratados con nitazoxanida en una concentración de 10 mg / ml por 24 y 48 h, produciendo un 97% de muerte en *T. gondii* a las 48 h.

La tasa de mortalidad de *T. gondii* fue mayor cuando fueron tratados con nitazoxanida que con pirimetamina. Se observó una mayor tasa de toxicidad en astrocitos utilizando pirimetamina a 40 mg / mL. La nitazoxanida redujo la infección más eficiente que pirimetamina y fue citotóxico para astrocitos en la dosis administrada⁴¹.

13.9 Combinación de terapia antimicrobiana

Además de la combinación de la pirimetamina con la sulfonamida y combinaciones de la pirimetamina con otras sulfamidias utilizadas en estudios clínicos descritos anteriormente, han demostrado tener actividad sinérgica contra *T. gondii* en estudios experimentales que incluyen la pirimetamina con dapsona⁴², la claritromicina con minociclina⁴³, la azitromicina con pirimetamina⁴⁴ y la azitromicina con sulfadiacina⁴⁵. Las observaciones han demostrado la actividad sinérgica de las combinaciones de claritromicina con minociclina, claritromicina con sulfadiacina, claritromicina con pirimetamina, atovaquinona con pirimetamina, y atovaquinona con sulfadiacina en toxoplasmosis murina. La combinación de Trimetropin con pirimetamina ha mostrado una tendencia beneficiosa respecto a la mortalidad en pacientes con VIH, así como la profilaxis con Trimetropin y Sulfametazoxol, para

Evitar la encefalitis toxoplásmica en estos pacientes sigue siendo vigente a pesar de los efectos secundarios en los pacientes⁴⁵.

En algunos estudios realizados en mujeres embarazadas y tratadas con la combinación de espiramicina se ha observado tasas de transmisión significativamente más bajas en los niños nacidos de madres tratadas ($P < 0,01$)⁴⁶. Otro estudio en mujeres embarazadas que sero-convirtieron en el tercer trimestre tratadas con sulfonamidas más espiramicina, reduciendo la transmisión en los niños, debido a la eficacia del tratamiento⁴⁷. Un estudio realizado en recién nacidos, tratados con espiramicina. La comparación de los niños recién nacidos, hijos de mujeres que sero-convirtieron durante el embarazo, fueron evaluados respecto al riesgo de lesiones intracraneales y oculares. El tratamiento que recibieron las madres fue con espiramicina y la combinación de ésta con sulfonamidas. La sero-conversión materna se asoció inversamente con el riesgo de lesiones intracraneales pero no con las lesiones oculares⁴⁸.

13.10 Modificadores de la respuesta biológica

La inmunoterapia sigue siendo una esperanza terapéutica para el tratamiento de infecciones que ponen en peligro la vida de pacientes inmunocomprometidos. Las citocinas que se han usado *in vivo* en modelos murinos de toxoplasmosis con informes que indican que han tenido éxito incluyen interferón gamma (IFN- γ)⁴⁹⁻⁵⁰, Interleucina-2 (IL-2)⁵¹, Factor de necrosis tumoral (TNF) e Interleucina-1 (IL-1)^{52,53}.

Dado que el IFN- γ se ha identificado como un mediador importante de resistencia contra la infección causada por *T. gondii*, los investigadores han estudiado el papel de éste administrando de manera exógena en combinación con antibióticos y han demostrado su actividad sinérgica en toxoplasmosis murina con roxitromicina, pirimetamina y azitromicina⁵⁴⁻⁵⁵. El tratamiento con IFN- γ en combinación con clindamicina mostró un efecto protector extra⁵⁶.

Posiblemente en los próximos años existan nuevas propuestas a través de estudios de epigenética en el parásito, que den información de mecanismos implicados en la modulación de la activación de genes etapa específica y la diferenciación del parásito en *T. gondii*. Será necesario estudiarse la interconversión-taquizoíto bradizoíto que incluye importantes cambios morfológicos y fisiológicos, que requieren la modulación de la expresión génica etapa específica para el desarrollo de nuevos tratamientos para la toxoplasmosis⁵⁷.

13.11 Referencias

1. Araujo FG, Remington JS. Recent advances in the research for new drugs for treatment of toxoplasmosis. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 1992, 1:153-154.
2. Araujo FG., Shepard RM., Remington JS. *In vivo* activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 1991, 6:519-524.
3. Israelski DM., Reminton JS. AIDS-associated toxoplasmosis. In the Medical Management of AIDS. Edited by Sande MA, Volberding PA. Philadelphia W: B: Saunders & Co. 1992, 319-345.
4. Grossman PL., Remington JS., The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo* . *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1979, 28:445-455.
5. Solbreux P., Sonnet J., Zech F. A retrospective study about the use of cotrimoxazole as diagnostic support and treatment of suspected cerebral toxoplasmosis in AIDS. *Acta Clin. Belg*. 1990, 45:85-96.
6. Feldman HA. Effects of trimehoprim and sulixazole alone and in combination on murine toxoplasmosis. *J. Infect. Dis*. 1973, 128:774-777.
7. Allegra CJ, Kovacs JA, Drake JC, Swan JC, Chabner BA, Masur H. Potent *in vitro* and *in vivo* anti *Toxoplasma* activity of the lipid-soluble antifolate trimetrexate. *Journal of Clinical Investigation*. 1987,79:478-482.
8. Kovacs JA., Allegra CJ., Chabner BA., *et al*. Potent effect of trimetrexate, a lipd-soluble antifolate, on *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis*. 1987, 155:1027-1032.
9. Derouin F., Chastang C. *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 1989, 33:1753-1759.
10. Polis MA. Masur H., Tuazon C., *et al*. Salvage trial of trimetrexate-leucovorin for the treatment of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS *J Infect Dis*. 1993, 167: 1422-1426.
11. Araujo FG., Guptill DR., Remington JS. *In vivo* activity of piritrexin against *Toxoplasma gondii* . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991,10:519-24.
12. Martins-Duarte ÉS1, de Souza W, Vommaro RC. *Toxoplasma gondii*: the effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. *Exp. Parasitol*. 2013,133:294-9. doi: 10.1016/j.exppara.2012.12.011.

13. Pissinate K, dos Santos Martins-Duarte É, Schaffazick SR, de Oliveira CP, Vommaro RC, Guterres SS, Pohlmann AR, de Souza W. Pyrimethamine-loaded lipid-core nanocapsules to improve drug efficacy for the treatment of toxoplasmosis. *Parasitol. Res.* 2014,113:555-564. doi: 10.1007/s00436-013-3715-6.
14. Eyles DE., Coleman N. Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiotic. Chemother.* 1953, 3:483-490.
15. Eyles DE., Jones FE. The chemotherapeutic effects of pyrimethamine and sulfadiazine on toxoplasmosis of the Norway rat. *Antibiotic. Chemother.* 1955, 5: 731-734.
16. Eyles DE., Coleman N. The effect of sulfadimetine, sulfisoxazole, and sulfapyrazine against mouse toxoplasmosis. *Antibiotic. Chemother.* 1955, 5:525-529.
17. MC Master PR., Powers KG., Finerty JF. Lunde MN. The effect of two chlorinated lincomycin analogues against acute toxoplasmosis in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1973, 22:14-17.
18. Araujo FG. Remington JS. Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1974, 5:492-496.
19. Hofflin JM, Remington JS. Clindamycin in a murine model of toxoplasmic encephalitis. *Antimicrob. Agents. Chemotherapy.* 1987, 31:492-496.
20. Danneman B., Mccutchan JA., Israelski D., et al. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS (a randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine). *Ann. Intern. Med.* 1992, 116:33-43.
21. Katlama C. Evaluation of the efficacy and safety of clindamycin plus pyrimethamine for induction and maintenance therapy of toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 1991, 10:189-191.
22. Chang HR., Pechere JC. Effect of roxithromycin on acute toxoplasmosis in mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1987, 31:1147-1149.
23. Lufth BJ. *In vivo* activity of roxithromycin against *Toxoplasma gondii* in mice. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1987, 6:479-481.
24. Deroquin F, Chastang C. Activity *in vitro* against *Toxoplasma gondii* of azithromycin and clarithromycin alone and with pyrimetamine. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990, 25:755-757.
25. Araujo FG, Fuptill DR, Remington JS. Azithromycin, a macrolide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1988, 32:755-757.
26. Chang HR, Rudareanu FC, Pechere JC. Activity of A- 56268(TE-031), a new macrolide, against *Toxoplasma gondii* in mice. *J. Antimicrob. Chemother* 1988, 22:359-361.
27. Chang HR, Pechere JC. *In vitro* effects of four macrolides (roxithromycin, spiramycin, azithromycin (CP-62,993), and A-56268) on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1988, 32:524-529.

28. Chang HR, Comte R, piguet P-F, Pechere JC. Activity of aminocycline against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother* .1991, 27:639-645.
29. Tabbara KF, Sakuragi S. O'connor GR. Minocycline in the chemotherapy of murine toxoplasmosis. *Parasitol*. 1982, 84:297-302.
30. Huskinson-Mark J, Araujo FG, Remington JS. Evaluation of the effect of drugs on the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis*. 1911, 164:170-177.
31. Araujo FG, Huskinson J, Remington JS. Remarkable *in vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquione against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii* . *Antimicrob. Agents Chemother*. 1991, 35:293-299.
32. Masur H, O'neill D, Feuerstein Y, *et al*. 566C80 is effective as salvage treatment for *Toxoplasma* encephalitis. VII International Conference on AIDS, 1991, 7:30, WB31.
33. Pfefferkorn ER. Anticoccidial agents in the treatment of toxoplasmic encephalitis. In *New Strategies in Parasitology* Edited by McAdam K.P.WJ London: Churchill Livingstone, 1989, 241-258.
34. Luft BJ. Potent *in vivo* activity of arprinocid, a purine analogue, against murine toxoplasmosis. *J. Infect. Dis*. 1986, 154:692-694.
35. Eyles DE, Coleman N. An evaluation of the effect of sulfones on experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiotic. Chemother*. 1957, 7:578-585.
36. Allegria CJ, Boarman D, Kovacs JA, *et al*. Interaction of sulfonamide and sulfone compounds with *Toxoplasma gondii* dihydropteroate syntheses. *J. Clin. Invest* .1990, 85:371-379.
37. Deroquin F, Picketty C, Chastang C, Chau F, Rouveix B, and Pocidalo JJ. Anti-*Toxoplasma* effects of dapsone alone and combined with pyrimethamine. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1991, 35:252-255.
38. Ou-Rang K, Krung EC, Marr JJ, Berens RL. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* by Quinghaosu and derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1990, 34:1961-1965.
39. Lindsay DS, Blagburn BL, Hall JE, Tidwell RR. Activity of pentamidine and pentamidine analogs against *Toxoplasma gondii* in cell cultures. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1991, 35:1914-1916.
40. Zeng Y, Dong H, Han H, *et al*. The Ultrastructural Effects of Sulfachloropyrazine on *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *Iran. J. Parasitol*. 2013, 8:73-77.
41. Galván-Ramírez M de L, Dueñas Jiménez JM, Rocío Rodríguez Pérez L, Troyo-Sanroman R, Ramírez-Herrera M, García-Iglesias T. Effect of nitaxozanide and pyrimethamine on astrocytes infected by *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Arch. Med. Res*. 2013, 44:415-421. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.07.002.
42. Beverley KJA, Fry BA. Sulphadimidine, pyrimethamine and dapsone in the treatment of toxoplasmosis in mice. *Brit. J. Pharmacol*. 1957, 12:189-193.

43. Araujo F, Pfofocimer P, and Remington J. Clarithromycin- minocycline is synergistic in a murine model of toxoplasmosis (letter). *J. Infect. Dis.* 1992, 165:788.
44. Derouin F, Almadany R, Chaouy R, Rouveix V, Pocard JJ. Synergistic activity of azithromycin and pyrimethamine on sulfadiazine in acute experimental toxoplasmosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 36:997-1001.
45. Yan J, Huang B, Liu G, Wu B, Huang S, Zheng H, Shen J, Lun ZR, Wang Y, Lu F. Meta-analysis of prevention and treatment of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. *Acta Trop.* 2013,127:236-44. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.05.006.
46. Morjaria S, Epstein DJ, Romero FA, et al. *Toxoplasma* Encephalitis in Atypical Hosts at an Academic Cancer Center. *Open Forum Infectious Diseases.* 2016, 3:ofw070. doi:10.1093/ofid/ofw070.
47. Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *British Medical Journal.* 1999,318:1511-1514.
48. Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, Petersen E, Gilbert R; European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr.* 2005,94:1721-31.
49. Araujo F, Lin T, Remington J. Synergistic combination of azithromycin and sulfadiazine for treatment of toxoplasmosis in mice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992, 11:71-72.
50. McCabe RE, Luft JB, Remington JS. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 1984, 150:961-962.
51. Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. *Infect Immun.* 1990, 58:3050-3055.
52. Sharma SD, Hofflin JM, and Remington JS. *In vivo* recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii* . *J. Immunol.* 1985, 135:4160-4163.
53. Chang HR, Grau GE, Pechere JC. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii* . *Immunology.* 1990, 69:33-37.
54. Orellana MA, Suzuki Y, Araujo FG, Remington JS. Role of beta interferon in resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 1991, 59:3287-3290.
55. Hofflin JM, Remington JS. *In vivo* synergism of roxithromycin (RU 965) and interferon against *Toxoplasma gondii* . *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987, 31:346-348.
56. Israelski D, Remington JS. Activity of Gamma interferon in combination with pyrimethamine or clindamycin in treatment of murine toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1990, 9:358-360.

57. Vanagas L, Jeffers V, Bogado SS, Dalmasso MC, Sullivan WJ, Angel SO. *Toxoplasma* histone acetylation remodelers as novel drug targets. *Expert Rev. Anti-infective Ther.* 2012,10:1189-1201. doi:10.1586/eri.12.100.

14 Epidemiología

GALVÁN-RAMÍREZ, María de la Luz

Departamento de Fisiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Av. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México.

M. Galván, R. Mondragón (Dir.'s) Toxoplasmosis. ©ECORFAN-México, Jalisco, México, Julio, 2017.

14 Resumen

La toxoplasmosis es una zoonosis, con una distribución cosmopolita. La prevalencia aumenta con edad en la mayor parte de las poblaciones. Existen diferencias importantes debidas al clima. En este capítulo se describen las prevalencias de diferentes lugares del mundo, considerando algunos aspectos que como el clima, los hábitos alimenticios, la convivencia con gatos pueden influir en éstas. En lugares con climas fríos las prevalencias han sido menores, respecto a climas tropicales como en África y América Latina donde éstas pueden ser mayores al 50%. Los hábitos alimenticios como la ingesta de carne cruda o mal cocida son factores importantes para mayores prevalencias en poblaciones que los practican este hábito. Las poblaciones que presentan prevalencias altas son: Mujeres con aborto, dueños de gatos, que no tienen control de sus heces y la alimentación de su gato, pacientes con SIDA entre otros. El método diagnóstico su sensibilidad y especificidad también son importantes para prevalencias en poblaciones abiertas. Cuando existen diferentes prevalencias, analizadas con métodos diagnósticos diferentes, en un mismo país, se ha observado que mediante el metanálisis, se puede obtener una prevalencia ponderada de esas poblaciones.

14.1 Población General

La toxoplasmosis es una zoonosis causada por *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado que infecta todas las células y tejidos de los vertebrados¹⁻⁵. Su distribución es mundial aunque existen grandes diferencias determinadas por el clima regional. En países con clima frío como en Alaska, la prevalencia es del 1%⁶, aunque en forma global, en los Estados Unidos se determinó entre los años 1988-1994 una prevalencia ajustada por edad del 22.5 %⁷. En China se reportó una prevalencia del 12,5%⁸. En Europa, las prevalencias son moderadas en Serbia con un 38.1%⁹. En algunos países las estrategias de control y vigilancia epidemiológica ha logrado reducir las prevalencias de toxoplasmosis, como por ejemplo en Grecia durante 1984 la prevalencia fue del 37% y 2004 se detectó una reducción al 24.1%¹⁰; en los países bajos en 1995-1996 la prevalencia fue del 40% y decreció en 2006-2007 a 26%¹¹. En los países que tienen clima tropical, las prevalencias de anticuerpos son más elevadas como ocurre en África y en América Latina¹²⁻¹⁵; en la República Democrática de San Tome y Príncipe 54.8%¹⁶, Venezuela 85.5%¹⁷ y en Brasil con rangos del 50 al 80%¹⁸. Por otro lado hay diferencias también en la distribución de acuerdo a la presencia de los hospederos definitivos. En algunas islas del Pacífico donde no existían gatos no se encontraron anticuerpos contra *T. gondii* en la población¹²⁻¹⁵, así mismo la prevalencia es más alta cuando los dueños de gatos conviven con ellos dentro de la casa, los alimentan con desechos de mesa o con carne cruda¹⁹. Existen numerosos estudios en los cuales se ha demostrado que la prevalencia a la infección aumenta con la edad de la población^{6,7}. Estudios serológicos en niños de América Latina mostraron que el 30% se infectó en los primeros 5 años de vida, y el 70% de la población en los primeros 25 años de vida, este mismo fenómeno se ha observado en otras poblaciones como en Estados Unidos de América⁷.

En México se han realizado estudios de seroprevalencia en población general, demostrado mediante el método de Sabin y Feldman, una positividad del 22 al 47 %, y por intradermoreacción se comprobó que del 15 al 65% de la población había estado en contacto con *Toxoplasma gondii*⁶, Roch reportó en 1966 el 30%¹⁵. Velasco Castrejon *et al* reportaron en 1992 por inmunofluorescencia indirecta y en una población de 29,935 muestras recopiladas de toda la República Mexicana, una seroprevalencia del 50%², menor en la zona norte con un 17.1% en el estado de Baja California Sur y con la máxima seroprevalencia en los estados cercanos al trópico de cáncer y zonas costeras con un 67.5% en el estado de Tabasco y del 36.2 % para el estado de Jalisco².

Un estudio comparativo reciente llevado a cabo en sueros obtenidos de las Encuestas Nacionales de Salud, con 3,599 sueros recopilados en el 2000 y 46,800 sueros recopilados en el 2006, se obtuvieron valores ponderados y valores ajustados de 62,5% y 40,0% respectivamente para el año 2000 y del 63.7% y el 43,1% respectivamente para el 2006, lo que reflejó un ligero aumento de la prevalencia²⁰. Es importante aclarar que los estudios antes mencionados se llevaron a cabo con metodologías diferentes lo cual dificulta la comparación epidemiológica. En un estudio de meta-análisis que incluía 90 estudios con 132 diferentes grupos, con un total de 70,123 desde 1951 hasta el 2012, de los cuales 19,262 resultaron positivos, 27.4% con una prevalencia cruda ó ponderada de 20.6% con una tendencia a la baja y menor que en grupos de riesgo, en donde la prevalencia ponderada fue de 37.8%. Las diferencias con respecto a las otras encuestas, es que el meta-análisis ajusta la diferencias metodológicas incluidas en el estudio²¹. Ese mismo año en el estado de Durango se reportó una prevalencia de 12%²². Finalmente en el Gráfico 1. Se muestran las prevalencias de los grupos estudiados en Jalisco en poblaciones con y sin riesgo para toxoplasmosis.

**PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- *Toxoplasma*
EN GRUPOS POBLACIONALES CON DIFERENTES
RIESGOS**

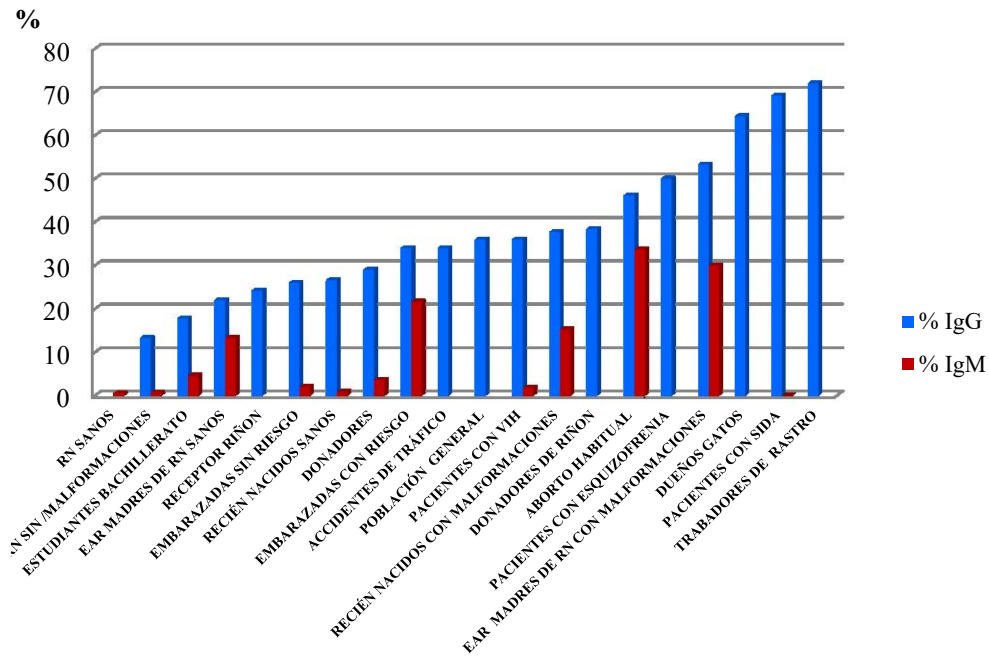


Gráfico 1 Se muestra la prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma* IgG e IgM en diferentes poblaciones: Se observa un incremento en la prevalencia en poblaciones con mayor riesgo como son; Recién nacidos (RN) con malformaciones, mujeres con embarazo de alto riesgo (EAR) que tuvieron recién nacidos con malformaciones, donadores de riñón, mujeres con abortos, dueños de gatos, pacientes con SIDA y Trabajadores de rastro.

14.2 Prevalencia en embarazos normales, anormales y abortos

La toxoplasmosis en obstetricia es considerada de gran importancia, debido al compromiso en que se encuentran involucrados tanto la madre como el producto.

En el mundo se han realizado una gran variedad de estudios de prevalencia, observándose rangos del 5% hasta el 95% en mujeres embarazadas²³⁻²⁷. En el continente asiático existen diversas prevalencias de la toxoplasmosis en el embarazo como sigue: En Tailandia del 28.3%²⁷, Malasia con un 42.47%²⁸ y en Myanmar de 30.7%²⁸, en Turquía con un 30.1%²⁹, en Andhra Pradesh, India con 40.5% y 45%^{30,31} y en Nepal del 50.6%³².

En Europa las prevalencias van desde el 12,9% en España³³, un 16.4% en Italia³⁴, Londres con un 17.8%³⁵ y en Polonia con 41.3%³⁶. En países del medio oriente, en Saudí Arabia un 24.1%³⁷, Palestina 27.9%³⁸ noroeste de irán 54.13%³⁹⁻⁴⁰ y en Japón con un 10.3%⁴¹. En América Latina, en Colombia con un 45.8%⁴². En mujeres con aborto, las prevalencias son un poco más elevadas y mayores al 50%^{22-26,43-55}. En la población de Goiânia en Brasil, la prevalencia en mujeres con aborto fue de 51.4%⁵³. En Qena Egipto del 46.1%⁵⁴ y en India del 51.9%³⁰. En México se ha reportado una seropositividad del 18.2%, 19% y 30%, en mujeres con partos anormales ó abortos y de estas el 34.5% de sus hijos han sido infectados al nacer^{4,55-57}; sin embargo, en investigaciones más recientes en el estado de Yucatán se reportaron cifras del 44.8% en aborto habitual y 49.01% en aborto espontáneo⁵⁸ en este mismo estado, en el 2013 se demostró un aumento de la prevalencia del 55%⁵⁹. En un estudio realizado en 350 mujeres con embarazo de alto riesgo en el estado de Jalisco se observó una seropositividad del 34.9% para IgG y 20.7% para IgM, en un grupo de 105 mujeres con aborto habitual se encontró el 44.9% con IgG y el 33.3% con IgM⁶⁰.

14.3 Seroconversión durante el embarazo

La seroconversión de IgM a IgG durante el embarazo ha sido estudiada en diferentes grupos, existiendo una variación por trimestre de gestación, donde se han determinado anticuerpos contra *T. gondii* antes y durante el embarazo. Se demostró que la mayoría de las seroconversiones suceden en el segundo y tercer trimestre de gestación, lo que puede disminuir la severidad del daño. Estos valores varían dependiendo del área geográfica²⁹⁻³¹. En Suecia de 51 /1000⁶¹, en Brazilia 2005 del 0.64%⁶² y en Paraná Brasil del 1.1%⁶³. En la Tabla 3, se pueden observar diversas prevalencias en mujeres embarazadas de América, Europa, Asia y Medio Oriente.

Tabla 3 Prevalencia de mujeres embarazadas de diferentes países del mundo. Positivos (+), Anticuerpos anti-*Toxoplasma* IgG (IgG) e IgM (IgM), Embarazo de alto riesgo (EAR), No realizado o no especificado (ns), IgG baja avidez (BA).

| PAÍS O CIUDAD | AUTOR | AÑO | N | MÉTODO | N IgM+ | IgM(%) | N IgG + | IgG (%) | Sero-conversion |
|----------------------------|-----------------------|------|--------|---------|--------|---------|---------|----------|-----------------|
| AMERICA | | | | | | | | | |
| ARGENTINA, Mar de Plata | Ianiro JL | 1997 | 3,514 | IFI | ns | ns | 1,173 | 33.4 | |
| BRASIL, Cascavel, Parana | Mioranza SL | 2008 | 334 | IFI | ns | ns | 181 | 54.2 | |
| BRASIL, Parana | Bittencourt LHFB, | 2011 | 422 | ELISA | ns | 3 | 255 | 60.6 | |
| BRASIL, Brasilia | Nóbrega OT | 2005 | 2636 | ELISA | 17 | 0.64 | NS | 0.00 | 0.57/1000 |
| BOLIVIA | Guzmán A | 2009 | 213 | IFI | ns | ns | 150 | 70.40 | |
| CANADA | | | | | | | | | |
| | Tanner | 1987 | | ELISA | | | | 40 | |
| CALI, COLOMBIA | Rosso F | 2008 | 955 | MEIA | 27 | 2.89 | 461 | 48.3 | |
| COLOMBIA, Cúcuta | Cárdenas D 2015 | 2015 | 167 | ELISA | 34.00 | 0.34 | 52 | 31 | |
| CUBA, La Habana | Martínez R | 1994 | 372 | ELISA | ns | ns | 264 | 71 | |
| CUBA | González T | 1992 | | ELISA | | | | 70.9 | |
| CEBA, La Habana | Sánchez-Gutiérrez A | 2003 | 596 | ELISA | ns | ns | 190 | 63.1 | |
| CUBA, Pinar del Rio | Sánchez-Gutiérrez A | 2003 | 1210 | ELISA | ns | ns | 290 | 66.5 | |
| MÉXICO, JALISCO | Galván-Ramírez ML | 1995 | 350 | ELISA | 76 | 20.7EAR | 122 | 34.7 | |
| MÉXICO, DURANGO | Alvarado-Esquivel C. | 2006 | 343 | ELISA | 0 | 0 | 22 | 6.1 | |
| EUROPA | | | | | | | | | |
| ALEMANIA, Berlin | Liesefeld O, | 2001 | 125 | ISAGA | ns | ns | 16 | 18.8 BA | |
| DINAMARCA | Lebech M | 1995 | 5402 | ELISA | 36 | 0.65 | 1480 | 27.40 | |
| ESPAÑA, Barcelona | Muñoz C | 2004 | 16,362 | ELISA | 106 | 0.64 | 4,687 | 28.6 | 1.02/1000 |
| GRECIA | Decavalas G | 1990 | 270 | ELISA | 0 | 0 | 141 | 52.30 | |
| ITALIA, Scilia | Puccio G | 2014 | 846 | ELISA | 3 | 0.35 | 156 | 17.9 | |
| NORUEGA | Pal A | 1998 | 35,940 | ELISA | 3907 | 10.9 | ns | NS | 0.147 |
| REINO UNIDOS, Londres | Flatt A | 2013 | 2610 | ELISA | ns | ns | 449 | 17.2 | |
| REINO UNIDO | Gras L | 2003 | 446 | ISAGA | 120 | 27.1 | ns | NS | |
| POLONIA, LODZ | Nowakowaska D | 2014 | 4916 | ELISA | 240 | 4.9 | 2030 | 41.3 | 0.7 |
| TURQUIA, AYDIN | Ertug S | 2005 | 770 | ELISA | 0 | 0 | 388 | 50.38 | |
| ASIA Y MED. ORIENTE | | | | | | | | | |
| INDIA Visakhapatnam, | Suryamani Chintapalli | 2013 | 80 | ELISA | 16 | 20 | 36 | 45 | |
| INDIA, ANDHRA PRADESH | Das Sakar M | 2012 | 105 | ELISA | 24.25 | 23.1EAR | 29 | 27.6 EAR | |
| IRAN, NOROESTE | Babaie J | 2013 | 419 | ELISA | 79 | 18.8 | 144 | 34.4 | |
| IRAN, ESTE ASERBAYAN | Mehrangiz Rajaii | 2013 | 1653 | ELISA | ns | ns | 898 | 54.3 | |
| JAPON | Sakikawa M | 2011 | 4466 | A-LATEX | ns | ns | 469 | 10.5 | 0.1 |
| KOREA | Kyun Han | 2008 | 351 | ELISA | ns | ns | 14 | 4 | |
| MADAGASCAR | Lelong B | 1990 | 599 | ELISA | ns | ns | 500 | 83.5 | |
| MYANMAR | Hemah Andiappan, | 2014 | 215 | ELISA | 1 | 0.47 | 65 | 30.23 | |
| MALASIA | Hemah Andiappan | 2014 | 219 | ELISA | 6 | 2.74 | 87 | 39.7 | |
| NEPAL | Shiba Kumar Rai | 1998 | 345 | ELISA | 3 | 1.7 | 191 | 55.4 | |
| NEPAL, Kaski | Suresh J | 2014 | 176 | ELISA | 10 | 5.7 | 89 | 50.6 | |
| QATAR | Marawan M | 2010 | 1,857 | ELISA | 76 | 4.1 | 858 | 54.13 | |
| SAUDI ARABIA | Mohamed K | 2016 | 195 | ELISA | 12 | 6.2 | 39 | 20 | |
| TAHLANDIA | Nissapatorn V | 2011 | 640 | ELISA | 39 | 6.1 | 181 | 28.3 | |

14.4 Personas que conviven con gatos

La presencia de gatos domésticos ha estado relacionada con un aumento en la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma*, debido a que éste es el hospedero definitivo, cuando este se encuentra infectado por *T. gondii*, constituye una fuente de infección al humano y a animales de granja por la excreción masiva de ooquistes en heces⁶³. Frenkel (1975) determinó en 150 muestras de Costa Rica, una prevalencia en gatos del 38%⁶⁴, en 1982 en Noruega se demostró una prevalencia del 50% y ese mismo año en Estados Unidos, Ladgies (1982) demostró el 31%. En 1990 en EUA Digiacomio reportó el 36%⁶⁵, en Cuba 1991 Martínez informó el 55.9% de seropositividad en convivientes con gatos⁶⁶ y en ese mismo país en 1994 el 86.6% de gestantes de la Habana que convivía con gatos fueron positivas con un riesgo relativo de 6.6%⁶⁷.

En el estado de Jalisco en 1995, personas que convivían con gatos se demostró el 64.0% de seropositividad¹⁹, en Río cuatro Córdoba Argentina de 249 estudiados, en 126 que convivían con gatos tuvieron una prevalencia de 60.3%⁶⁸, en Venezuela el 40.7% de convivientes con gatos fueron positivos a *T. gondii*⁷⁰. Estudios más recientes siguen considerando de vital importancia las implicaciones de la zoonosis en la salud pública, como la convivencia con gatos en la toxoplasmosis humana⁷¹.

14.5 Inmunocomprometidos

Anteriormente la toxoplasmosis cerebral fue considerada como un desorden relativamente raro, con el surgimiento del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) en 1981, la prevalencia de toxoplasmosis aumentó considerablemente. Actualmente en muchas instituciones, la toxoplasmosis cerebral es la mayor causa de abscesos en el cerebro y la encefalitis toxoplásmica, como la principal causa de infección en SNC en pacientes con SIDA y generalmente es consecuencia de la reactivación de una infección latente previa en el cerebro y resulta del deterioro progresivo del sistema inmune; sin embargo, la patogénesis de ésta reactivación se atribuye a la disminución de la respuesta inmune celular hacia el parásito⁷². La incidencia de toxoplasmosis en una población infectada con HIV, depende principalmente de la prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma* en la población de la región que habitan⁷³. La seropositividad en pacientes HIV+ inicialmente tenía un rango del 10% al 45% en Estados Unidos de los cuales se ha estimado que del 20% al 47% de estos pacientes, desarrollarán subsecuentemente encefalitis toxoplásmica, datos similares reportados en Irán con 25-50% de prevalencia de toxoplasmosis en pacientes con SIDA y encefalitis en el 50.1% de dicha población⁷⁴. En África, las prevalencias en estos pacientes (SIDA) son las más altas⁷⁴⁻⁷⁸, como ocurre en Etiopía con prevalencias del 59.8% al 93.3%^{74,76}, en Zambia y Uganda fue reportando una seroprevalencia con 34.0% y 40.0% respectivamente⁷⁸ y en el Congo de 63.3%⁷⁹. En Brasil las prevalencias oscilan entre 60%, y en el 90% de los pacientes que mueren por SIDA, el principal patógeno que daña SNC es *Toxoplasma*⁸⁰. En Irán se ha reportado un amplio rango de prevalencias en pacientes con HIV/AIDS que van del 18.23% al 66%⁷³. En Francia, Turquía y Brasil se han reportado seroprevalencias hasta de un 90%⁸⁰. En México en 1995 se realizó un estudio en el cual se encontró el 50% de seropositividad⁸¹. Al analizar los datos anteriores se considera al igual que en otras poblaciones que las seroprevalencias, en este tipo de pacientes, está relacionada con la prevalencia de la parasitosis en la población general de cada zona geográfica y que aumenta con la edad de los individuos. Otras poblaciones de alto riesgo son los pacientes con cáncer, los pacientes con transfusiones y con trasplante de órganos⁸².

14.6 Agradecimientos

A CONACYT, COECYT-Jal y Programa de Mejoramiento para miembros del Sistema Nacional de Investigadores (PRO-SNI), por los diferentes apoyos recibidos en distintos estudios que se presentan en este capítulo.

14.7 Referencias

1. Swarzber JE, Remington J., Transmission of *Toxoplasma*. *Am. J. Dis. Child.* 1975, 129:777-779.
2. Velasco O., Salvatierra J., Valdespino JL., Sedano AM., Galindo VS., Llausas A., Tapia CR., Gutiérrez G., Sepúlveda J., Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. *Sal. Pub. Mex.* 1991, 34:222-229.
3. Verhofsted C., Van Renterghem, Plum J., Comparison Of Six Commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assays For Detecting IgM Antibodies Against *Toxoplasma gondii* . *J. Clin. Pathol.* 1989, 42:1285-1290.
4. Varela G., Roch E., Zavala J., Estudio sobre toxoplasmosis en México. *Sal. Pub. Mex.* 1961, 3:451-454.
5. Wong SY., Remington JS., Biology of *Toxoplasma gondii* . *AIDS.* 1993, 7:299-316.
6. Feldman HA., Epidemiology of *Toxoplasma* Infections. *Epidemiology.* 1982, 4:204-214.
7. Jones JL., Kruszon-Moran D., Wilson M., *Toxoplasma gondii* Prevalence, United States. *Emerg. Infect. Dis. Serial On The Internet.* 2007 [Http://Www.Cdc.Gov/Eid/Content/13/4/656.Htm](http://Www.Cdc.Gov/Eid/Content/13/4/656.Htm)
8. Xiao Y., Yin J., Jiang N., Xiang M., Hao L., Lu H., Chen Q. Seroepidemiology of Human *Toxoplasma gondii* Infection In China. *Bmc. Infect. Dis.* 2010, 10: 4. Doi: 10.1186/1471-2334-10-4.
9. Brkić S., Gajski G., Bogavac M., Marić D., Turkulov V., Tomić S., Seroprevalence of Toxoplasmosis In Vojvodinasrp. *Arch. Celok. Lek.* 2010, 138: 333-336.
10. Diza E., Frantzidou F., Souliou E., Arvanitidou M., Gioula G., Antoniadis A., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Northern Greece during the last 20 years. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, 11: 719-723.
11. Hofhuis A., Van Pelt W., Van Duynhoven Yt., Nijhuis CDd, Mollema L, Van Der Klis Fr, Havelaar Ah, Kortbeek Lm., Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG Antibodies In The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. *Epidemiol. Infect.* 2011, 139;4:530-538. Doi: 10.1017/S0950268810001044.
12. Biagi F., Datos Actuales Sobre Biología Y Epidemiología De La Toxoplasmosis. *Gaceta Méd. Méx.* 1976, 111:165-167.
13. Desmots G., Courver S., Peupion JC., Un diagnostic precoce de la Toxoplamosé Aligue. *Presse Medic* 1972,1:339-341.
14. Díaz O., Vaca M., Evolución y epidemiología de la Toxoplasmosis. *Rev. Mex. Infect.* 1985, 6:146-152.
15. Roch E., Compendio de Toxoplasmosis. Edit.Patria 1971,17.

16. Fan CK., Hung CC., Su KE., Chiou HY., Gil V., Ferreira MDA C., Tseng LF., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among inhabitants in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007, 101:1157-1158.
17. Monsalve-Castillo FM., Costa-León LA., Castellano ME., Suárez A., Atencio RJ., Prevalence Of Infectious Agents In Indigenous Women Of Childbearing Age In Venezuela. *Biomedica.* 2012, 32(4):519-526. Doi: 10.1590/S0120-41572012000400007.
18. Bahia-Oliveira L. M. G., Jones JL., Azevedo-Silva J., Alves CC., Oréface F., Addiss DG., Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9: 55-62.
19. Galván Ramírez ML., Sánchez Vargas G., Vielma Sandoval M., Soto Mancilla JL., Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999, 32:483-488.
20. Caballero-Ortega H., Uribe-Salas FJ., Conde-Glez CJ., Cedillo-Pelaez C., Vargas-Villavicencio JA., Luna-Pastén H., Cañedo-Solares I., Ortiz-Alegria LB., Correa D., Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012, 106:653-659.
21. Galván-Ramírez M. DE L., Sánchez-Orozco LV., Rodríguez LR., Rodríguez S., Roig-Melo E., Troyo Sanromán R., Chiquete E., Armendáriz-Borunda J., Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in drivers involved in road traffic accidents in the metropolitan area of Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Parasit. Vectors.* 2013, 11: 6:294. Doi: 10.1186/1756-3305-6-294.
22. Alvarado-Esquivel C., Estrada-Martínez S., Pizarro-Villalobos H., Arce-Quñones M., Liesnfeld O., Dubey JP., Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in general population in a northern Mexican city. *J. Parasitol.* 2011,97:40-43. doi: 10.1645/GE-2612.1.
23. Abdel-Hafez SK., Shbeed I., Ismail NS., Abdel-Raham F., Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* in habitual aborting women and other adults from North. Jordan. *Folia Phraha Parasitol.* 1986, 33:7-13.
24. Al-Meshari AA., Chowdhury M.N.H., Chattopadhyay SK., DE SILVA SK. Screening for toxoplasmosis in pregnancy. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 1989, 29:39-45.
25. Biagi F., Islas PM., González C., Frecuencia de la toxoplasmosis en relación al parto. *Gaceta Med. Mex.* 1974,108:127-130.
26. Frenkel JK. *Toxoplasma* in around Us. *Bioscience.* 1973, 23:343-352.
27. Nissapatorn V., Suwanrath C., Sawangjaroen N., Ling LY., Chandeying V., Toxoplasmosis-serological evidence and associated risk factors among pregnant women in southern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011, 85:243-247. Doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0633.

28. Andiappan H., Nissapatorn V., Sawangjaroen N., Nyunt M., Lau Y., Khaing S., Aye K., Mon N., Kumar T., Onichandran S., Bin Mat Adenan N. Comparative study on *Toxoplasma* infection between Malaysian and Myanmar pregnant women. *Parasit. Vectors.* 2014,7:564. doi:10.1186/s13071-014-0564-9.
29. Ertug S., Okyay P., Turkmen M., Yuksel H., Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma* infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. *BMC. Public. Health.* 2005, 5: 66. doi: 10.1186/1471-2458-5-66
30. Sarkar MD., Anuradha B., Sharma N., Roy RN., Seropositivity of Toxoplasmosis in Antenatal Women with Bad Obstetric History in a Tertiary-care Hospital of Andhra Pradesh, India. *J. Health, Pop. Nutr.* 2012, 30:87-92.
31. Chintapalli S., Padmaja IJ., Seroprevalence of toxoplasmosis in antenatal women with bad obstetric history. *Trop. Parasitol.* 2013, 3; 1:62-66. Doi: 10.4103/2229-5070.113915.
32. Jaiswal S., Pokhrel T., Sharma S., Bhat SR., Yadav DK., Koirala B., Seropositivity Rates of Toxoplasmosis and Syphilis in Pregnant Women Visiting Western Regional Hospital, Nepal. *Int. J. Health Sci. Res.* 2014, 4; 9: 230-242.
33. Ramos JM., Milla A., Rodríguez JC., Padilla S., Masiá M., Gutiérrez F., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among immigrant and native pregnant women in Eastern Spain. *Parasitol. Res.* 2011,109:1447-1452. Doi: 10.1007/s00436-011-2393-5. Epub 2011 May 4.
34. Puccio G., Cajozzo C., Canduscio LA., Cino L., Romano A., Schimmenti MG., Giuffrè M., Corsello G., Epidemiology of *Toxoplasma* and CMV serology and of GBS colonization in pregnancy and neonatal outcome in a Sicilian population. *Ital. J. Pediatr.* 2014, 40:23. Doi: 10.1186/1824-7288-40-23.
35. Flatt A., Shetty N., Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis among antenatal women in London: a re-examination of risk in an ethnically diverse population. *Eur. J. Publ. Health.* 2013, 23:648-52. Doi: 10.1093/eurpub/cks075.
36. Nowakowska D., Stray-Pedersen B., Śpiewak E., Sobala W., Małafiej E., Wilczyński J., Prevalence and estimated incidence of *Toxoplasma* infection among pregnant women in Poland: a decreasing trend in the younger population. *Clin. Microbial. Infect.* 2006, 12: 913-917.
37. Aqeely H., El-Gayar EK., Perveen Khan D., Najmi A., Alvi A., Bani I., Mahfouz MS., Abdalla SE., Elhassan IM., Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* amongst pregnant Women in Jazan Province, Saudi Arabia. *J. Trop. Med.* 2014,913-950. Doi: 10.1155/2014/913950.
38. Nijem KI., Al-Amleh S., Seroprevalence and associated risk factors of toxoplasmosis in pregnant women in Hebron district, Palestine. *East Mediterr. Health J.* 2009, 15:1278-1284.
39. Rajaii M., Pourhassan A., Asle-Rahnamaie-Akbari N., Aghebati L., Xie JI., Goldust M., Naghavi-Behzad M., Seroepidemiology of toxoplasmosis in childbearing women of Northwest Iran. *Infez. Med.* 2013, 21:194-200.

40. Babaie Jalal ET AL., "Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection among Pregnant Women in Northeast Iran. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, 20:1771-1773. PMC.
41. Sakikawa M., Noda S., Hanaoka M., Nakayama H., Hojo S., Kakinoki S., Nakata M., Yasuda T., Ikenoue T., Kojima T., Anti-*Toxoplasma* antibody prevalence, primary infection rate, and risk factors in a study of toxoplasmosis in 4,466 pregnant women in Japan. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012, 19:365-367. Doi: 10.1128/CVI.05486-11.
42. Rosso F., Les JT., Agudelo A., Villalobos C., Chaves JA., Tunubala GA., Montoya JG., Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008, 78: 504-508.
43. Daffos F., Forestier F., Capella P., Thulliez P., Aufrant CH., Valenti D., Cox W., Prenatal Management of 746 at risk for congenital toxoplasmosis. *New Engl. J. Med.* 1988, 318:271-275.
44. Decavalas G., Papapetropoulou M., Ginnoulaki E., Tzigounis V., Kondakis XG., Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in gravidas and recently aborted women an study of risk factors. *Eur. J. Epidemiol.* 1990, 6: 223-226.
45. Desmonts G., Courver S., Toxoplasmosis in Pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull. NY. Anals. Med.* 1974, 50:146-159.
46. Forsegren M., Gille E., Ljungstrom I., Nokes DJ., *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women in Stockholm in 1969,1979, and 1987. *Lancet.* 1991, 337:1413-1413.
47. Langer H., Repeat congenital infection with *Toxoplasma gondii* . *Obst. Gynecol.* 1965, 21:318-329.
48. Meylan J., Toxoplasmosis as a cause of repeated abortion. Toxoplasmosis Hans. Huber. Publisher. 1971. Viena.
49. Nakib AW., Ibrahim ME., Hathout H. Serepidemiology of viral and *Toxoplasma* infections during pregnancy among arab women of child bearing age in Kuwait. *J. Epidemiol.* 1983, 12:220-223.
50. Chintana-T. Pattern of antibodies in toxoplasmosis of pregnant women and their children in Thailand. *South. Asian J. Trop. Med. Pub. Health.* 1991, 22:107-110.
51. Golledge-CL., Beaman-MH., Toxoplasmosis and Pregnancy. Editorial. Austrian NZ. *J. Obst. Gynecol.* 1990, 30:32-33.
52. Hirt JDI., Bartolo L., Durlachr, Fritsches C., Kaufer F., Prevalencia e Incidencia de la toxoplasmosis en una cohorte de embarazadas. *Parasitología al Dia* 1995,19:409.
53. Barbaresco Almeida A., Da Costa T., Boaventura Avelar J., Rodrigues I., Do Amaral WN., De Castro A. Vertical transmission from abortive material and blood with emphasis on *Toxoplasma gondii* . *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2014, 36:17-22 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032014000100005>

54. Tammam AE., Haridy MA., Abdellah AH., Ahmed SR., Fayed HM., Alsammani MA., Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in women with first trimester spontaneous miscarriage in qena governorate, Egypt. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013, 7; 12:2870-3. Doi: 10.7860/JCDR/2013/6480.3780.
55. Molina PC., Ontiveros C., Uribe R., Investigación De Anticuerpos Contra El *Toxoplasma gondii* Por Medio De La Inmunofluorescencia En Mujeres Con Embarazos Anormales. *Sal. Pub. Mex.* 1971, 31:27-39.
56. Roch Ubiria E. La Toxoplasmosis Congénita, Problema Médico-Social. *Sal. Pub. Mex.* 1976, 18:871-874.
57. Roch E., Bravo BM., Incidencia de Toxoplasmosis congénita en una muestra de 2,186 recién nacidos vivos en la ciudad de México. *Rev. Inst. Sal. Pub. Enf. Trop. Mex.* 1962, 22:221-227.
58. Zavala VJ., Guzmán ME., Becerra PM., Et Al. Toxoplasmosis y aborto en pacientes del Hospital O'Horan de Mérida Yucatán. *Sal. Pub. Mex.* 1989, 31,664-68.
59. Vado-Solís IA., Suárez-Solís Víctor, Jiménez-Delgadillo Bertha, Zavala-Velázquez Jorge E., Segura-Correa José C., *Toxoplasma gondii* presence in women with spontaneous abortion in Yucatan, Mexico. *J. Parasitol.* 2013, 99:383-385.
60. Galvan R. ML., Mancilla S. JI., Medina Peres RP. Incidence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1995, 28:333-337.
61. Evengård B., Petersson K., Engman ML., Wiklund S., Ivarsson, SA., Teär-Fahnehjelm K., Malm G. Low incidence of *Toxoplasma* infection during pregnancy and in newborns in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 2001, 127:121-127.
62. Nóbrega Otávio de Tolêdo, Margô Gomes de Oliveira Karnikowski. An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005, 38:358-360.
63. Dubey JP. Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994, 205:1593-1598.
64. Frenkel JK., Ruiz A., Chinchilla M., Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975, 24:439-443.
65. Digiacomo RF., Harris NV., Huber NL., et al. Animal exposures and antibodies to *Toxoplasma gondii* in a university population. *Am. J. Epidemiol.* 1990, 4:129-133.
66. Martinez R., Machin Sanchez R., Fachado CA., Pividal J., Cruz R., Suarez M. Algunos resultados sobre una encuesta de *Toxoplasma*. *Inv. Clin.* 1991, 32:13-26.
67. Sanchez RM., Gordo RB., Amador EA., Berrio LA. Prevalencia de infección toxoplasmica en gestantes de la provincia La Habana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1994, 36:445-450.

68. Chiaretta AE., Sbaffo AM., Cristofolini AL., Molina MD. Estudio seroepidemiológico de la toxoplasmosis en niños de áreas de riesgo de la ciudad de Río Cuarto: Córdoba. Argentina. *Parasitol. Latinoamer.* 2003, 58: 112-117.
70. Díaz-Suárez O., Parra AM., Araujo-Fernández M. Seroepidemiología de la toxoplasmosis en una comunidad marginal del Municipio Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. *Invest. Clin.* 2001, 42:107-21.
71. Dabritz HA., Conrad PA. Cats and *Toxoplasma*: Implications for Public Health. *Zoon. Publ. Health.* 2010, 57:34–52. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01273.x
72. Luft B., Remington JS., AIDS, Commentary: toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1992, 15(2):211-222.
73. Ahmadpour E., Daryani A., Sharif M., Sarvi S., Aarabi M., Mizani A., Rahimi MT., Shokri A., Toxoplasmosis in immunocompromised patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014, 15:1503-10. Doi: 10.3855/jidc.4796.
74. Woldemichael T., Fontanet AL., Sahlu T., Gilis H., Messele T., De Wuit TF., Yenenh H., Coutinho RA., Van Gool T., Evaluation of the Eiken latex agglutination test for anti-*Toxoplasma* antibodies and seroprevalence of *Toxoplasma* infection among factory workers in Addis Ababa, Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998, 92:401-403.
75. Kudakwashe M., Yesuf, KM., Application of Binary Logistic Regression in Assessing Risk Factors Affecting the Prevalence of Toxoplasmosis. *Am. J. Appl. Math. Stat.* 2014, 2:357-363.
76. Tadesse L, Tafesse F, Hamamy H. Communities and community genetics in Ethiopia. *Pan. Afr. Med. J.* 2014, 18:115. doi:10.11604/pamj.2014.18.115.3172.
77. Zumla A., Savva D., Wheeler RB., Hiera SK., Luo NP., Kaleebu P., Semala SK., Honhson JD., Holliman R., *Toxoplasma* serology in Zambian and Ugandan patients infected with the human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991, 85:227-229.
78. Makuwa M., Loemba H., Ngouonimba J., Beuzit Y., Louis JP., Livrozet JM., Toxoplasmosis and cytomegalovirus serology in patients infected with HIV in Congo. *Santé* 1994, 4:15-19.
79. Amato Neto V., Braz LM., Jamra LM., Higaki Y., Pasternak J., Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva of patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo* 1990, 45:171-172.
80. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012, 25:264-296. doi:10.1128/CMR.05013-11.
81. Galvan R. ML., Valdez AV., Vargas GG., Jimez GO., Garcia CC., Vielma SM., Prevalence of IgG and IgM anti-*Toxoplasma* antibodies in patients with HIV and acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 1997, 30:465-467.

82. Galván-Ramírez Ma. de la L., Rincón Sánchez AR., Bernal Redondo RM., Chapter Diagnostic of opportunistic parasites in liver transplantation. In Bruyn, Olivier de Peeters, Stephane. *Parasitol. Res. Trends* New York, Nova Science Publishers, c2010.

Apéndice A. Consejo Editor ECORFAN

ANGELES-CASTRO, Gerardo. PhD.
Instituto Politécnico Nacional, México

MANRIQUEZ-CAMPOS, Irma. PhD.
Universidad Nacional Autónoma de México, México

PERALTA-FERRIZ, Cecilia. PhD.
Washington University, EUA

PALACIO, Juan. PhD.
University of St. Gallen, Suiza

DAVID-FELDMAN, German. PhD.
Johann Wolfgang Goethe Universität, Alemania

GUZMÁN-SALA, Andrés. PhD.
Université de Perpignan, Francia

VARGAS-HERNÁNDEZ, José. PhD.
Keele University, Inglaterra

AZIZ-POSWAL, Bilal. PhD.
University of the Punjab, Pakistan

VILLASANTE, Sebastian. PhD.
Royal Swedish Academy of Sciences, Suecia

PIRES-FERREIRA-MARÃO, José. PhD.
Federal University of Maranhão, Brasil

RAÚL-CHAPARRO, Germán. PhD.
Universidad Central, Colombia

QUINTANILLA-CÓNDOR, Cerapio. PhD.
Universidad Nacional de Huancavelica, Perú

GARCÍA-ESPINOSA, Cecilia. PhD.
Universidad Península de Santa Elena, Ecuador

ALVAREZ-ECHEVERRÍA, Francisco. PhD.
University José Matías Delgado, El Salvador

GUZMÁN-HURTADO, Juan. PhD.
Universidad Real y Pontifica de San Francisco Xavier, Bolivia

NUÑEZ-SELLES, Alberto. PhD.
Universidad Evangelica Nacional, Republica Dominicana

ESCOBEDO-BONILLA, Cesar Marcial. PhD.
Universidad de Gante, Belgica

ARMADO-MATUTE, Arnaldo José. PhD.
Universidad de Carabobo, Venezuela

GALICIA-PALACIOS, Alexander. PhD.
Instituto Politécnico Nacional, México

NAVARRO-FRÓMETA, Enrique. PhD.
Instituto Azerbaidzhan de Petróleo y Química Azizbekov, Rusia

ALVAREZ-ECHEVERRÍA, Francisco. PhD.
University José Matías Delgado, El Salvador

BELTRÁN-MORALES, Luis Felipe. PhD.
Universidad de Concepción, Chile, Chile

TUTOR-SÁNCHEZ, Joaquín. PhD.
Universidad de la Habana, Cuba.

ARAUJO-BURGOS, Tania. PhD.
Universita Degli Studi Di Napoli Federico II, Italia

HIRA, Anil. PhD.
Simon Fraser University, Canada

MIRANDA-GARCÍA, Marta. PhD.
Universidad Complutense de Madrid, España

LUFUNDISU- BADENGO, Patrick. BsC.
Institut Superieur de Techniques Appliquee, Republica Democratica del Congo

DUARTE, Oscar Mauricio.
Higher Institute of Economics "Karl Marx" in Sofia, Bulgaria

OCAÑA, Ely. MsC.
Universidad de San Carlos de Guatemala, Republica de Guatemala

CANTEROS, Cristina. PhD.
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Argentina

NARVÁEZ-SOLÍS, Concepción. MsC.
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Republica de Nicaragua

ROJAS-BUSTAMANTE, Nataly. BsC.
Universidad de Medellín, Colombia

CANDIDO-GONZALES, Bogarin. BsC.
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

GANDICA-DE ROA, Elizabeth. PhD.
Universidad Católica del Uruguay, Uruguay

BANERJEE, Bidisha. MsC.
Amity University, India

Apéndice B. Comité Arbitral ECORFAN

HERNANDEZ-MARTÍNEZ, Rufina. PhD.
University of California, EUA

DE AZEVEDO-JUNIOR, Wladimir Colman. PhD.
Federal University of Mato Grosso, Brasil

VARGAS-DELGADO, Oscar. PhD.
Universidad Centroamericana, Nicaragua

MARTINEZ-BRAVO, Oscar Mario. PhD.
Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica-UNAM

GONZALEZ-TORRIVILLA, Cesar Castor. PhD.
Universidad Central de Venezuela Venezuela

TUTOR-SÁNCHEZ, Joaquín. PhD.
Universidad de la Habana

YAN-TSAI, Jeng. PhD.
Tampkang University, Taiwan.

POSADA-GOMEZ, Rubén. PhD.
Institut National Polytechnique de la Lorraine, Francia

SOTERO-SOLIS, Victor Erasmo. PhD.
Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Perú

GONZÁLEZ-IBARRA, Miguel Rodrigo. PhD.
Universidad Nacional Autónoma de México, México

MONTERO-PANTOJA, Carlos. PhD.
Universidad de Valladolid, España

RAMIREZ-MARTINEZ, Ivonne. PhD.
Universidad Andina Simón Bolívar, Bolivia

ARAUJO-BURGOS, Tania. PhD.
Università Degli Studi Di Napoli Federico II, Italia

ALVAREZ-ECHEVERRÍA, Francisco. PhD.
Universidad José Matías Delgado, El Salvador

SORIA-FREIRE, Vladimir. PhD.
Universidad de Guayaquil, Ecuador

