



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**Efecto de la sensibilización de *Toxoplasma gondii* por anticuerpos  
de clase IgG1 sobre su internalización a células endoteliales  
humanas**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud**

**PRESENTA**

**M. en C. Irma Cañedo Solares**

**Comité tutorial:**

**Directoras de tesis**

**Dra. María Dolores Correa Beltrán**

**Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz**

**Asesor**

**Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez**

*Ciudad de México, enero, 2016*

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio “PFP-20-93”.

## Acta

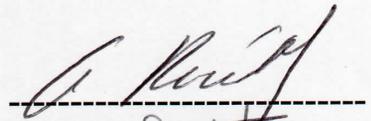
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

**La M en C Irma Cañedo Solares**

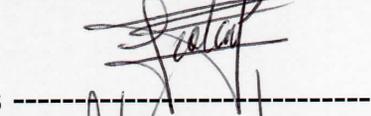
el día 26 de enero del año 2017

### Miembros del Jurado

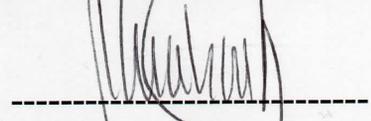
Presidenta Dra. Ortiz Muñiz Alda Rocío



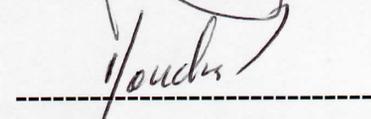
Secretaria Dra. Correa Beltrán María Dolores



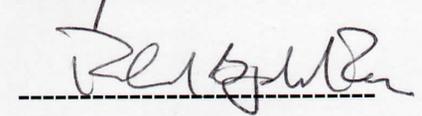
Vocal Dr. Escobar Gutiérrez Alejandro



Vocal Dr. Mondragón Flores Ricardo



Vocal Dr. Bojalil Parra Rafael



## ***Dedicatorias***

### *A mi esposo*

Héctor, por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo, por su amor y ser un gran compañero en mi vida.

### *A mis hijas*

Ixel e Irma Alejandra, por su gran amor y comprensión, paciencia. Espero les sirva de ejemplo para que no claudiquen en los objetivos de sus vidas.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Experimental de la subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la Dirección de la Dra. María Dolores Correa Beltrán.

El trabajo fue parcialmente apoyado por el proyecto de CONACyT con el número de registro 139721

También fue apoyado por Instituto Nacional de Pediatría con recursos fiscales durante los años 2012 y 2013, proyecto 060/2011.

## ***Agradecimientos***

### **A la Dra. María Dolores Correa**

Gracias por la confianza que ha depositado en mí. Gracias porque nunca escatimó esfuerzo para ayudarme. Gracias por sus consejos y enseñanzas.

### **A la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz**

Gracias por sus recomendaciones y valiosos comentarios para la culminación de este trabajo.

**Al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez**, por su motivación y ser parte de mi comité tutorial y sus acertadas recomendaciones.

### **A mis sinodales**

Dr. Ricardo Mondragón Flores, Dr. Rafael Bojalil Parra. Gracias por aceptar ser sinodales de este trabajo y por las críticas, recomendaciones y valiosos comentarios para la culminación de este trabajo.

## **Al gran equipo de trabajo**

Luz Belinda Ortiz Alegría, Montserrat Calzada Ruiz, Héctor Luna Pasten, Ana Laura Castañeda Huitrón, Rafael López Reboseño. Por ser parte fundamental en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Araceli Páez Arenas y Dr. Felipe A. Massó Rojas. del Instituto Nacional de Cardiología por sus enseñanzas y apoyo.

Al Dr. Felipe Vadillo Ortega y Dra. Marisol Castillo Castrejón de la Unidad de Vinculación Facultad de Medicina, UNAM INMEGEN. Al Dr. Guadalupe Santiago Ramos del Hospital Belisario Domínguez. Por su gran apoyo en proporcionar las muestras biológicas para la realizar una parte importante de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Inmunología Experimental por sus críticas constructivas y sugerencias para mejorar este trabajo y por los buenos momentos que hemos pasado.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
<b><i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	<b>5</b>
Clasificación taxonómica de <i>Toxoplasma gondii</i> y variabilidad genética .....	6
Descripción de los estadios de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
La infección adquirida.....	12
La respuesta inmune en adultos inmunocompetentes contra <i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
<b><i>El embarazo y la placenta</i></b> .....	<b>19</b>
Transferencia de anticuerpos en el embarazo mediada por el FcRn .....	24
Transcitosis de la IgG por el FcRn en células endoteliales .....	27
<b><i>La infección congénita por Toxoplasma gondii</i></b> .....	<b>29</b>
La respuesta inmune en la infección congénita por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	32
<b><i>Mecanismos de internalización de Toxoplasma gondii a la célula hospedera</i></b> .....	<b>34</b>
<b><i>Endocitosis y transcitosis</i></b> .....	<b>37</b>
<b><i>Internalización de Toxoplasma gondii por endocitosis e invasión vacuolar del fagosoma</i></b> .....	<b>41</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>42</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>44</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b><i>Objetivo General</i></b> .....	<b>45</b>
<b><i>Objetivos específicos</i></b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
<b><i>Tipo de estudio</i></b> .....	<b>45</b>
<b><i>Diseño general del estudio</i></b> .....	<b>45</b>
<b><i>Criterios de selección de las muestras de cordón umbilical</i></b> .....	<b>46</b>
Criterios de inclusión .....	46
<b><i>Aspectos éticos</i></b> .....	<b>47</b>
<b><i>Métodos de laboratorio</i></b> .....	<b>48</b>
Aislamiento y cultivos primarios de células endoteliales venosas de cordón umbilical humano (HUVECs) .....	48
Cultivo de la línea semi-inmortal de células endoteliales de microvasculatura HMEC-1 .....	50
Obtención de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	51
Expresión del RNA mensajero del FcRn en las células endoteliales HUVEC y HMEC-1 .....	53
Expresión de la proteína del FcRn en células HMEC- 1 y HUVECS.....	55
Sensibilización de las cepas RH y ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> con anticuerpos IgG1 anti- <i>Toxoplasma</i> .....	57
Cinética de invasión de células endoteliales HUVEC y HMEC-1 por las cepas RH y ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	58
Invasión de células HUVEC y HMEC-1 por taquizoitos sensibilizados con anticuerpos IgG1 anti- <i>Toxoplasma</i> y marcados con la CFSE .....	60
Internalización de taquizoitos sensibilizados con anticuerpos IgG1 anti- <i>Toxoplasma</i> y marcados con la CFSE a las células endoteliales.....	61

Efecto de la sensibilización de <i>Toxoplasma gondii</i> por anticuerpos IgG1 en la internalización a las células endoteliales humanas HMEC-1 .....	61
<b>Análisis de resultados y estadística .....</b>	<b>62</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<i>Expresión del RNA mensajero del FcRn (cadena <math>\alpha</math>) en las células endoteliales HUVEC y HMEC-1 .....</i>	<i>63</i>
<i>Expresión de la proteína del FcRn en células HMEC- 1 y HUVECs.....</i>	<i>63</i>
<i>Sensibilización de taquizoitos de las cepas RH y ME49 por anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma.....</i>	<i>67</i>
<i>Cinética de invasión de células endoteliales HUVEC y HMEC-1 por las cepas RH y ME49 de Toxoplasma gondii .....</i>	<i>68</i>
<i>Internalización de taquizoitos sensibilizados con anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma y marcados con la CFSE a las células HUVEC y HMEC-1 .....</i>	<i>74</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>82</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>108</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Árbol filogenético de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	8
Figura 2. Ciclo de vida.....	11
Figura 3. Respuesta crónica de anticuerpos IgM.....	14
Figura 4. Respuesta inmune innata y adaptativa .....	18
Figura 5. Estructura de la placenta .....	22
Figura 6. Transferencia de anticuerpos IgG maternos- fetal por FcRn .....	26
Figura 7. Estructura del FcRn .....	28
Figura 8. Endocitosis y transcitosis de IgG por FcRn .....	30
Figura 9. Tasa de transmisión y daño en Toxoplasmosis congénita .....	32
Figura 10. Organelos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	35
Figura 11. Proceso de invasión.....	37
Figura 12. Tipos de endocitosis .....	39
Figura 13. Endocitosis mediada por receptor.....	41
Figura 14. Flujograma de trabajo .....	47
Figura 15. Aislamiento y cultivo de células HUVEC.....	49
Figura 16. Aislamiento y cultivo de células HMEC-1.....	50
Figura 17. Obtención de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	52
Figura 18. Gen de la cadena alfa del FcRn.....	53
Figura 19. Micrografía de células HUVEC infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	59
Figura 20. Expresión de la cadena alfa del FcRn por RT-PCR.....	64
Figura 21. Identificación de la proteína del FcRn por microscopía confocal.....	65
Figura 22. Identificación de la proteína del FcRn por citometría de flujo .....	66
Figura 23. Sensibilización de <i>Toxoplasma gondii</i> por anticuerpos IgG1.....	67
Figura 24. Taquizoito sensibilizado por IgG1 visto por microscopía confocal .....	68
Figura 25. Citometría de flujo de la sensibilización de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	69
Figura 26. Cinética de invasión de <i>Toxoplasma gondii</i> a células HUVEC .....	69
Figura 27. Cinética de invasión de <i>Toxoplasma gondii</i> a células HUVEC y HMEC1. ....	71
Figura 28. Micrografías de células HMEC1 infectadas con <i>Toxoplasma gondii</i> .....	72
Figura 29. Número de vacuolas parasitóforas en células HMEC1 y HUVECs .....	73
Figura 30. Micrografía de células infectadas con taquizoitos marcados con CFSE ..	75
Figura 31. Histogramas de la población de células infectadas .....	76
Figura 32. Internalización de <i>T. gondii</i> marcados con CFSE a células HMEC1 .....	78
Figura 33. Internalización de <i>T. gondii</i> sensibilizados a células HMEC-1 .....	80
Figura 34. Número de vacuolas parasitóforas en células HMEC-1 .....	80
Figura 35. Cuantificación de la “carga parasitaria” en 100 células HMEC-1.....	81

Cuadro 1. Efecto de la sensibilización de los taquizoitos sobre el porcentaje de células HMEC-1 y HUVEC infectadas,.....	77
--	----

## RESUMEN

En la inmunidad adaptativa contra *Toxoplasma gondii* el IFN- $\gamma$  juega un papel importante en la inducción de una respuesta efectora contra los taquizoitos, ya que activa a células tales como macrófagos, neutrófilos y NK; además promueve la producción de anticuerpos de la clase IgG1 e IgG3 por los linfocitos B; éstos a su vez, activan la vía clásica del complemento y funcionan como opsoninas a través de los receptores para el Fc de la IgG (Fc $\gamma$ Rs). Por otro lado, las cuatro subclases de IgG, principalmente la IgG1, atraviesan la placenta gracias al receptor neonatal, o FcRn, con un aumento exponencial a partir de la mitad de la gestación. Por lo anterior, se esperaría que la transmisión vertical de *T. gondii* fuera menor al final del embarazo que al principio; sin embargo, es más frecuente durante el último trimestre. Más aun, en un estudio previo encontramos anticuerpos IgG1 específicos más frecuentemente entre madres de recién nacidos con problemas clínicos, que en las madres de aquellos que nacieron asintomáticos. Una explicación a esto es que el recubrimiento de los taquizoitos por los anticuerpos IgG1 estén facilitando la entrada al sincitiotrofoblasto y a las células endoteliales de los vasos fetales en las vellosidades coriónicas, a través del FcRn, favoreciendo la transmisión congénita, con mayor probabilidad de desarrollo de problemas clínicos en etapas más tempranas. Con el fin de analizar lo anterior, se utilizó un modelo de invasión *in vitro* usando células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y de microvasculatura (línea HMEC-1) y dos cepas de *T. gondii*, RH (virulenta) y ME49 (no virulenta), y se determinó el efecto de la sensibilización de los taquizoitos con anticuerpos IgG1 específicos, sobre su entrada a las células, mediante microscopía de luz en laminillas teñidas con Wright.

Se observó que la cepa ME49 invadió más a las células endoteliales que la cepa RH, contrario a lo que se esperaba, y que las células de la línea HMEC-1 fueron más susceptibles a la invasión que las HUVEC. Se demostró que el recubrimiento de los taquizoitos por anticuerpos opsonizantes (IgG1) anti-Toxoplasma favorece la internalización a las células endoteliales, en comparación con el tratamiento con un suero negativo. Los resultados apoyan la hipótesis de que la unión de los anticuerpos a la superficie del taquizoito favorece la entrada a las células endoteliales, lo que podría sugerir un mecanismo de la transmisión de *T. gondii* de la madre al hijo durante le gestación.

## ABSTRACT

The cytokine IFN- $\gamma$  plays an important role in the adaptive immune response against *Toxoplasma gondii*, since it induces effector mechanisms against the tachyzoite, i.e. phagocytosis enhancement of macrophages, neutrophils and natural killer (NK) cells, as well as B cell production of antibodies of the IgG1 and IgG3 subclasses; the later activate Complement by the classical via and function as opsonins through the IgG Fc fragment receptors (Fc $\gamma$ Rs). Additionally, the four IgG subclasses, but mainly IgG1, traverse the placenta thanks to the neonatal Fc receptor, or FcRn, with an exponential increase from mid gestation. Because of the abovementioned phenomena, *T. gondii* vertical transmission would be expected less frequent at the end of pregnancy than at the beginning, but it is just the opposite: it is maximal during the third trimester. Moreover, in a previous study we found IgG1 antibodies in a larger proportion of women who delivered newborns with clinical problems than among those who had apparently healthy infected babies. One explanation could be that recognition of tachyzoites by IgG1 antibodies favor their entry to the syncytiotrophoblast and the fetal endothelial cells at the placental chorionic villi, by means of the FcRn, favoring congenital transmission at earlier stages of gestation, and thus provoking infections with larger probability of disease development. In order to test this hypothesis, i.e. that parasite sensitization with anti-Toxoplasma IgG1 antibodies augment their entry to cells, we used *in vitro* invasion models of two endothelial cell types, human umbilical vein cord primary cultures (HUVEC) and microvasculature HMEC-1 cell line, and two *T. gondii* strains, i.e. virulent RH and non-virulent ME49. This was evaluated by light microscopy observation of Wright stained slides.

Unexpectedly, the non-virulent ME49 strain invaded a larger proportion of cells than the virulent, RH strain. Additionally, HMEC-1 cells were more susceptible to invasion than HUVECs. Finally, covering the tachyzoites with IgG1 specific antibodies induced an increase in both the proportion of infected cells and the number of parasites per cell, when compared to parasites incubated with negative serum. The results support the notion that IgG1 antibody binding to the surface of the tachyzoite may favor its entry to the syncytiotrophoblast and the fetal endothelial layers and, as a consequence, vertical transmission of *T. gondii*.

## MARCO TEÓRICO

### *Toxoplasma gondii*

El término *Toxoplasma* deriva de la palabra griega *toxon*, que significa arco, refiriéndose a la forma del taquizoíto de media luna. El nombre de la especie proviene del roedor *Ctenodactylus gondii*, del norte de África de donde se aisló por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux (Nicolle y Manceaux, 1909). *Toxoplasma gondii* es un parásito que infecta prácticamente todas las células nucleadas de vertebrados homeotermos, incluido el ser humano (Tenter et al., 2001; Montoya y Liesenfeld, 2004). La infección más común es la horizontal (o “adquirida”) que se adquiere al ingerir quistes tisulares contenidos en la carne mal cocida, o bien agua o alimentos contaminados con ooquistes del parásito; también se puede transmitir verticalmente y ocasionar la toxoplasmosis congénita (Petersen y Dubey, 2001). El parásito puede ocasionar daño en el feto durante el embarazo o en el recién nacido y en pacientes con inmunodeficiencia primaria o secundaria. Este protozooario tiene distribución mundial: una tercera parte de población de adultos está infectada por él; la prevalencia varía del 12 al 90% en diferentes partes del mundo, siendo más frecuente en las regiones cálidas y húmedas (Hill et al., 2007; Dubey, 2010). En México, la frecuencia se ha incrementado: en la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) de 1987, publicada en 1992, se determinó un valor de alrededor de 32%, mientras que el estudio publicado por nosotros en 2012 usando los sueros de las ENSAS del 2000 y 2006, se determinó una prevalencia del 41% y 43% respectivamente; siendo las regiones de la costa del

Golfo de México y del Pacífico las de mayor riesgo (Velasco-Castrejón et al., 1992; Caballero et al., 2012).

La infección más común es la horizontal (o “adquirida”) que se adquiere al ingerir quistes tisulares contenidos en la carne mal cocida, o bien agua o alimentos contaminado con ooquistes del parásito; pero también se puede transmitir verticalmente y ocasionar la toxoplasmosis congénita (Petersen y Dubey, 2001). Esta forma es la de interés en la presente tesis. Particularmente el posible papel paradójico que juegan la respuesta inmune humoral materna (anticuerpos IgG1) y el receptor que media su transporte de la madre al hijo a través de la placenta, el FcRn. Para ello se usó un modelo *in vitro* con variantes de células hospederas y del parásito.

### **Clasificación taxonómica de *Toxoplasma gondii* y variabilidad genética**

*Toxoplasma gondii* pertenece al Phylum Apicomplexa (protozooario que presenta complejo apical), el cual comprende más de 5000 especies de parásitos intracelulares (Khan et al 2005). La clasificación taxonómica es la siguiente:

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoa

Subclase: Coccidiasina

Orden Eimeriorina

Familia Toxoplasmatidae

Género *Toxoplasma*

Especie *Toxoplasma gondii*

Anteriormente la variabilidad genética de *T. gondii* se había considerado baja, habiéndose descrito tres linajes clonales (I, II, III) y recombinantes de éstos, además de algunos atípicos; su virulencia se determinó con base en su replicación y propagación tanto en ratones como en cultivos celulares (Howe y Sibley, 1995). El genotipo I es más virulento en ratones y en humanos y es causante de problemas clínicos en individuos inmunocompetentes; en cambio, los genotipos II y III son menos virulentos y están presentes preferentemente en infecciones crónicas (Sibley y Boothroyd, 1992). La mayoría de los casos de toxoplasmosis, incluida la congénita en humanos, se asocian con variantes tipo II, que generalmente causan infección sub-clínica, pero que pueden ser muy agresivas en pacientes inmunocomprometidos (Ferreira et al., 2006). En modelos *in vitro* e *in vivo* con cepas virulentas, se observó una alta proliferación y una alta capacidad de migración a través de las barreras epiteliales, así como daño a nivel de sistema nervioso central en las etapas crónicas (Dardé, 2004; Saeji et al., 2005).

Los estudios más recientes se han identificado otros aislamientos con características distintas a los clásicos, a los cuales se les designó como genotipos atípicos, y cuya virulencia en ratones no necesariamente correlaciona con la encontrada en otros animales o seres humanos (Tinti et al., 2003; Dardé, 2004; Dubey, 2010; Su et al., 2010). Las cepas virulentas con genotipos atípicos, son generalmente responsables de manifestaciones oculares y son frecuentes en pacientes con VIH (Ajzenberg et al., 2004; 2005; Khan et al., 2006; 2011; Halonnen y Weiss, 2013). En México se ha demostrado la presencia del genotipo I en dos casos de niños infectados



### **Descripción de los estadios de *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* puede tomar diferentes formas dependiendo del estadio: el **taquizoito**, es el estadio de replicación rápida dentro de las células, que al romperlas e invadir células adyacentes genera daño tisular por necrosis. La respuesta inmune limita la proliferación de los taquizoitos, los cuales se convierten a **bradizoitos** o formas de replicación lenta, que sobreviven dentro de **quistes tisulares**, los cuales son resistentes a las enzimas proteolíticas; pueden persistir en fase de latencia durante toda la vida y son capaces de reactivarse cuando ocurre una inmunodepresión del hospedero. Los **ooquistes**, que contienen esporozoitos, se eliminan con las heces de los gatos; éstos maduran en uno a cinco días en el ambiente si las condiciones de humedad y temperatura son propicias, en su interior se forman ocho **esporozoitos**, los cuales persistirán con capacidad infectiva durante 18 meses (Montoya y Liesenfeld, 2004; Skariah et al., 2010).

### **Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii***

El ciclo de vida consta de una fase de reproducción sexual, la cual se inicia en el intestino delgado de un felino (hospedero definitivo) al ingerir carne infectada por quistes tisulares, o alimentos o agua contaminados con ooquistes; una vez ingeridos estos estadios, las enzimas digestivas los rompen, liberando los bradizoitos o los esporozoitos, e invaden el epitelio del intestino del gato; se inicia el desarrollo de numerosas generaciones de ciclos asexuales, conocidos como esquizontes, los cuales contienen a los merozoitos que más tarde son liberados; posteriormente se lleva a cabo la gametogénesis, con la formación del microgameto y el macrogameto,

y como consecuencia, la fecundación del segundo. La formación de la pared del ooquiste, comienza alrededor del macrogameto fertilizado, que se convierte en ooblasto y finalmente en ooquiste inmaduro, liberado al lumen intestinal y eliminado con las heces de los gatos, completando así el ciclo sexual (Hill et al., 2007; Dubey, 2010; Skariah et al., 2010). En condiciones óptimas de temperatura y humedad, los ooquistes pueden permanecer viables durante varios meses. La contaminación del ambiente es debida a que millones de ooquistes son eliminados por los gatos domésticos y otros felinos (Dubey, 1996; Black y Boothroyd, 2000).

El ciclo asexual comienza cuando los ooquistes, contenidos en agua o alimentos contaminados, o los quistes tisulares que contienen bradizoitos, presentes en la carne de otro hospedero crónicamente infectado, son ingeridos por cualquier mamífero o ave; los ooquistes o quistes se desenquistan y se liberan los esporozoitos o los bradizoitos, que invaden el epitelio intestinal del hospedero intermediario, donde se convierten rápidamente en taquizoitos; invaden diversos tipos celulares y se distribuyen en todos los tejidos del hospedero para completar el ciclo asexual (Figura 2). La transmisión por ooquistes es mayor para los hospederos intermediarios que para los definitivos (Dubey, 1996).

En individuos humanos inmunocompetentes la infección por *T. gondii* normalmente está latente y no produce problemas clínicos (Dubey, 2004; Correa et al., 2006; Black y Boothroyd, 2000). Cuando una mujer se infecta por primera vez durante el embarazo, puede transmitir la infección a su bebé a través de la placenta, provocando la toxoplasmosis congénita (Figura 2).

*Toxoplasma gondii*  
CICLO DE VIDA

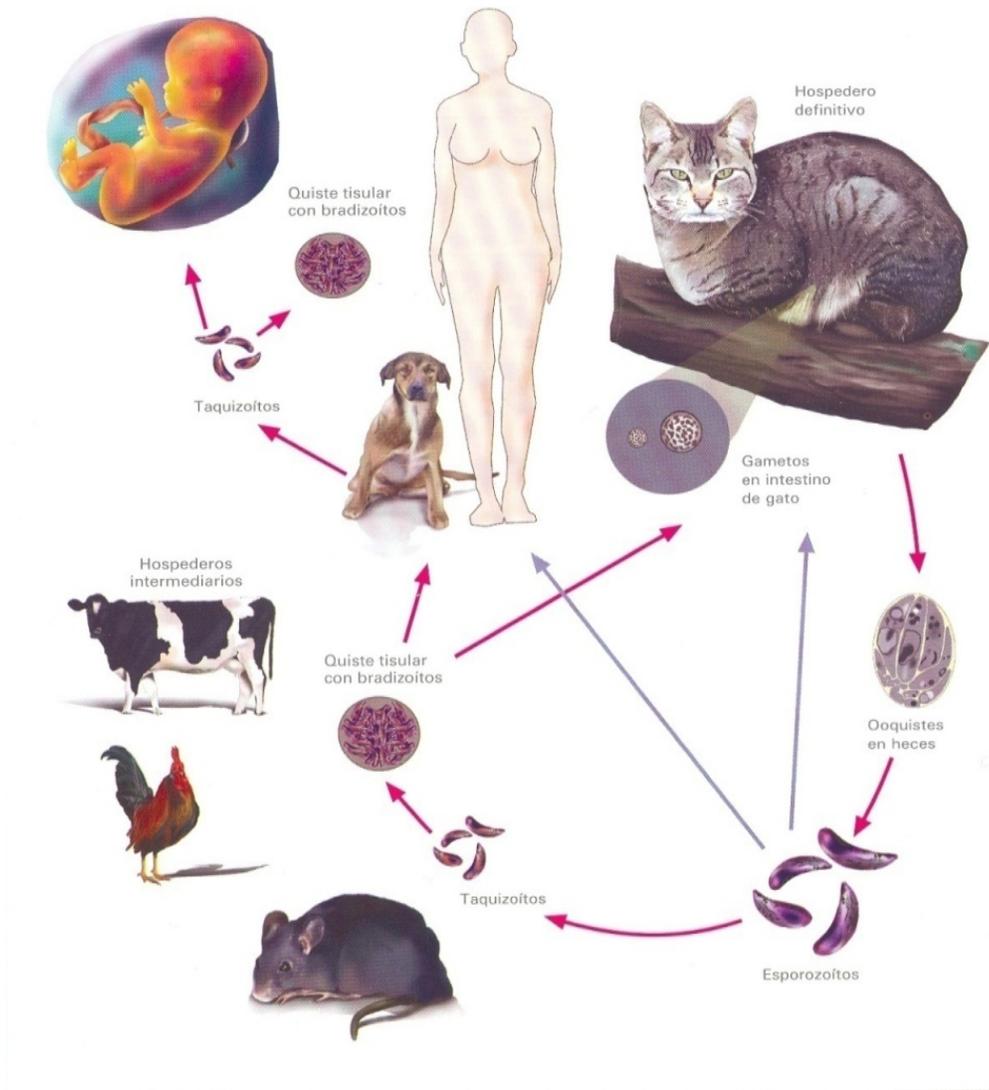


Figura 2

Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (tomado de Correa et al., 2006)

## **La infección adquirida**

Esta infección es aquella que se adquiere después del nacimiento, generalmente por vía oral. En individuos inmunocompetentes, la infección por *T. gondii* normalmente no produce sintomatología y se mantiene auto limitada; afectando principalmente a personas inmunocomprometidas, debido a que no hay control de la replicación del parásito, el cual rompe la barrera del epitelio intestinal y se propaga a una gran variedad de órganos, pudiendo invadir el sistema nervioso central y causar hidrocefalia, atrofia, encefalitis o bien calcificaciones parenquimatosas o periventriculares; o al ojo, provocando la retino-coroiditis, con pérdida progresiva de la visión, especialmente cuando los parásitos se encuentran cerca de las estructuras centrales (Ambroise-Thomas y Petersen, 2000; Montoya y Liesenfeld, 2004; Dubey, 2010; Furtado, 2012;). La severidad de la infección depende de varios factores como la virulencia de la cepa, la dosis infectante y el estadio, así como la respuesta inmune del hospedero (Montoya y Liesenfeld, 2004; Hill et al., 2005).

## **La respuesta inmune en adultos inmunocompetentes contra *Toxoplasma gondii***

La infección por *T. gondii* en individuos inmunocompetentes pasa inadvertida, ya que tanto la respuesta innata como la adaptativa juegan papeles primordiales en la defensa contra este parásito. La primera es mediada por neutrófilos, macrófagos/monocitos, células dendríticas (CD) y células asesinas naturales (NK), los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los receptores tipo Toll (TLRs) y otros similares, presentes en su superficie. Los taquizoitos de *T. gondii* son reconocidos principalmente por TLR2, TLR4 y TLR9

(Dunay y Sibley, 2010; Dupont et al., 2012). Estos receptores reconocen al glicosilfosfatidil-inositol (GPI) localizado en la superficie del parásito, provocando la liberación de citocinas proinflamatorias como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), la IL-6, la IL-8 y el TNF- $\alpha$ , así como la IL-12 y la IL-10 (Hunter y Sibley, 2012). La IL-12 y las quimiocinas CCL3 y CCL5 reclutan más fagocitos profesionales y células dendríticas (Dupont et al., 2012; Hunter y Sibley, 2012; Halonen y Weiss, 2013; Sturge y Yarovinsky, 2014). En modelos de infección en ratones, el IFN- $\gamma$  es el principal mediador de resistencia a *T. gondii*, pues promueve mecanismos protectores y estimula a los macrófagos para producir óxido nítrico que inhibe la replicación del parásito. Los receptores TLR11 y TLR12 reconocen a la profilina, otra proteína expresada en la superficie del taquizoito, que activa macrófagos y células dendríticas, promoviendo así la respuesta celular adaptativa, a través de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II (Hunter y Sibley, 2012; Koblansky et al., 2013). Además, se propone que los monocitos y las células dendríticas son activados por el DNA y RNA del *T. gondii*, vía los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 para producir grandes cantidades de citocinas proinflamatorias (Andrade et al., 2013; Koblansky et al., 2013).

Posteriormente se desencadena la respuesta adaptativa, tanto humoral como celular (Montoya y Liesenfeld, 2004; Muñoz et al., 2011). La respuesta humoral es iniciada por la interacción directa de los antígenos con los linfocitos B a través de sus receptores específicos de células B (BCR). Normalmente está mediada por la presencia de anticuerpos de clase IgA, IgM e IgG cuyas funciones efectoras son la

neutralización, la opsonización y la fijación del Complemento. La IgM es la primera inmunoglobulina en ser producida, de 3 a 10 días pos-infección, alcanzando su producción máxima a las 2-3 semanas, por lo que está presente en la fase aguda de la infección. La IgM es una molécula eficiente en la fijación de complemento, por lo que es posible que sea responsable de la destrucción de muchos taquizoitos en la fase aguda. Cabe resaltar que en contraste con lo que ocurre en otras enfermedades infecciosas, en la toxoplasmosis los anticuerpos de clase IgM pueden permanecer durante meses o años, como lo demostraron Grass et al., 2004 en estudios de cohortes (figura 3). Esto representa un problema de diagnóstico de la fase aguda.

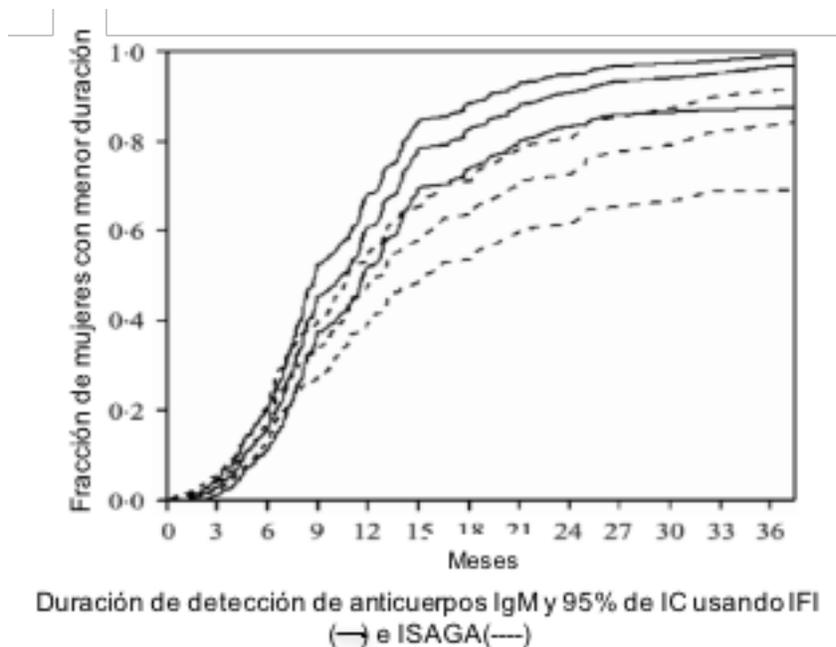


Figura 3

*Respuesta crónica de la IgM contra T. gondii. Estudio de cohorte de mujeres embarazadas. Tomado de Gras et al., 2004.*

También aparecen los anticuerpos IgA, los cuales inhiben la invasión celular por el parásito, principalmente a nivel de mucosas (Nascimento et al., 2008; Augustine, 2016). En experimentos *in vitro* se ha observado que la IgA humana protege a los enterocitos de la invasión por *T. gondii* (Mack y McLeod, 1992). Los anticuerpos de clase IgG aparecen entre la segunda y tercera semana después de la infección, alcanzando su máxima concentración dos meses más tarde y persistiendo durante largos periodos, aunque en títulos bajos; estos anticuerpos pueden proteger contra una reinfección y mantienen la infección en estado latente, por lo que protegen de la enfermedad y normalmente de una segunda infección (Antsaklis et al., 2002; Fricker-Hidalgo et al. 2013). Los anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG3 promueven inflamación, además, funcionan como opsoninas y fijan complemento, potenciando la actividad fagocítica de macrófagos y neutrófilos, así como la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, del inglés antibody dependent cell cytotoxicity) por las células NK, a través de los receptores Fc- $\gamma$ RI y Fc- $\gamma$ RIII, eliminando así al parásito (Pleass y Woof, 2001; Sulica et al., 2001; Lieberman y Hunter, 2002; Denkers et al., 2004; Selvaraj et al., 2004; Borrok et al., 2015). En seres humanos se sabe muy poco de la relación entre las clases/subclases de anticuerpos IgG y la protección o daño ocasionado con la producción de citocinas (Correa et al., 2007b). Todas las subclases de IgG están presentes en la respuesta humoral, aunque existe una predominancia de la IgG1 (IgG2a en ratón) (Santana et al., 2012; Souza et al 2012). Los datos existentes indican la aparición de la IgG1 en la fase aguda, relacionada al fenotipo Th1 en individuos inmunocompetentes sin problemas clínicos aparentes, en

cambio, los anticuerpos de subclase IgG4 están asociados con problemas clínicos en neonatos con infección congénita (Cañedo et al., 2008; Santana et al., 2012; Silva et al., 2012). Las células dendríticas, los macrófagos y los neutrófilos son las principales fuentes de IL-12, cuya función es promover una respuesta protectora Th1, liberando altos niveles de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Figura 4). La producción de IFN- $\gamma$ , por parte de las NK, los CD4<sup>+</sup> y los CD8<sup>+</sup> activa, entre otros, a los macrófagos, que llevan a cabo la fagocitosis mediada por anticuerpos y las células NK que lisan células infectadas por ADCC, (Halonen y Weiss, 2013; Dupont et al., 2014). Los linfocitos CD8<sup>+</sup> median la citotoxicidad directa de las células infectadas; su activación y función dependen de los CD4<sup>+</sup>. Los macrófagos expuestos al patógeno o la combinación de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , producen altos niveles de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) importante en el control de *T. gondii* intracelular (Muñoz et al., 2011; Li et al., 2012; Woods et al., 2013). Además, el IFN- $\gamma$  induce a la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) de la célula infectada, que cataboliza el triptófano, el cual inhibe la proliferación de los linfocitos T (Fallarino et al., 2012; Orabona et al., 2012; Silva et al., 2012). También se ha reportado que el IFN- $\gamma$  induce a las GTPasas p47, que al parecer median la formación de vesículas y ruptura de la vacuola parasitófora y la digestión del parásito dentro del citosol por autofagosomas (Liesenfeld et al., 2011; Yamamoto et al., 2012). Por otra parte, la producción de anticuerpos de las clases IgG1 e IgG3 es inducida por el IFN- $\gamma$  por lo que están asociadas a un perfil Th1 (Kawano y Noma, 1996; Pleass y Woof, 2001). En cambio, los anticuerpos IgG4, al igual que los de clase IgE, son promovidos por la IL-4 y la IL-13 y los anticuerpos IgG2 son

promovidos por la IL-2 y aumentados por la IL-6, ejerciendo un efecto pro-inflamatorio (Kawano y Noma, 1995). Una vez que se controla la proliferación parasitaria, el perfil Th1 debe ser regulado por citocinas como la IL-10 y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), ya que una respuesta exacerbada o prolongada de este tipo, puede provocar reacción inflamatoria severa que también puede ser causa de daño (Figura 4) (Bennouna, 2005 Dawson et al., 2005; Suzuki et al., 2011). El TGF- $\beta$  y la IL-6 promueven la diferenciación de los linfocitos Th17, los cuales, a su vez, secretan la IL-17, la IL-21 y la IL-22, que pueden ser inhibidas por el IFN- $\gamma$  y por la IL-10 y la IL-4 (Kelly et al., 2005; Korn et al., 2009; Mus et al., 2010; Hunter y Sibley, 2012). Otra citocina importante es la IL-27; inicialmente la describieron como una citocina pro inflamatoria asociada a Th1, pero recientemente se ha relacionado con la supresión funcional de los T CD4<sup>+</sup> efectores, incluyendo las poblaciones de células Th1, Th2 y Th17. La IL-27 limita la producción de IL-2, y promueve la producción de IL-10; por un lado, promueve la polarización Th1 y la producción de IFN- $\gamma$  de células TCD4<sup>+</sup> "naive", pero al mismo tiempo es inmuno-reguladora de las células T CD4<sup>+</sup> altamente activadas, limitado una respuesta pro-inflamatoria (Villarino et al., 2003; Kelly et al., 2005; Hall et al., 2012; Hunter y Kastelein, 2012). Un perfil de respuesta Th2 temprano está asociada a daño, debido a que la IL-4, la IL-13, la IL-5 y la IL-6 inhiben la producción de IFN- $\gamma$  y, por ende, no hay control de la proliferación parasitaria, con el consecuente daño, comúnmente necrótico y con reacción inflamatoria (Figura 4) (Nickdel et al., 2001; Lieberman y Hunter, 2002; Filisetti et al., 2004; Dawson et al., 2005). El perfil Th2 se ha encontrado asociado a problemas

clínicos como linfo-adenopatía secundaria en una infección adquirida en adultos (Villena et al., 2003; Sensini, 2006).

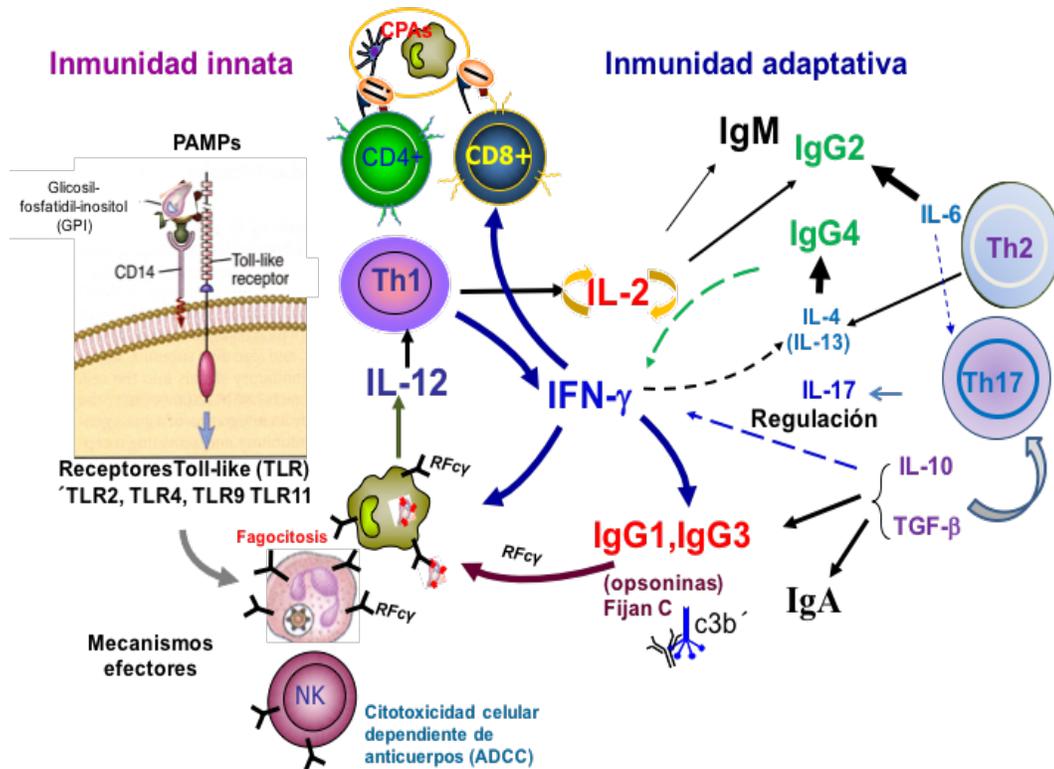


Figura 4

Representación esquemática de los fenómenos inmunológicos principales durante la toxoplasmosis adquirida de la respuesta inmune: Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); receptores toll like (TLRs); glicosil-fofatidil-inositol (GPI); citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC); CDs: células dendríticas; Mós: macrófagos; Neu: neutrófilos; NK: células asesinas naturales. Las líneas continuas y punteadas representan regulación positiva y negativa, respectivamente. Adaptado de Correa et al., 2007

## ***El embarazo y la placenta***

El embarazo en humanos es un proceso biológico el cual se lleva a cabo en tres fases: la implantación, desarrollo del feto y el parto.

La implantación: La placenta humana es una estructura de origen fetal y comienza a formarse a los tres días después de la fertilización; primero se forma la **mórula**, que consiste de un grupo de células internas rodeada por otra capa más grande de células (**el tectodermo**), que cuando alcanza la cavidad uterina se convierte en **blastocisto**. El primer paso de diferenciación consiste en que la masa celular interna, localizada en uno de los polos, origina al **embrión**, mientras que el trofotectodermo, compuesto por **trofoblastos** (de origen fetal), rodea la cavidad del blastocisto y se convierte en **la placenta**. Posteriormente el blastocisto se adhiere al **endometrio** y **los trofoblastos** se diseminan rápidamente y proliferan invadiéndolo, en el proceso llamado **implantación** (Cross et al., 2002). Conforme el embrión crece, el endometrio es invadido y las paredes superficiales de los capilares sufren erosión, dando lugar a la **decidua basalis**, lo que inicia la infiltración de la sangre materna, rica en nutrientes y alta presión parcial de oxígeno, a las **lagunas**, a través de **arterias uterinas espirales** (Adamson et al., 2002; Rai et al., 2014). Hacia el final de la segunda semana del embarazo comienza el desarrollo de **las vellosidades coriónicas**, cuya porción terminal consiste de una columna de **citotrofoblasto** y una envoltura, **el sinciotrofoblasto**. Más adelante, cuando las arterias espirales invaden, la sangre materna llega en mayor cantidad, llenando la laguna, alrededor del sinciotrofoblasto y se convierten de **vasos angostos a anchos** permitiendo un

flujo de sangre materna más abundante alrededor de las vellosidades. Cuando los vasos sanguíneos fetales son funcionales comienza la circulación feto-placentaria (Figura 5) (Gilbert, 2003; Correa et al, 2007; Wang et al; 2010).

Durante el desarrollo fetal, las vellosidades coriónicas cercanas a la sangre materna continúan desarrollándose y expandiéndose en una masa de tejido coriónico, ya son unidades funcionales y estructurales de la placenta cuya superficie externa se encuentra bañada por sangre materna. Los vasos sanguíneos se encuentran delimitados por una cubierta de células endoteliales las cuales permiten el mantenimiento de la pared de los vasos y la circulación (Figura 5) (Gilbert, 2003; Correa et al., 2007). Entre las vellosidades y la decidua existe sangre materna que se intercambia cada minuto, de tal manera que las arterias espirales uterinas traen sangre materna con nutrientes y oxígeno hacia las vellosidades; estos componentes se difunden a través de la barrera placentaria y llegan a los vasos corticales por donde circula la sangre que irá de regreso hacia el embrión; de la misma manera el dióxido de carbono y otros desechos de la sangre fetal son difundidos hacia la sangre materna que se encuentra fuera de las vellosidades. Cabe destacar que nunca se mezcla la sangre materna con la sangre fetal y que los compuestos que se intercambian entre madre e hijo (nutrimentos, hormonas, gases, desechos, fármacos o agentes infecciosos) deben cruzar todos los componentes de la barrera placentaria y los tejidos que la rodean (Carlson, 2014).

El transporte de nutrientes a través de la placenta ocurre por varios mecanismos:

Difusión simple: cuya velocidad de transferencia depende del tamaño molecular, este mecanismo es utilizado para el paso de oxígeno, electrolitos y CO<sub>2</sub>.

Difusión facilitada: para el transporte de glucosa y lactato (Baumann et al., 2002).

Transporte activo: se realiza contracorriente de las concentraciones relativas, lo cual necesita energía y es mediado por transportadores; es utilizada para el transporte de aminoácidos y vitaminas.

Pinocitosis: Es la absorción del plasma materno a través de vacuolas endocíticas de las células de la membrana placentaria para el transporte de lipoproteínas y fosfolípidos, así como de moléculas grandes como la albumina y la IgG (Baumann et al., 2002).

Además, durante el embarazo la placenta desarrolla diferentes funciones fisiológicas para el mantenimiento del cuerpo lúteo desde las primeras semanas del embarazo.

Función endocrina: la placenta es un órgano con capacidad para sintetizar tanto hormonas proteicas tipo hipotalámicas e hipofisarias como la gonadotrofina coriónica, diversos factores de crecimiento y citocinas, así como de hormonas esteroideas como la progesterona y el estrógeno; esto tiene lugar en el sincitiotrofoblasto. También hay producción de lactógeno placentario, estrechamente relacionado con la prolactina y la hormona de crecimiento.

Tolerancia inmunológica: Es un evento natural por el cual la placenta desarrolla cambios inmunológicos, que impiden que el feto sea atacado por el sistema inmune de la madre, evitando su rechazo (Vázquez-Rodríguez, 2011).

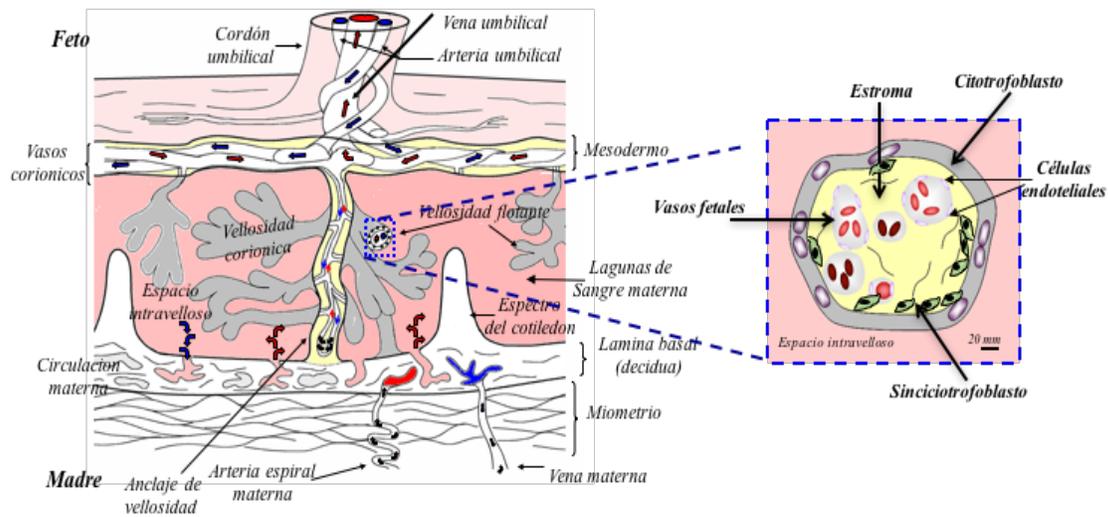


Figura 5

Representación esquemática de la placenta (Modificado de Correa et al, 2007a)

Después de la implantación hay una respuesta inflamatoria local Th1 mediada por células NK, macrófagos, linfocitos T y células dendríticas. Hay producción abundante de células NK uterinas (uNK), las cuales producen el factor de crecimiento endotelial vascular y la angiopoyetina [(Ang)-2el], factores responsables del mantenimiento y formación de las arterias espirales, así como la producción de citocinas Th1 proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-15 e IL-18 IL-27 y varias moléculas de adhesión (Zhang et al., 2005; Wu et al., 2006). En etapas tempranas, la placenta presenta antígenos de histocompatibilidad, pero la parte del sinciotrofoblasto que de cara a la sangre materna sólo muestra los antígenos solubles no clásicos HLA-G1 y G2, que inhiben la función citotóxica de las NKs periféricas maternas, sin afectar su función de síntesis de IFN- $\gamma$ .

Después de la implantación y durante la mayor parte del embarazo, a nivel de la placenta, hay un balance entre los perfiles Th1, Th2 y regulatorio, mediado éste por la IL-10 y el TGF- $\beta$  que inhiben la actividad de las NK periféricas y de los CD8<sup>+</sup>, para mantener un ambiente regulado, el cual previene el rechazo del embrión/feto y promueve su crecimiento (Barbosa et al., 2008). El sinciotrofoblasto sintetiza y secreta laIDO, la cual es esencial para el éxito del embarazo, ya que parece que reduce o inhibe la respuesta de los linfocitos T maternos, catalizando el triptófano en el área placentaria (Aluvhare et al., 2004). Por otra parte, se previene la activación del Complemento por dos proteínas derivadas de la membrana del trofoblasto: el factor de aceleración del decaimiento (DAF) y la proteína cofactor de membrana (MCP); ambas actúan inhibiendo la activación de la proteína C3, y como consecuencia, bloquean la inflamación y daño tisular. Una tercera proteína reguladora del complemento (CD59) actúa previniendo el ensamble del MAC y evita que las células fetales sean reconocidas como extrañas (Girard et al., 2006).

Al final del primer trimestre de la gestación, el sinciotrofoblasto y el endotelio fetal de las vellosidades de la placenta expresan el FcRn para los anticuerpos IgG, por medio del cual se inicia la transferencia de IgG materna. La expresión del FcRn se incrementa a lo largo del embarazo y, por consiguiente, hay un aumento de la transferencia de anticuerpos IgG maternos al final (Simister et al., 1996; Chaouat et al., 2004).

Al final de la gestación se inicia un proceso proinflamatorio que ayuda a desencadenar el parto; se cree que la IL-1 puede servir como señal para iniciar este proceso (Cross et al., 1994; Baumann et al., 2002; Hernández 2003). Además, surge nuevamente la respuesta inflamatoria Th1 (IFN- $\gamma$ ) para promover la ruptura de membranas y el desprendimiento de la placenta, lo que también favorece el parto (Wilczynski, 2005; Chaouat, 2007).

### **Transferencia de anticuerpos en el embarazo mediada por el FcRn**

La placenta humana es un órgano que participa en el intercambio de sustancias entre la madre y el feto. Se transfiere una amplia variedad de sustancias de forma activa o pasiva. Muchos compuestos de bajo peso molecular (<500 Daltons) pasan por difusión simple como iones y aminoácidos los cuales tienen una transferencia unidireccional. Las sustancias de alto peso molecular usualmente no atraviesan la placenta, pero hay excepciones como los anticuerpos de clase IgG. La transferencia de anticuerpos IgG maternos al feto o recién nacido a través de la placenta ha demostrado proteger al feto de infecciones en los primeros meses de vida extrauterina (Firat, 2001). Esta transferencia es dependiente del FcRn (figura 6).

Algunos estudios en humanos, han indicado que la transferencia de IgG materna varía dependiendo de la edad gestacional: hay poca IgG en el estroma de las vellosidades a las semanas 8 a la 10, y antes de la semana 16 la concentración de IgG en el suero del feto tiene <8% de la concentración normal del adulto. Entre la semana 17 y 22 se incrementa de 10 a 20% de la concentración materna, con un

aumento significativo entre las semanas 22 y 26; de la semana 28 a la 32 es de aproximadamente al 50% y al término del embarazo normalmente alcanza los niveles de la IgG de la madre (Malek et al., 1996; Szekeres-Bartho, 2002; Simister, 2003; van den Berg et al., 2011). Lo anterior se explica por el aumento en la expresión del FcRn a lo largo del embarazo, en la membrana apical del sincitiotrofoblasto y las células endoteliales de los vasos fetales de la placenta; éste une a la IgG de la sangre materna con alta afinidad ( $2 \times 10^7 - 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ). El mecanismo por el cual es transferida la IgG maternal al feto, podría ser la macropinocitosis: se sabe que une a la IgG en endosomas acidificados para proteger a la IgG de degradación durante el transporte a través del epitelio. La IgG es entonces transportada a través de vesículas acarreadoras derivadas de los endosomas, que se fusionan con la membrana del lado fetal del sincitiotrofoblasto; luego, el pH fisiológico permite la disociación de la IgG del FcRn y se libera al estroma de las vellosidades fetales; el receptor es reciclado hacia el lado materno (Bright et al., 1994; Simister et al., 1996; Saji et al., 1999; Antohe et al., 2001; Simister, 2003). Los mecanismos a través de los cuales la IgG atraviesa el endotelio fetal son menos claros, pero también involucran al FcRn (Ishikawa et al., 2015). El FcRn además de regular la transcitosis de la IgG mantiene los niveles adecuados de la IgG (homeostasis), al proteger a la IgG de la degradación lisosomal prolongando su vida media (Ghetie y Ward, 1997; West y Bjorkman, 2000; McCarthy, 2001; Tuma y Hubbard, 2003; Takizawa et al., 2005; Roopenian y Akilesh, 2007; Wang y Zhao, 2010; Einarsdottir et al., 2014).

El paso de las cuatro subclases de IgG de la madre al hijo depende de su afinidad por el FcRn. La subclase IgG1 es más eficazmente transportada de las cuatro

subclases, seguida de la IgG4, la IgG3 y finalmente la IgG2 ( $IgG1 \geq IgG4 \geq IgG3 \geq IgG2$ ). Las concentraciones de IgG3 e IgG4 fetales a término alcanzan niveles similares a los de la circulación materna; sin embargo, los niveles de IgG2 son significativamente inferiores (Simister y Story, 1997; Antohe et al., 2001; Szekeres-Bartho, 2002; Malek, 2003; Radulescuc et al., 2005).

Debido a que el FcRn puede unir complejos inmunes y transportarlos, se ha planteado la posibilidad de que sirva como "Caballo de Troya" para el paso de microorganismos recubiertos con anticuerpos IgG1 de la madre al feto a través de la barrera epitelial (Maidji et al., 2006).

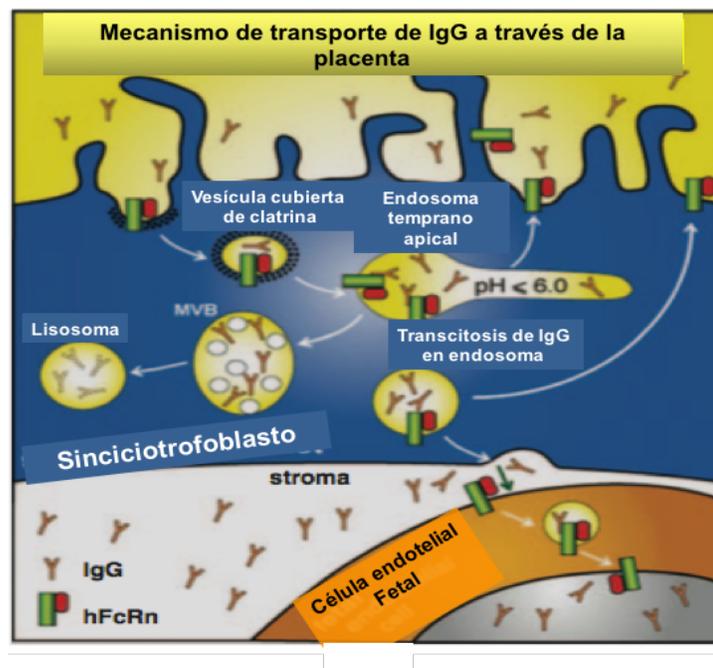


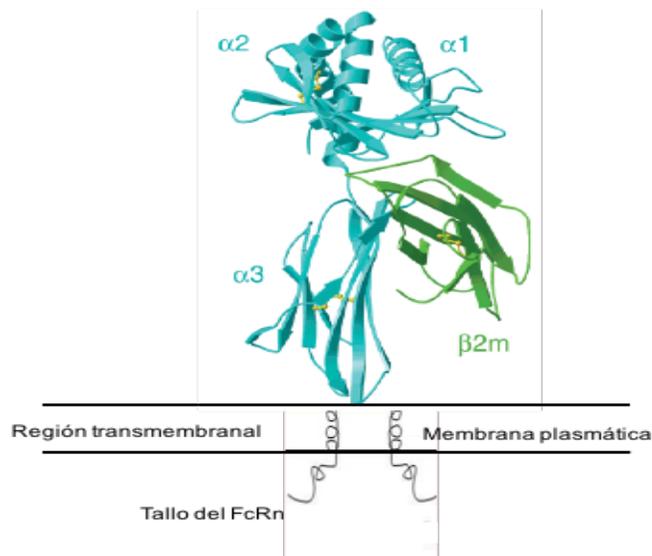
Figura 6

*Transferencia de la IgG maternos al feto a través del FcRn modificado de Ellinger and Fuchs 2012.*

## **Transcitosis de la IgG por el FcRn en células endoteliales**

Como se mencionó, el FcRn es una molécula encargada de dos funciones principales: la homeostasis de la IgG y la albúmina, y el transporte de la IgG del lumen intestinal a la circulación del neonato y de la sangre materna a la fetal a través de la placenta. Estructuralmente, el FcRn está relacionado con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), ya que está compuesto por una cadena ligera de 15 kDa, que es la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m), y una cadena pesada alfa ( $\alpha$ ) transmembranal, de 50 kDa que está glicosilada; ambas se unen entre sí de manera no covalente. La cadena  $\alpha$  consta de tres dominios,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3, con una región transmembranal y otra citoplasmática (Figura 7) (Ghetie y Ward, 1997; Firan et al., 2001; McCarthy, 2001; Tuma y Hubbard, 2003; Takizawa et al., 2005; Roopenian y Akilesh, 2007; West y Bjorkman, 2000; Wang y Zhao, 2010; Cervenack et al., 2011; Einarsdottir et al., 2014).

Este receptor está presente en todas las especies de mamíferos (Adamski et al., 2000; West y Bjorkman et al., 2000). En humanos se ha identificado en diversas células endoteliales del sistema nervioso central, intestino delgado de recién nacidos, células epiteliales del riñón, macrófagos alveolares, células epiteliales de las glándulas salivales, glándulas mamarias, páncreas, hígado y timo, así como en células presentadoras de antígenos, como monocitos, macrófagos y células dendríticas de sangre periférica y del intestino delgado (Lu et al., 2007; Roopenian y Akilesh, 2007).



*Figura 7*

*Diagrama de la estructura del FcRn: dos moléculas del FcRn se unen a una molécula de IgG a través del Fc. El FcRn formado por una cadena pesada glicosilada, transmembranal (verde), unida a una cadena ligera una 2-microglobulina (azul turquesa); unido al dominio CH2 y CH3 del Fc del anticuerpo IgG (azul marino). Modificado de West y Bjorkman 2000*

El FcRn une a la IgG en un ambiente ácido a  $\text{pH} \leq 6.5$  (Figura 8). El sitio de unión de la IgG al receptor, involucra varios residuos de histidina entre los dominios CH2-CH3 del fragmento Fc (Figura 8). (Ghetie et al., 1997; Antohe et al., 2001; Kuo et al., 2010; Tesar y Björkman 2010; Xiao et al., 2013). Es el único receptor que se ha demostrado que transporta las inmunoglobulinas solas, pero también en forma de complejos inmunes (Radulescuc et al., 2005). La internalización de la IgG por las células endoteliales se lleva a cabo por un proceso de endocitosis mediada por este receptor (Xiao et al., 2013; Bern et al., 2015). Un pequeño número de IgG unida puede transportarse de la cara apical a la basolateral de la superficie de la célula (es decir, transcitosis) donde la IgG es liberada (Xiao et al., 2013). Al igual que la mayoría

de los receptores, el FcRn se expresa en la superficie celular y es saturable. Algunos estudios *in vitro* han mostrado que regula el transporte de IgG a través de la monocapa de células endoteliales polarizadas, que sobre-expresan FcRn y median la endocitosis y transcitosis de IgG en ambas direcciones (McCarthy et al., 2000; Tesar y Björkman 2010). También ha reportado que la expresión del FcRn en células presentadoras de antígeno (APC) tanto en ratón como en humanos, tienen un papel en la presentación de antígeno unidos a IgG a través del MHC clase II a linfocitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro* e *in vivo* (Qiao et al., 2008; Baker et al., 2014). En otro estudio se observó la translocación del FcRn al fagosoma naciente, facilitando la fagocitosis bacteriana mediada por IgG a través de motivos que se encuentran dentro de la cola citoplasmática de señalización. Estos resultados apuntan a un papel no tradicional del FcRn en células fagocíticas (Vidarsson et al., 2006).

Este receptor ha despertado un gran interés para transportar proteínas, péptidos y fármacos (Xiao et a., 2013).

### ***La infección congénita por *Toxoplasma gondii****

La presencia de un agente infeccioso en las inmediaciones de la interfase madre/hijo en la placenta, puede traer consecuencias diversas en términos del éxito del embarazo. Cuando ocurre una primera infección por *T. gondii* durante este periodo, o en un momento cercano al mismo, existe la posibilidad que ocurra la transmisión vertical al embrión o feto, ocasionando la **infección congénita** (Tenter et al., 2001; Montoya y Liesenfeld, 2004).

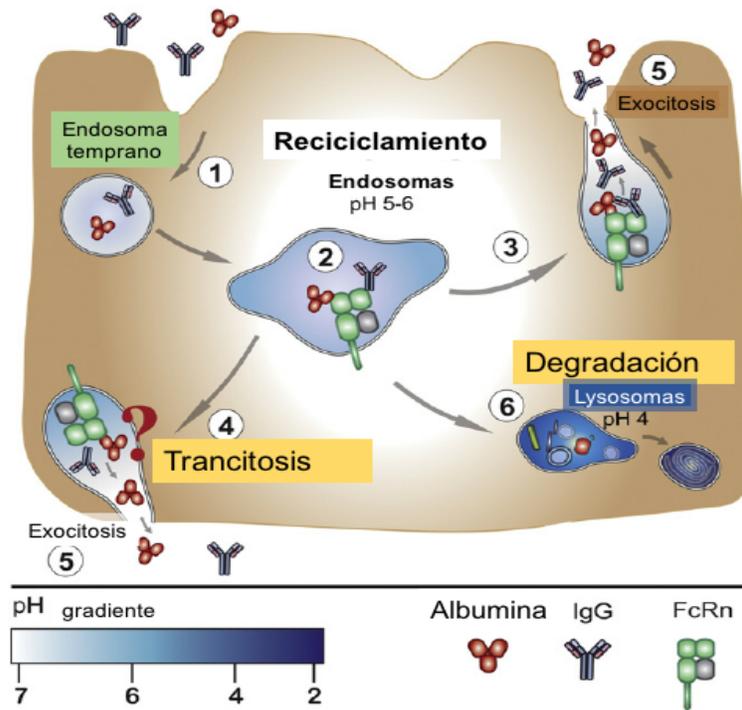


Figura 8

Endocitosis y transcitosis de la IgG por el FcRn en células endoteliales tomado de Bern et al., 2015.

La frecuencia de infección en mujeres embarazadas varía de 20% a más de 80% para la infección crónica y de menos de 1 a más de 3% para la infección aguda (que es la de peligro para la transmisión al bebé en gestación) (Hill et al., 2005). A nivel mundial se estima que la transmisión materno-fetal ocurre entre el 20 y 33% en madres recién infectadas (Rabilloud et al., 2010).

La toxoplasmosis congénita es un problema de salud en todo el mundo ya que es la segunda infección en frecuencia. La tasa a nivel mundial va de 0.08 a 6.0 casos por cada 1000 recién nacidos vivos, siendo más común en países de bajos recursos o con hábitos alimentarios o costumbres de riesgo (Montoya et al., 2004). En la Ciudad de México se ha reportado una frecuencia de 2 en 1000 de esta forma de la infección (Vela-Amieva et al., 2005).

La transmisión vertical y el daño al feto varían de acuerdo a la edad gestacional. En el primer trimestre la tasa de transmisión es por debajo del 6%, aumenta del 22 al 40% en el segundo trimestre y del 58 al 72% en el tercero (Montoya y Remington, 2008; Rabilloud et al., 2010). El riesgo de afectación del bebé es mayor si éste se infecta en etapas tempranas de la gestación, con consecuencias frecuentemente fatales, pues puede presentarse muerte y aborto espontáneo, posiblemente debido a que los componentes de su sistema inmune todavía son insuficientes e inmaduros, y por lo tanto son incapaces de contender con el parásito (Figura 9) (Dunn et al., 1999). Si la infección se adquiere en el segundo trimestre, el daño puede ser severo en el sistema nervioso central (ocasionando hidrocefalia, anencefalia, microcefalia o coriorretinitis, entre otras). Finalmente, si un feto se infecta hacia el final del embarazo, tiene una probabilidad cercana al 80% de nacer sin problemas clínicos aparentes, aunque desarrolla secuelas posteriormente (Figura 9) (Dunn et al., 1999).

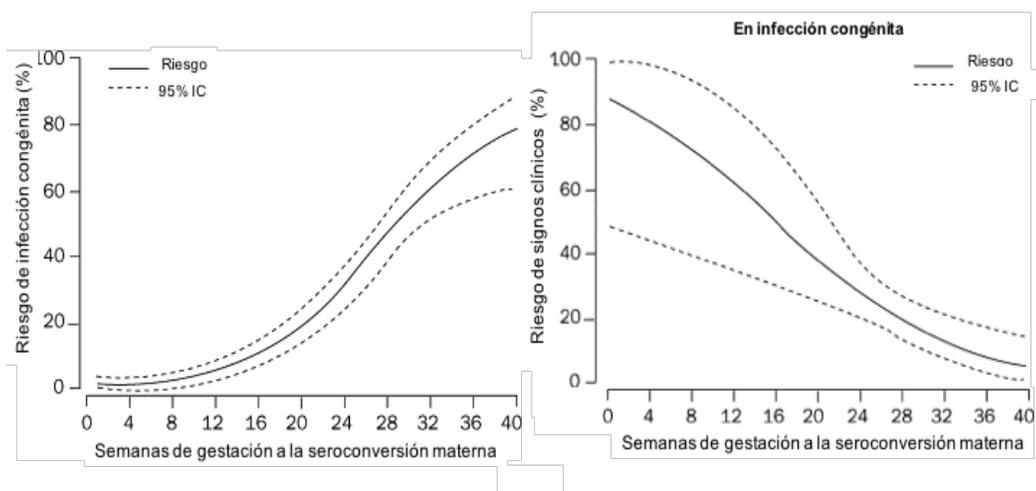


Figura 9

*Representación esquemática de la relación entre el momento de infección de la madre y el hijo por *T. gondii* y las tasas de transmisión vertical y de afectación al embrión/feto, respectivamente (adaptado de Dunn et al., 1999).*

### **La respuesta inmune en la infección congénita por *Toxoplasma gondii***

Existen reportes en modelos de ratones que indican que la invasión de la placenta por el parásito es controlada por moléculas de la respuesta inmune innata, que evita o limita la transmisión materno-fetal, a través de los TLRs expresados por el trofoblasto, el sincitiotrofoblasto o las células fagocíticas de Hofbauer (macrófagos fetales), las cuales liberan citocinas pro-inflamatorias en la sangre materna, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , algunas quimiocinas, y citocinas como IL-12, IL-5 e IL-8. También hay inducción de moléculas de adhesión endotelial, de la expresión de iNOS y de la activación deIDO, lo que induce degradación del triptófano (Myatt et al., 2004; Abrahams et al., 2005; Koga y Mor, 2010; Schmidt et al., 2012).

A pesar de que la madre es capaz de responder inmunológicamente y limitar la replicación del parásito en sus tejidos, en ocasiones no evita la transmisión a su bebé (Ambroise-Thomas y Petersen, 2000; Tenter et al., 2001; Montoya y Liesenfeld, 2004). Existen reportes en la literatura que sugieren un papel de algunas moléculas del sistema inmune que protegen a la madre pero no evitan la transmisión al feto, e incluso pueden favorecerlo. Se ha observado que las células BeWo (línea celular del trofoblastos) son susceptibles a la invasión y replicación de los taquizoitos de *T. gondii* cuando son tratadas con IL-10 y TGF- $\beta$ , aún en presencia de IFN- $\gamma$ ; los autores sugieren que este mecanismo de inmunomodulación por parte del trofoblasto de la placenta por un lado, mantiene un ambiente favorable para el embarazo, pero por el otro, podría facilitar la infección local (Barbosa et al., 2008). En un modelo de toxoplasmosis congénita aguda en ratones BALB/c, se encontró que el IFN- $\gamma$  juega un papel paradójico, ya que protege a la madre de la enfermedad, pero está relacionado con un aumento en la transmisión vertical (Abou-Bacar et al., 2004; Pfaff et al., 2007; Ferro et al 2008). Una hipótesis para explicar este fenómeno de la transmisión está relacionada con el factor de adhesión celular ICAM-1: en un modelo de explantes de vellosidades coriónicas de placentas humanas, se observó que el IFN- $\gamma$  induce la expresión de ICAM-1, el cual podría reclutar monocitos infectados intracelularmente con *T. gondii*, los cuales pueden adherirse a la superficie del sinciotrofoblasto y así acercar al parásito, el cual puede invadir los tejidos fetales (Pfaff et al., 2005; 2008). Otra hipótesis es que *T. gondii* puede unirse directamente a ICAM-1 a través de la proteína MIC2 que es una adhesina transmembranal de los

micronemas (ver adelante) que se ha asociado a mayor diseminación del parásito (Barragán et al., 2005; de Oliveira et al., 2011).

### ***Mecanismos de internalización de *Toxoplasma gondii* a la célula hospedera***

Los taquizoitos de *T. gondii* pueden entrar a la célula hospedera **por invasión activa**, por **fagocitosis** y por un proceso denominado **invasión vacuolar del fagosoma** (PTVI).

**Invasión activa:** *Toxoplasma* penetra secretando proteínas de algunos organelos específicos, como MIC2 de los micronemas (mencionada antes), que participan en la unión a la célula (Figuras 10 y 11) (Carruthers, 1999; Barragán et al., 2005; Pfaff et al., 2008). Posterior a la unión con la célula hospedera, se lleva a cabo la extrusión del conoide y la liberación del contenido de las roptrias que comprenden dos diferentes subestructuras, las roptrias del cuello (RON) y las del bulbo (ROP). Las RONS y las MICs se ensamblan en la superficie del parásito para formar la “unión móvil” (MJ), entre la superficie del parásito y la membrana plasmática del hospedero; dicha unión asegura la formación de la membrana de la vacuola parasitófora (VP), el parásito altera la membrana de la célula hospedera mediante la liberación de enzimas hidrolíticas que permiten la penetración (Morisaki et al., 1995; Toulah et al., 2011). Conforme penetra, el taquizoito va tomando parte de la membrana hospedera para delimitar su territorio y formar su vacuola parasitófora.

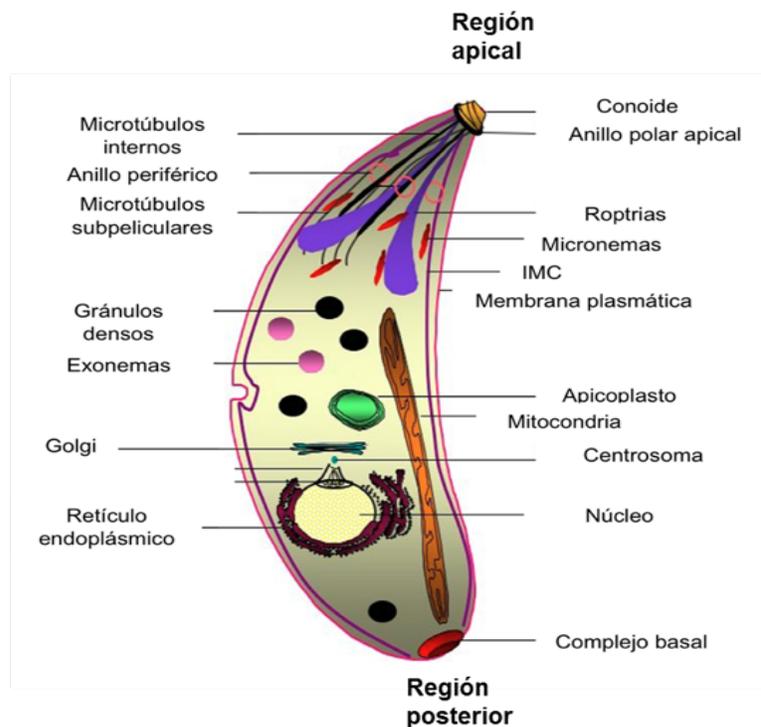


Figura 10

*Representación esquemática de los organelos celulares de T. gondii (tomado y modificado de Baum et al, 1996 y Carruthers, 1999)*

Las ROPs son inyectadas a la célula hospedera en pequeñas vesículas que posteriormente se fusionan con la VP; algunos modelos sugieren que el contenido de las roptrias modifica la vacuola para evitar que se fusione con los lisosomas y permitir su asociación con la mitocondria y el retículo endoplásmico. Las proteínas de los gránulos densos (GRAs) son los principales componentes liberados dentro de la VP, pues ayudan con el intercambio de nutrientes y están involucrados en la sobrevivencia y la virulencia (Carruthers, 1999; Laliberté y Carruthers, 2008).

Pueden manipular genes de la respuesta inmune para evitar procesos apoptóticos y el metabolismo de carbohidratos (Figura 11) (Morisaki et al., 1995; Carruthers, 2002; Kim, 2004; Carruthers y Boothroyd, 2007; Laliberté y Carruthers 2008; Contreras-Ochoa et al., 2012).

La membrana de la VP, además de proteger al parásito, presenta proteínas que aseguran el reclutamiento de los organelos de la célula hospedera, como las mitocondrias o el retículo endoplásmico, así como la adquisición de nutrientes y energía que vienen del citosol, para lo cual el parásito forma poros en ella, que permiten la difusión bidireccional de moléculas, independientemente de la temperatura (Carruthers, 2002; Laliberté y Carruthers, 2008). Durante el proceso de entrada, el parásito suprime la mayoría de las proteínas de superficie de la célula hospedera, tanto en las interacciones con el citoesqueleto como en el anclaje en la membrana plasmática, lo cual le permite fluidez para penetrar. Es posible que la supresión de las moléculas de la célula hospedera también sean determinantes para evitar a la fusión endocítica (Sibley et al., 2011).

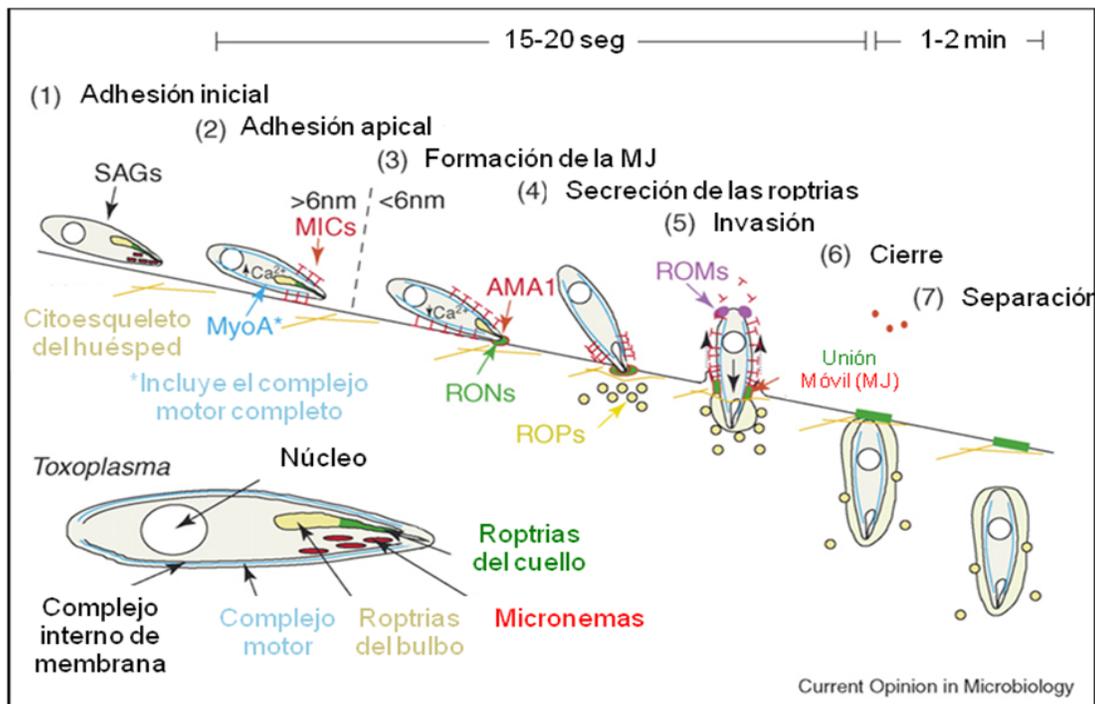


Figura 11

Proceso de invasión celular de *T. gondii*: antígenos de superficie (SAGs), micronemas (MICs), miosina A (MyoA), antígeno de membrana apical (AMA), roptrias del cuello (RONS), roptrias del bulbo (ROP), unión móvil (MJ) (modificado de Carruthers y Boothroyd; 2007)

### Endocitosis y transcitosis

La endocitosis es un proceso celular mediante el cual la célula introduce partículas, incluyendo patógenos, y moléculas grandes, englobándolos en una invaginación de la membrana citoplasmática, con lo cual se forma una vesícula acarreadora que termina por desprenderse e incorporarse al citoplasma. Las vías de endocitosis están clasificadas típicamente en: a) **endocitosis mediada por clatrina y caveolas** b) **fagocitosis**, c) **macropinocitosis** d) **pinocitosis** y e) **endocitosis mediada por receptor** (Figura 12) (Oh et al 2014).

**La endocitosis mediada por clatrina** es un proceso por el cual diferentes tipos de materiales extracelulares entran a la célula; en este proceso, las macromoléculas se unen a receptores específicos situados en la superficie celular, los cuales se acumulan selectivamente en las depresiones recubiertas de clatrina, la polimerización de la clatrina forma vesículas de aproximadamente 120 nm. Este es el principal mecanismo por el que se incorporan proteínas integrales, así como macromoléculas extracelulares.

**Endocitosis mediada por caveolas**, son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática de entre 45 a 80 nm, que posteriormente se transforman en vesículas en forma de matraces (aproximadamente 50 nm de diámetro). Pueden constituir hasta un tercio del área de la membrana plasmática de algunas células del músculo liso, de los fibroblastos, de los adipocitos y de las células endoteliales (Conner et al., 2003; Nabi y Le, 2003; en Xiao et al., 2013). En este tipo de endocitosis no está claro cómo son digeridos los ligandos absorbidos (Kiss, 2012; en Xiao et al., 2013; Oh et al., 2014).

**La fagocitosis** es un proceso llevado a cabo preferentemente por células especializadas como los macrófagos y los neutrófilos, los cuales ingieren partículas grandes, incluidos los patógenos. Este proceso implica la captación de áreas de membrana mayores que la endocitosis mediada por clatrina. Las partículas adsorbidas son resguardadas en los fagosomas, los cuales migran al citoplasma, maduran a través de la fusión con los lisosomas y posteriormente forman vacuolas digestivas llamadas fagolisosomas, donde las sustancias son degradadas por las enzimas hidrolíticas. (Xiao et al., 2013; Chiang et al., 2016).

**La macropinocitosis** es un tipo de endocitosis mediante el cual la superficie celular crea evaginaciones a modo de ola, cuyo frente cae sobre la membrana plasmática y se fusiona con ella formando una gran vesícula interna o macropinosoma, para internalizar a la célula partículas en fase fluida, llamado “endocitosis fluida”. Es inespecífica, no requiere ligando vinculado a la membrana de la superficie celular, y por lo tanto es un proceso no competitivo (Figura 9) (Xiao et al., 2013; Oh et al 2014).

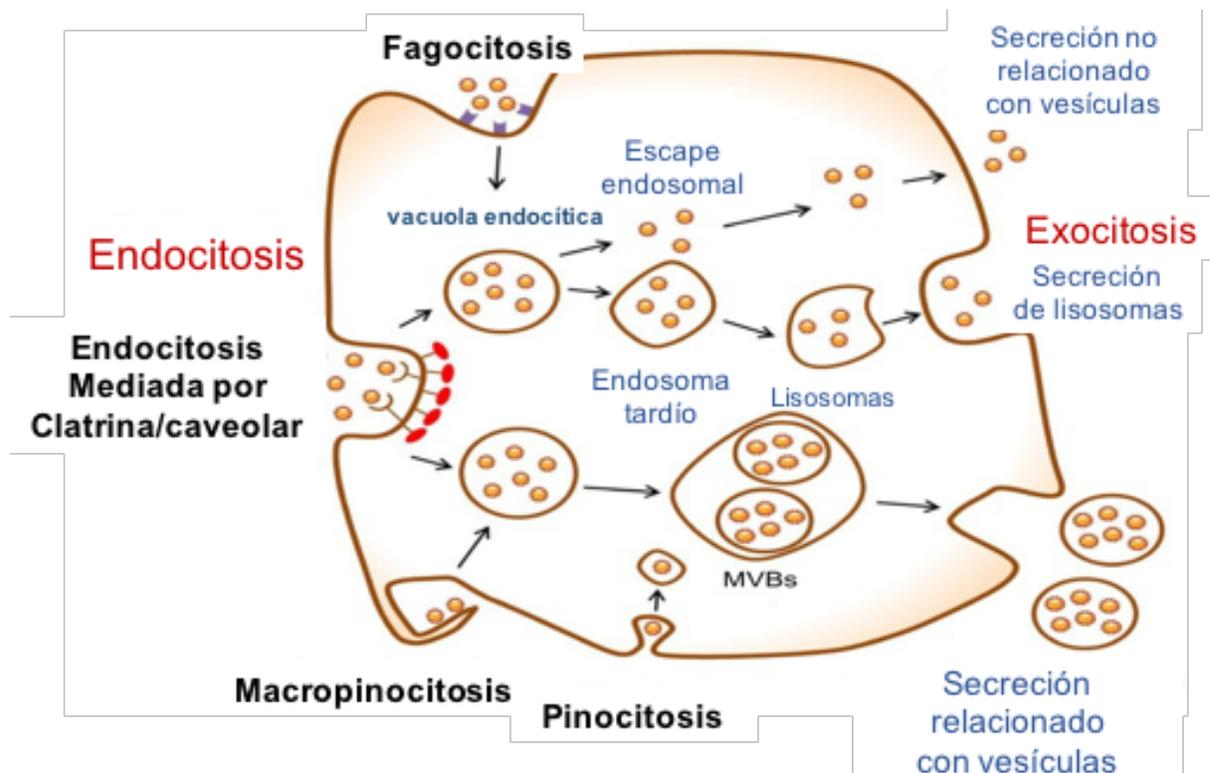


Figura 12

*Tipos de endocitosis: fagocitosis, endocitosis mediada por clatrina/caveolina, macropinocitosis y pinocitosis (Tomado de Oh N and Park 2014).*

**Endocitosis mediada por receptor**, en este proceso se internalizan moléculas que se unen a su receptor específico, localizado en la superficie celular y que posee un sitio de unión a la molécula. El receptor y su ligando se mueven en la membrana plasmática y se concentran en pequeñas depresiones o invaginaciones de la membrana plasmática y están cubiertas por **clatrina**. Cuando se desprenden las vesículas de la membrana plasmática se liberan al espacio intracelular y se remueve la cubierta de clatrina. Las vesículas que aun transportan los receptores y las moléculas unidas específicamente, se fusionan con la membrana de otro organelo denominado **endosoma**. La función de los endosomas es empaquetar a las moléculas en nuevas vesículas y enviarlas a diferentes lugares dentro de la célula. El destino de las moléculas y partículas endocitadas puede ser: a) **reciclado de receptores**, b) **reciclado de receptores y sus ligandos**, c) **degradación en lisosomas**, donde pueden ser degradadas por enzimas que están activas en el medio ácido, y d) **almacenamiento temporal**. La diferencia entre la endocitosis mediada por receptor y la fagocitosis, es que en la primera una vez que abandonan el endosoma, las moléculas pueden dirigirse a diferentes destinos de la célula, entre ellas el reciclamiento de las moléculas endocitadas. En cambio, durante la fagocitosis todo el material que entra a la célula termina en los fagolisosomas para su degradación (Figura 13) (Mukherjee et al., 1997; Alberts, 2000).

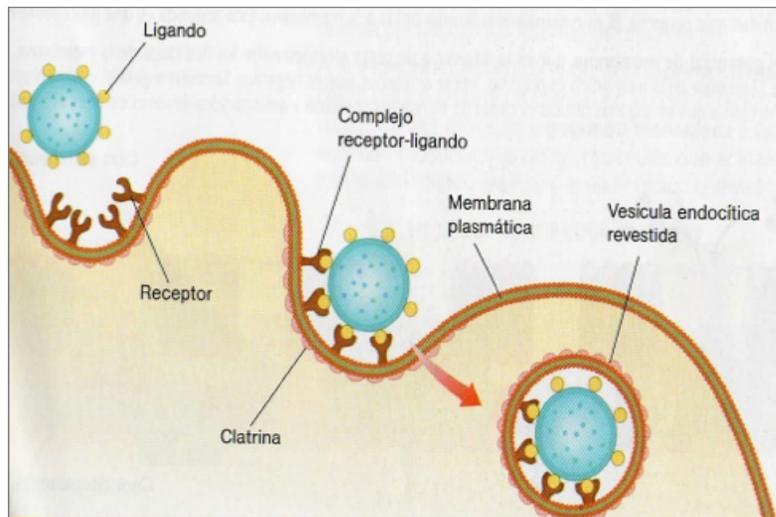


Figura 13

*Endocitosis mediada por receptor con formación de vesículas revestidas de clatrina. Arberts 4ª ed.2004*

**La transcitosis** es un conjunto de fenómenos que permite a una sustancia atravesar el citoplasma celular desde un polo celular a otro; implica el doble proceso endocitosis-exocitosis, y es característico de las células endoteliales que constituyen los capilares sanguíneos (Xiao et al., 2013; Oh et al 2014).

### ***Internalización de *Toxoplasma gondii* por endocitosis e invasión vacuolar del fagosoma***

Los taquizoitos pueden entrar a las células por fagocitosis, como ya se mencionó anteriormente. Su destino normalmente es la destrucción; de hecho, la fagocitosis es mediada por receptores (FcR $\gamma$ 1 IIa y IIb), presentes en los macrófagos y neutrófilos, que es uno de los mecanismos más efectivos para controlar la fase aguda de la infección. Sin embargo, *T. gondii* una vez que es internalizado es capaz de escapar

de la vacuola fagocítica para evitar ser degradado y forma su propia vacuola (Morisaki et al 1995; Joller et al., 2011).

Se ha descrito otra vía de invasión no clásica, a través de fagocitosis; el taquizoito posiblemente altera la señalización de la célula hospedera, mediante mecanismos aún no definidos, bloquea la fusión del fagosoma a los lisosomas y comienza la invasión activa del parásito, formando una unión móvil en la membrana del fagosoma para establecer una VP, tomando nutrientes de la membrana del fagosoma e iniciando su replicación dentro del fagocito; esta vía es llamada “invasión vacuolar del fagosoma” (PTVI) (Joiner et al., 1990; Morisaki et al., 1995; Toulah et al., 2011; Zhao et al., 2014). Se ha descrito que esta vía de fagocitosis podría ser utilizada preferentemente por cepas no virulentas de *T. gondii*, lo que les confiere una ventaja infecciosa sobre cepas virulentas para el escape en los macrófagos; la captura de una cepa no virulenta de *T. gondii* por los macrófagos probablemente implica el reconocimiento del ligando del parásito por receptores para PAMPs (Zhao et al., 2014). Se ha reportado que algunos parásitos utilizan esta vía sólo para facilitar su entrada a la célula hospedera (Joller et al., 2011).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen datos paradójicos al respecto del papel de algunas moléculas de la respuesta inmune que protegen de enfermedad durante la infección adquirida por *Toxoplasma gondii* en la toxoplasmosis congénita, pues parecen favorecer la transmisión vertical y el daño al feto en lugar de protegerlo.

Se sabe que la IL-12 y el IFN- $\gamma$  juegan un papel defensor contra *T. gondii*, activando células efectoras, como macrófagos, neutrófilos y NK. Una vez que estas células son activadas por el IFN- $\gamma$ , expresan receptores para el Fc- $\gamma$  de los anticuerpos de clase IgG. El IFN- $\gamma$  también induce la formación de IgG1 e IgG3, por los linfocitos B; estos anticuerpos pueden opsonizar al microorganismo y fijar complemento por la vía clásica, lo que genera C3b el cual queda depositado en la superficie del parásito y también funciona como opsonina favoreciendo la fagocitosis. También se liberan el C3a y el C5a que actúan como factores quimiotácticos, promoviendo inflamación. Las NK activadas por el IFN- $\gamma$  despliegan Fc- $\gamma$ RIII, el cual une a estas subclases y median citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) matando a los taquizoitos (Ben et al., 2015). Por lo tanto, se esperaría que tanto el IFN- $\gamma$ , como los anticuerpos IgG1 e IgG3 estuvieran relacionados con la protección en humanos y que la transmisión vertical de *T. gondii* fuera menor al final del embarazo que al principio; asimismo el IFN- $\gamma$  y los anticuerpos IgG1 e IgG3 deberían al feto del daño ocasionado por la infección. Sin embargo, la transmisión vertical de *T. gondii* aumenta a lo largo de la gestación de manera paralela el incremento del transporte de IgG de la madre al feto, lo cual es paradójico. Además, en un estudio que realizamos con muestras de suero en binomios de mamás con y sus recién nacidos, encontramos una mayor frecuencia de IgG1 en las mamás que transmitieron la infección y cuyos bebés presentaron problemas clínicos, que en aquellas cuyos hijos nacieron clínicamente sanos (Cañedo et al., 2008). Una explicación es que el reconocimiento de los taquizoitos de *T. gondii* por los anticuerpos IgG1 favorece su

entrada a compartimentos no lisosomales de los endotelios fetales en las vellosidades coriónicas, “concentrando” a los parásitos y aumentando así la carga parasitaria que llega al feto, lo que ocasionaría cuadros más severos. Otra posibilidad es que los parásitos recubiertos por anticuerpos IgG1, son reconocidos por el FcRn e internalizados a la célula por endocitosis, por el mismo mecanismo para transportar los anticuerpos IgG a través de endosomas, inhibir la acidificación y liberarse de los anticuerpos e inmediatamente formar su propia vacuola parasitófora para su replicación y evitar la fagocitosis. Esto nos lleva a proponer que las células endoteliales de la placenta podrían ser una vía importante en la transmisión de *T. gondii* mediada por FcRn.

Por otra parte, la virulencia del parásito es un factor importante en la invasividad y diseminación en la toxoplasmosis adquirida. En la toxoplasmosis congénita, al igual que en la adquirida, los parásitos tipo II (de virulencia baja) son los más frecuentes a nivel mundial. Por lo anterior, esperaríamos diferencias del efecto de los anticuerpos en la internalización a células endoteliales entre cepas virulentas y no virulentas, lo cual no ha sido analizado.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La sensibilización de los taquizoitos de *T. gondii* por anticuerpos IgG1 favorece su entrada a células endoteliales que expresan el FcRn?

### **HIPÓTESIS**

La internalización a las células endoteliales por taquizoitos de *T. gondii* sensibilizados con anticuerpos IgG1 será mayor que aquella de parásitos libres de anticuerpos.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo General***

Determinar el papel que tiene la sensibilización de los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* sobre su ingreso a las células endoteliales venosas de cordón umbilical humano (HUVEC) y de microvasculatura (HMEC-1).

### ***Objetivos específicos***

1. Determinar el efecto de la dosis y la virulencia de *Toxoplasma gondii* sobre la entrada a las HUVEC y las HMEC-1, como modelos de células endoteliales.
2. Demostrar la expresión del FcRn en células endoteliales HUVEC y HMEC-1.
3. Demostrar la sensibilización de los taquizoitos de las cepas RH (virulenta) y ME49 (no virulenta) de *T. gondii* por anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Tipo de estudio***

Básico, experimental, prospectivo

### ***Diseño general del estudio***

La figura 14 muestra la estrategia general del trabajo. Se hicieron experimentos con dos cepas de *T. gondii*: la RH, aislada de un niño con infección diseminada que es de alta virulencia en ratones, y la ME49, aislada de un borrego, que es de baja virulencia en ratones (Howe y Sibley, 1995; Høgdall et al., 2000). Como modelos de estudio *in vitro*, se utilizaron cultivos primarios de células endoteliales de cordón umbilical

humano (HUVEC) y de la línea celular semi-inmortaliza, HMEC-1 (CDC/USA) proveniente de microvasculatura humana (Ades et al., 1992; Baudin et al., 2007). Se identificó la expresión del mRNA del FcRn por el método de retro-transcripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), así como de la proteína por citometría de flujo e inmunofluorescencia confocal, en ambos tipos celulares. Se determinó la relación parásito: célula y el tiempo de interacción para la invasión de células HUVEC y HMEC-1 con taquizoitos de ambas cepas, suficientes para infectar ambos tipos celulares en tiempos menores a cuatro horas, que es cuando inicia la replicación de los taquizoitos. El grado de infección se midió observando al microscopio óptico las células teñidas con Wright; se contó la proporción de células infectadas, y en éstas, el número de vacuolas por célula.

Posteriormente los taquizoitos RH y ME49 fueron sensibilizados con anticuerpos IgG1 *anti-T. gondii* y se evaluó su internalización en comparación con parásito tratados con suero negativo; se utilizó un grupo no tratado (PBS) como testigo de invasividad de los taquizoitos. La invasión de las células se analizó por microscopía óptica en laminillas teñidas con tinción de Wright.

### ***Criterios de selección de las muestras de cordón umbilical***

#### **Criterios de inclusión**

Se incluyeron muestras de cordón de recién nacidos cuyas madres tuvieron parto eutócico vaginal o por cesárea de elección, a las 36 a 40 semanas de gestación con evolución materno-fetal normal.

### Aspectos éticos

Las muestras de cordón umbilical se tomaron después del parto, por lo que no se consideró procedimiento invasivo. El estudio fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética en Investigación y de Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Pediatría, con números de registro 037/2007 y 060/2011. Los cordones umbilicales fueron solicitados como donación a las mamás antes de los partos, a quienes se les informó del proyecto y se les solicitó una muestra de cordón umbilical; si estaban de acuerdo firmaron la carta de consentimiento informado.

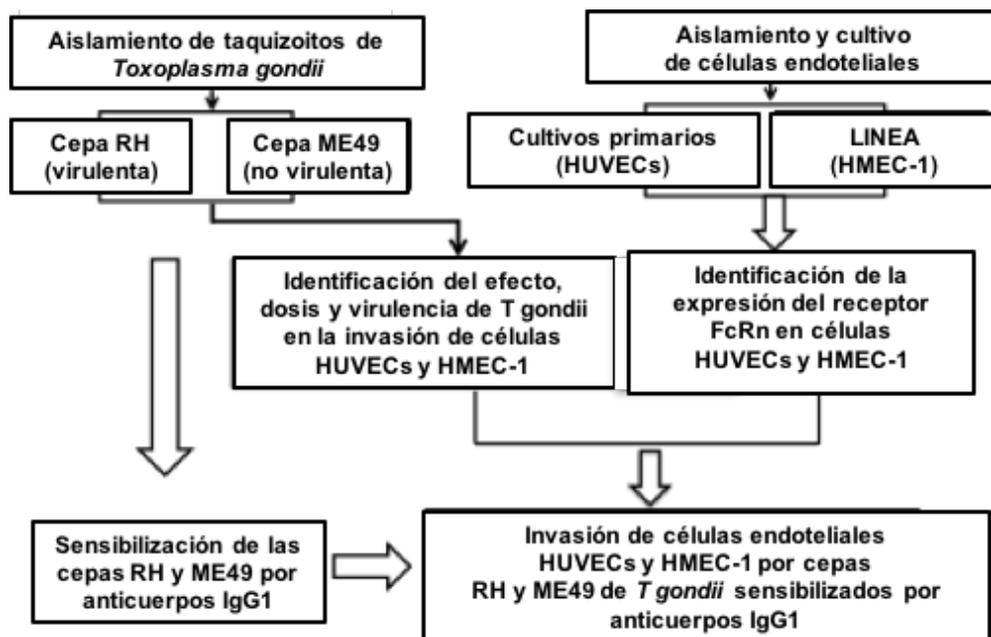


Figura 14

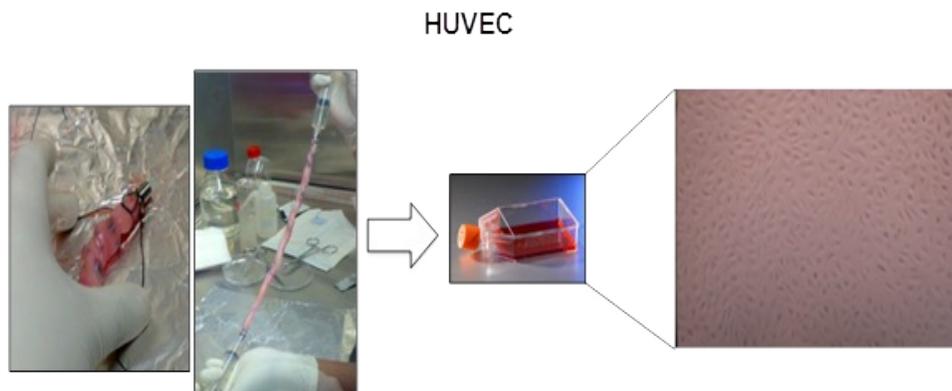
Flujograma de la estrategia para el desarrollo del trabajo experimental

## ***Métodos de laboratorio***

### **Aislamiento y cultivos primarios de células endoteliales venosas de cordón umbilical humano (HUVECs)**

Las células HUVEC son células de la vena del cordón umbilical (macrovasculatura), originalmente aisladas por Jaffe et al., 1972. Se obtuvieron muestras de cordón (~100g) de partos de embarazos sanos de 36 a 40 semanas de gestación sin complicaciones en embarazos previos. Todas las mujeres aceptaron donar una fracción del cordón umbilical de sus hijos recién nacidos, en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado proveniente de diversos hospitales, como el del Hospital Belisario Domínguez y del Hospital de Ginecología y Obstetricia 4 del Seguro Social (IMSS), a través del Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN). El aislamiento y cultivo de las células endoteliales fue llevado a cabo de acuerdo al método de Páez et al., 2005. Brevemente, los cordones fueron transportados en medio de cultivo M199 (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA), y las células endoteliales aisladas del cordón umbilical por digestión del interior de la vena umbilical con 0.02% de colagenasa tipo II (Roche, Hertfordshire, UK); fueron cultivadas en placas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> en medio M199 completo, suplementado con 20% de suero de bovino fetal (Hyclone Logan, Utah, USA), antibióticos/antimicóticos (100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL anfotericina) (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA), 2 mM de L-glutamina y 5 UI/mL de heparina sódica (Hep-Tec, Tecnoforma, S.A. de CV), en presencia del factor de crecimiento endotelial bovino (Roche, IN, USA) a una concentración de 40 µg/mL. Las células fueron incubadas en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 6% a 37°C hasta formarse una monocapa.

Posteriormente, las células fueron recuperadas por incubación con 0.05% Tripsina/5 mM de EDTA (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) durante 5 minutos 37°C, inactivando después la acción de la tripsina con medio de cultivo M199 que contiene suero fetal al 2.5 % (el cual posee alfa 1-anti-tripsina, que la neutraliza) y una mezcla de antibióticos/antimicóticos. Las células recuperadas fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 7 minutos, re-suspendidas en 1-2 mL de medio y resembradas nuevamente en cajas de cultivo. Esta resiembra y las consecutivas, tuvieron como finalidad la proliferación y purificación de las células endoteliales hasta alcanzar >90% de pureza y descartar otros tipos celulares provenientes de la muestra (Jaffe et al., 1973; Baudin et al., 2007) (figura 15).



*Figura 15*

*Aislamiento y cultivo de HUVECs: Colocación de adaptadores metálicos quirúrgicos al cordón umbilical; lavado de vena umbilical con HEPES e incorporación de la collagenasa para la digestión de las células HUVEC; a la derecha, una foto representativa de cultivo confluyente, visto en microscopio invertido en contraste de fases aumento 20X*

## Cultivo de la línea semi-inmortal de células endoteliales de microvasculatura HMEC-1

Las células HMEC-1 (CDC/USA) son células endoteliales de microvasculatura humana, que forman una línea celular estable y semi-inmortalizada, obtenida y transformada en 1992 por Ades et al (1992). Las HMEC-1 fueron cultivadas en medio MCDB131 (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 10 mM, factor de crecimiento endotelial bovino 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Roche, IN, USA), hidrocortisona 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una mezcla de penicilina G sódica (100 UI/mL), estreptomina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y anfotericina B (0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA). Las células fueron incubadas en un ambiente de  $\text{CO}_2$  al 6% a 37°C hasta formar una monocapa; posteriormente fueron recuperadas con 0.25% tripsina/5 mM de EDTA (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) y resembradas en cajas de cultivo (figura 16).

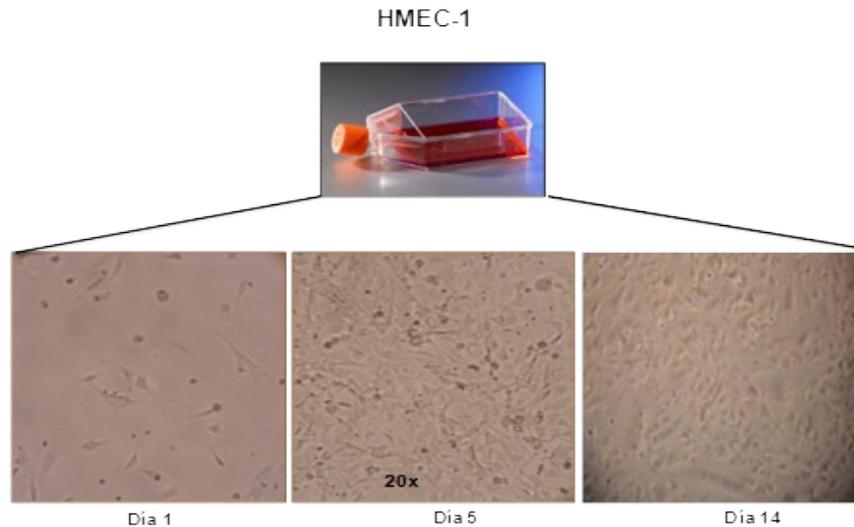


Figura 16

*Cultivo de células endoteliales de microvasculatura (HMEC-1), micrografías de las células, visto con microscopio invertido en contraste de fases a las 24 h, y a los 5 y 14 días; aumento 20x.*

La pureza de las células endoteliales fue verificada utilizando un marcador específico de células endoteliales, el CD105 (endoglina o receptor del TGF- $\beta$ ) que es una proteína de membrana celular asociada a proliferación (Duff et al., 2003; Warrington et al., 2005). Se usó un anticuerpo anti-CD105 humano producido en ratón y acoplado al fluorocromo aloficocianina (APC) (BioLegend, San Diego, CA, USA) a una dilución 1:50 (25 $\mu$ g/mL). La reacción específica con el anticuerpo fue determinada por citometría de flujo y microscopía confocal.

### **Obtención de taquizoitos de *Toxoplasma gondii***

Los taquizoitos de la cepa RH -virulenta- fueron mantenidos por pases en ratones BALB/c, los cuales son más resistentes a la infección aguda. Los ratones C57BL6 RAG2 -/- se usaron para la cepa menos virulenta (ME49), ya que son más susceptibles. Los ratones se infectaron vía intraperitoneal con una dosis de  $3 \times 10^6$  taquizoitos contenidos en 500  $\mu$ L de solución salina 0.15M amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.2 (PBS); cuatro días después de la infección, se llevó a cabo el lavado del peritoneo con 3 mL de PBS. Con el fin de purificar y propagar los taquizoitos recolectados de los animales, se inocularon en cultivos confluentes de células Vero contenidos en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>; éstos se mantuvieron en medio de cultivo RPMI1640, adicionado con 10% de suero de bovino fetal, a 37°C en una incubadora con 7% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Finalmente se cosecharon, se re-suspendieron en PBS y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min; el botón de los taquizoitos fue re-suspendido en medio de invasión que consiste en medio M199

suplementado con suero fetal bovino al 10%, para infectar a las células HUVEC, y medio MCDB131 suplementado con suero fetal bóvido al 5% para infectar a las células MHEC-1 (figura 17) (Saadatnia et al., 2010).

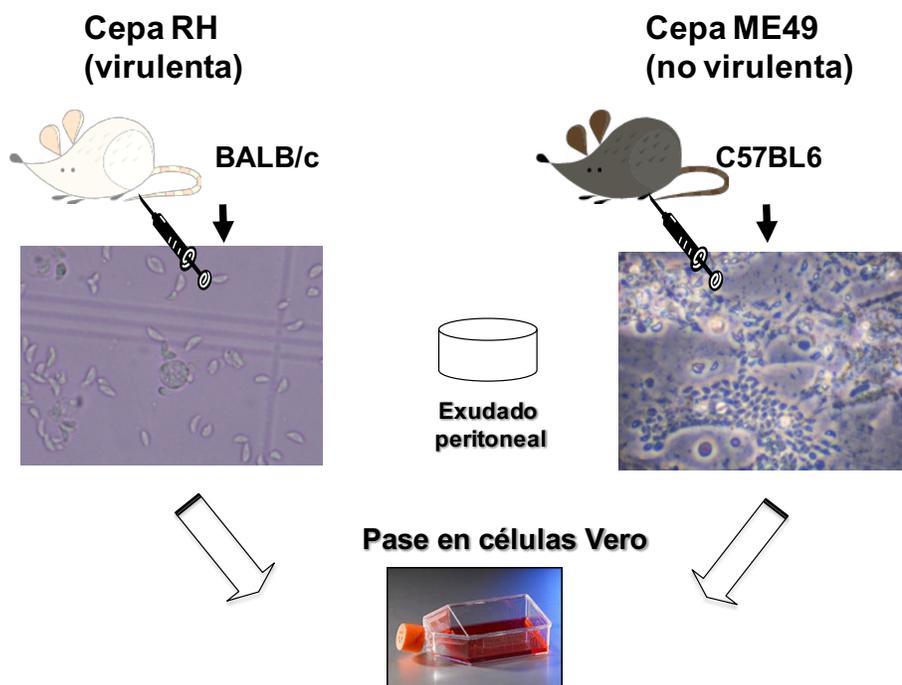


Figura 17

Obtención de taquizoitos de las cepas RH (a) y ME49 (b) obtenidas de peritoneo de ratones Balb/c y C57BL/6 “knock out” para RAG-2, respectivamente, utilizados para infectar células HMEC-1 y HUVECs.

## Expresión del RNA mensajero del FcRn en las células endoteliales HUVEC y HMEC-1

### Por RT-PCR en tiempo real

Para identificar los niveles de mRNA del FcRn mediante RT-PCR en tiempo real, se seleccionó un juego comercial de oligonucleótidos y sonda marcada con un fluorocromo de TaqMan (Applied Biosystems) que amplifica las regiones que flanquean al intrón 3 del gen de la cadena  $\alpha$  (figura 18) y como control endógeno, la beta-2-microglobulina humana ( $\beta_2m$ , Applied Biosystems) con ayuda de la enzima transcriptasa reversa (RT) y oligo d (T).

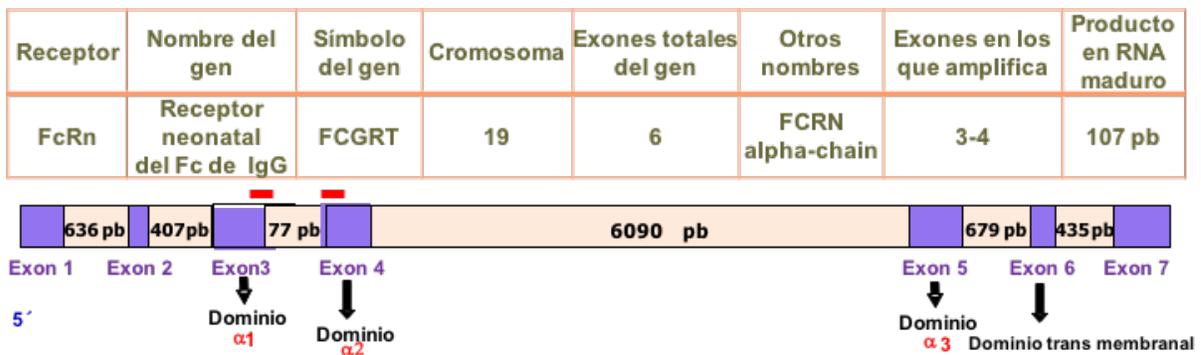


Figura 18

Diagrama del gen de la cadena  $\alpha$  del FcRn (FCGRT) y alineación de oligonucleótidos específicos para el RT-PCR (líneas rojas).

Se aisló el RNA de las células endoteliales HUVECS y HMEC-1 y de vellosidades de la placenta como controles positivos, que expresan este receptor constitutivamente

(Lynden et al., 2001). Para la extracción del RNA se utilizó TRizol (Ambion, Life Technologies) el cual es usado para mantener y aislar el RNA total. Para ello se utilizó una fracción de la vellosidad (entre 0.27 y 0.37 g), que se lavó con PBS pH 7.2 hasta quitar toda la sangre; se agregó 1.0 mL de Trizol, y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Para la disociación completa de las proteínas; se agregaron 0.2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos; se separó la solución acuosa que contiene el RNA y se precipitó con 500µL de isopropanol; se realizaron lavados con etanol al 70% y se re-suspendió en agua libre de nucleasas (con dietil-pirocarbonato al 0.1%). Se cuantificó y determinó la pureza del RNA total leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000) y se verificó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. A partir del RNA total se llevó a cabo la transcripción reversa (RT) para la obtención del cDNA, empleando un estuche comercial TaqMan Gold RT-PCR que contiene transcriptasa reversa y un oligo d(T) para retro-transcribir preferencialmente mRNA. De acuerdo al instructivo de transcriptasa reversa de Applied Biosystems, Life Technologies, se utilizaron 0.4 µg de RNA total para un volumen de 20 µL. En este caso se prepararon 20 reacciones: agua inyectable 3.85 µL; amortiguador TaqMan RT 1.0µL; cloruro de magnesio 2.2µL; deoxiNTPs 2.0µL; oligo d (T) 0.5µL; inhibidores de RNAasa 0.2µL y se utilizaron 0.25 µL de la enzima RT. El producto de cDNA se cuantificó en el Nanodrop y se realizó la PCR en tiempo real. Se utilizó el kit comercial MGB TaqMan [Applied Biosystems que contiene la sonda del FcRn marcada con el fluorocromo

FAM (Hs01108967\_m1, FAM-MGB)] y el control endógeno fue la beta-2-microglobulina humana ( $\beta_2m$ ) marcada con el fluorocromo VIC (NM\_004048.2, VIC-MGB). Para un volumen de 10  $\mu$ L de la reacción se usaron 5  $\mu$ L de la solución *Master Mix* (2X TaqMan Gene Expression), 1.25  $\mu$ L que equivalen a 250 nM de la sonda FCGRT, 2.5  $\mu$ L de la sonda B2M TaqMan, que equivalen a 900 nM y 250 ng del cDNA de cada tipo celular. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real Step One de Applied Biosystems a las siguientes condiciones: 50°C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos y en seguida 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 min.

### **Expresión de la proteína del FcRn en células HMEC- 1 y HUVECS**

#### ***Por Inmunofluorescencia confocal***

Ambos tipos celulares HMEC-1 y HUVEC fueron sembrados sobre cubreobjetos de 15 mm de diámetro, contenidos dentro de los pozos de las placas de cultivo, durante 72 horas. Una vez formada la monocapa celular, se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se marcaron con 100  $\mu$ L de la mezcla combinada del anti-CD105 con la marca APC a la dilución 1:50 (25  $\mu$ g/mL) y el anticuerpo anti-FcRn (FCGRT) humano producido en conejo (Sigma), diluido 1:100 en PBS; se incubaron a 4° C durante 30 minutos, y se lavaron con PBS, pH 7.2 frío por centrifugación a 1200 rpm durante 7 minutos. Se reveló con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con FITC, diluido 1:100 (2.4  $\mu$ g/mL) incubando a 4°C durante 30 minutos; posteriormente los pozos se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 0.5%. Los cubreobjetos fueron recuperados de los pozos y colocados sobre laminillas para ser

analizados en el microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000 Confocal Laser Scanning Microscope. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 60X con aceite de inmersión y fueron analizadas con el programa FV10-ASW 1.7 View. Para la detección intracelular las células fueron permeabilizadas utilizando un kit comercial (BioLegend). Primero se marcaron con el anti-CD105 a 4°C durante 30 minutos y posteriormente fueron incubadas con la solución FOXP3 Fix/perm durante 20 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se realizó un lavado con PBS y una segunda lavada con FOXP3/perm, I durante 15 minutos; posteriormente las células fueron incubadas con el anticuerpo específico para el FcRn, diluidos con el amortiguador permeabilizante, incubando a 4°C durante 30 minutos en agitación; posterior a la incubación se lavaron dos veces con PBS, y se reveló con un conjugado anti-IgG de conejo marcado con FITC, diluido en amortiguador permeabilizante a 4°C durante 30 minutos. Como control negativo este conjugado se probó posterior a la incubación con un suero no relacionado. Finalmente, las células se lavaron con PBS por centrifugación a 1200 rpm durante 7 minutos y se fijaron con paraformaldehído al 0.5%; los cubreobjetos con las células fijadas fueron extraídos de los pozos y colocados sobre un portaobjetos; el núcleo de las células se marcó con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en el DNA. Las laminillas fueron analizadas en el microscopio confocal.

### **Por citometría de flujo**

Las células cultivadas en los pozos de las placas, se les realizó un lavado con solución de HEPES y fueron recuperadas con tripsina/5mM EDTA al 0.05% para las HUVEC y 0.25% para las HMEC-1, inactivando el efecto de la tripsina con medio de transporte. Las células fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 7 minutos. Se llevó a cabo el doble marcaje con 100 µL de la mezcla combinada con el anti-CD105-APC a la dilución 1:50 (25 µg/mL) y el anticuerpo anti-FCGRT humano producido en conejo (Sigma) diluido 1:100 en solución amortiguadora de PBS pH 7.2 a 4°C durante 30 minutos. Después del tiempo de incubación con los anticuerpos, se detuvo la reacción con PBS, centrifugadas a 1200 rpm durante 7 minutos y fijadas con paraformaldehído al 0.5 % a 4°C durante 30 minutos para su análisis con el citómetro de flujo FACS Aria (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) y analizadas con el programa FLOWJO™ (San José CA, USA (BD Biosciences)).

### **Sensibilización de las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii* con anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma**

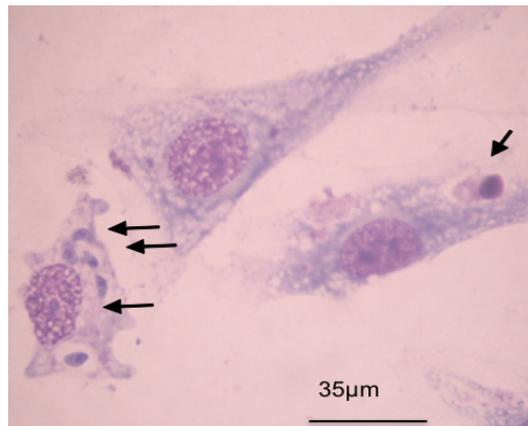
Para sensibilizar a los taquizoitos de ambas cepas RH y ME49 de *T. gondii*, los parásitos fueron incubados con un anticuerpo IgG1 humano anti-Toxoplasma, el cual consiste de una mezcla de sueros de individuos que solo fueron positivos para la subclase IgG1 y ninguna otra subclase de IgG, o para IgM o IgA (probado previamente por ELISA). Los controles negativos fueron incubados con un suero humano negativo a *T. gondii*. Ambos sueros se usaron diluidos 1:1600; la incubación fue a 4°C durante 30 minutos en agitación leve. El revelado se hizo con un conjugado

de ratón anti-IgG humana-PeCy5 diluido 1:50 e incubado en las mismas condiciones. La reacción fue detenida con PBS y centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos; los núcleos de los taquizoitos fueron marcados con el DAPI y fijados con paraformaldehído al 0.5%. Se tomó una fracción de 50µL de la suspensión de taquizoitos sensibilizados y se fijó en laminillas, que fueron analizadas en el microscopio confocal como se detalló anteriormente; el resto de la suspensión de taquizoitos fue analizado por citometría de flujo.

### **Cinética de invasión de células endoteliales HUVEC y HMEC-1 por las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii***

Para determinar las condiciones más adecuadas para los experimentos, se probaron diferentes relaciones parásito: célula y tiempos de interacción, con ambas cepas y ambos tipos celulares. Se llevó a cabo un ensayo de invasión en placas de cultivo de 24 pozos, los cuales contenían los cubreobjetos de 15mm de diámetro, en cada uno de los cuales se cultivaron 100,000 células; se adicionaron los taquizoitos suspendidos en 400 µL de medio de invasión, que se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente a 37°C y 7% de CO<sub>2</sub> durante distintos tiempos. El ensayo fue detenido con 300µL de HEPES y los parásitos no adheridos o que no invadieron a las células fueron removidos con el sobrenadante y recuperados en tubos para ser analizados posteriormente. La invasión fue completamente detenida por fijación con metanol al 70% en frío durante 10 minutos (Morisaki et al., 1995; Kafsack, 2007). Las células fueron teñidas con 300µL solución de colorante Wright durante 3 minutos, luego se lavaron con 300µL de agua

corriente, la cual se dejó otros 3 minutos para lograr un contraste de la tinción; finalmente las placas se lavaron 3 veces con 1mL de agua destilada y se dejaron secar al aire para su evaluación posterior. El grado de infección se midió observando al microscopio óptico las células teñidas; se contó el número de vacuolas por célula. En la figura 19 se muestra un ejemplo de las micrografías de las células HUVEC infectadas con taquizoitos de la cepa ME49 de *T. gondii*. Se pueden observar los parásitos dentro de su vacuola parasitófora, con lo que se puede determinar el número de taquizoitos que entran a cada célula.



*Figura 19*

*Micrografía de células HUVECs, teñidas con Wright, infectadas con taquizoitos de la cepa ME49 de T. gondii. Los taquizoitos se encuentran dentro de vacuolas parasitóforas marcadas con flechas.*

Para determinar si el uso de antibióticos afecta el grado de invasión, se llevaron a cabo experimentos de invasión en presencia y ausencia de antibióticos en el medio de invasión a una relación parásito: célula de 10:1, que fue la dosis seleccionada para los siguientes ensayos (ver adelante en resultados).

## **Invasión de células HUVEC y HMEC-1 por taquizoitos sensibilizados con anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma y marcados con la CFSE**

### ***Por citometría de flujo***

Con el propósito de contar con un método que permitiera contar miles de células en lugar de decenas y que fuera más rápido, los taquizoitos de ambas cepas fueron marcados con el carboxi fluorescein succimidil ester (CFSE), por medio de un kit comercial de Life Technology Cell Trace™ 492/517nm. La marca con el CFSE se utilizó presuponiendo que ésta no afectaba al parásito, lo que fue corroborado en cuanto a su movilidad y viabilidad. Para marcar a los taquizoitos se utilizó a una concentración de 5µM incubando a 37°C y 7% de CO<sub>2</sub> durante 7 minutos, deteniendo la reacción con PBS y centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Posteriormente se llevó a cabo la sensibilización de los taquizoitos; para ello, fueron incubados con el suero positivo a anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma; como controles se usaron taquizoitos incubados con suero negativo y otros con PBS. La incubación fue a 4°C durante 30 minutos y se detuvo la reacción del anticuerpo con lavados con PBS y centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos; posteriormente los taquizoitos fueron resuspendidos en PBS con suero fetal al 5%. La interacción parásita: célula fue a una relación 10:1, durante 2 h a 37°C y sin el uso de antibióticos en medio de invasión; se realizó por triplicado. La reacción fue detenida agregando 300 µL de solución amortiguadora de HEPES y haciendo un segundo lavado con la misma solución amortiguadora. En todos los experimentos se tomó una fracción de taquizoitos del sobrenadante antes y después de la invasión para analizar la viabilidad y la persistencia de la sensibilización por los anticuerpos IgG1; para ello,

los taquizoitos se centrifugaron e incubaron con el conjugado PeCy5-anti-IgG humana diluido en las condiciones mencionadas anteriormente, y se analizaron por microscopía óptica en el hemocitómetro, microscopía confocal y citometría de flujo.

Para el análisis por citometría de flujo, las células infectadas fueron removidas de los pozos con tripsina-EDTA y marcadas con el anticuerpo anti-CD105-APC como se detalló anteriormente. Para el análisis por microscopía confocal, se realizaron las reacciones mencionadas anteriormente en las laminillas dentro de los pozos, sin despegar las células con tripsina.

#### **Internalización de taquizoitos sensibilizados con anticuerpos IgG1 anti-*Toxoplasma* y marcados con la CFSE a las células endoteliales**

Debido a que se observó un incremento en los porcentajes de invasión con los taquizoitos marcados con la CFSE, en las tres condiciones (cuadro 1), se repitió el ensayo utilizando células HMEC-1 con taquizoitos marcados y no marcados, utilizando la misma metodología. Las células infectadas fueron teñidas con solución de Wright y los cubreobjetos fueron extraídos de los pozos y fijados sobre portaobjetos y observadas por microscopio de luz. El grado de infección se midió contando el número de vacuolas por célula.

#### **Efecto de la sensibilización de *Toxoplasma gondii* por anticuerpos IgG1 en la internalización a las células endoteliales humanas HMEC-1**

Se llevó a cabo la invasión de células HMEC-1 con taquizoitos de ambas cepas sin teñir, de acuerdo a la metodología establecida. Se determinó la viabilidad de los taquizoitos antes de ponerlos en las tres condiciones: a) taquizoitos sin ningún

tratamiento, usados como control de invasión del ensayo, disueltos en PBS pH 7.2; b) sensibilizados con anticuerpos IgG1 anti-toxoplasma; c) incubados con suero negativo (como control de un suero); la incubación a 4°C durante 30 minutos, después de lo cual se ajustó la cantidad de taquizoitos para mantener la relación 10:1 de parásitos viabiles en ese momento. Todos los ensayos se hicieron durante 2 horas a 37°C, antes de los lavados y examen al microscopio óptico.

### ***Análisis de resultados y estadística***

De cada pozo se contaron al menos 100 células de manera sistemática, y se determinó el porcentaje de células invadidas y el número de vacuolas por cada célula infectada; esto lo realizó un lector cegado a las condiciones experimentales de cada laminilla. Para los experimentos del efecto de sensibilización, también se calculó el número de parásitos por cada 100 células.

Dado que no hubo distribución normal ni homogeneidad de varianzas, las diferencias entre medidas de tendencia central de la proporción de células infectadas y del número de parásitos por célula, se compararon entre dos o más grupos, midiendo la significancia estadística por U de Mann Whitney y Kruskal Wallis, respectivamente. No fue posible analizar cuantitativamente los resultados de la microscopía confocal, por lo que no se hizo análisis estadístico.

## RESULTADOS

### ***Expresión del RNA mensajero del FcRn (cadena $\alpha$ ) en las células endoteliales HUVEC y HMEC-1***

En la figura 20A se muestra la expresión del mRNA del FcRn por las células HUVEC, las HMEC-1 y las vellosidades placentarias (Lynden et al., 2001). En las células HMEC-1, los valores relativos del mRNA del FCGRT fueron más altos que en las células HUVEC y las vellosidades; el índice entre el FCGRT y la  $\beta_2m$  fue homogéneo entre células HMEC-1 de diferentes cultivos y mayor que en los otros tipos celulares con significancia estadística (Figura 20A y 20B). El control  $\beta_2m$  endógena fue homogénea (Figura 20C), lo cual indica que las diferencias no se debieron a cantidades o calidad del mRNA. En el caso de las células HUVEC hubo variación en la expresión de la cadena  $\alpha$  entre individuos y entre las vellosidades y las HUVEC del mismo individuo (Figura 20D).

### ***Expresión de la proteína del FcRn en células HMEC- 1 y HUVECs***

#### ***Inmunofluorescencia confocal***

En la Figura 21 se observa que tanto las células HMEC-1 como las HUVEC expresan la cadena  $\alpha$  del FcRn. Cabe mencionar que la marca con mayor fluorescencia verde se observa principalmente en el interior de las células, de manera difusa o en cúmulos compatibles con vesículas (endosomas) y en ciertos sitios en la superficie. Esto es contrario al CD105 cuya fluorescencia es intensa en la superficie.

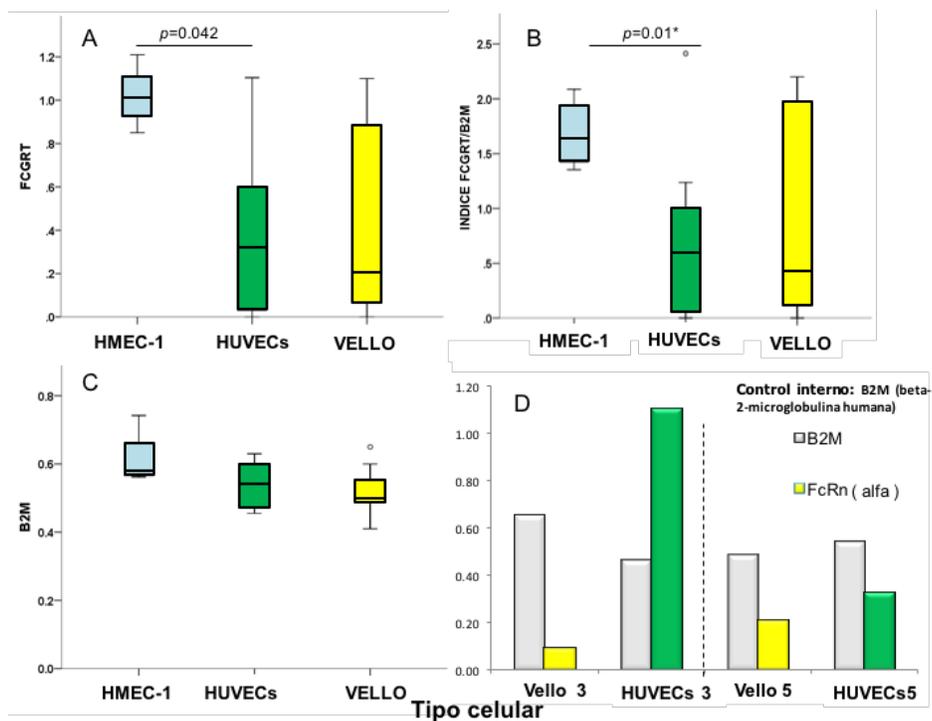


Figura 20

Expresión del mRNA del FcRn (FCGRT) y de  $\beta_2m$  por RT-PCR semi-cuantitativo. En A y C, se muestra los valores absolutos y en B, el índice entre el FCGRT y la  $\beta_2m$ , determinados en cultivos de células HMEC-1 ( $n=4$ ) o HUVECs y vellosidades ( $n=7$  cada una). Se calculó la significancia estadística por la prueba de U de Mann-Whitney. \*Esta diferencia se calculó excluyendo el valor extremo superior; el valor incluyéndolo fue  $P=0.074$ .

### Citometría de flujo

Los resultados de la citometría de flujo confirman la expresión del FcRn en las células HUVEC (Figura 22); no así en las HMEC-1, en las cuales la reacción con el suero anti-FcRn es similar a la del suero negativo. Se observa que la marca de CD105 también es menor en las HMEC-1 que en las HUVEC (Figura 22 panel inferior). Esto contrasta con lo encontrado por microscopía confocal, en donde se observa una marca similar del FcRn y el CD105 entre los dos tipos celulares (Figura 22).

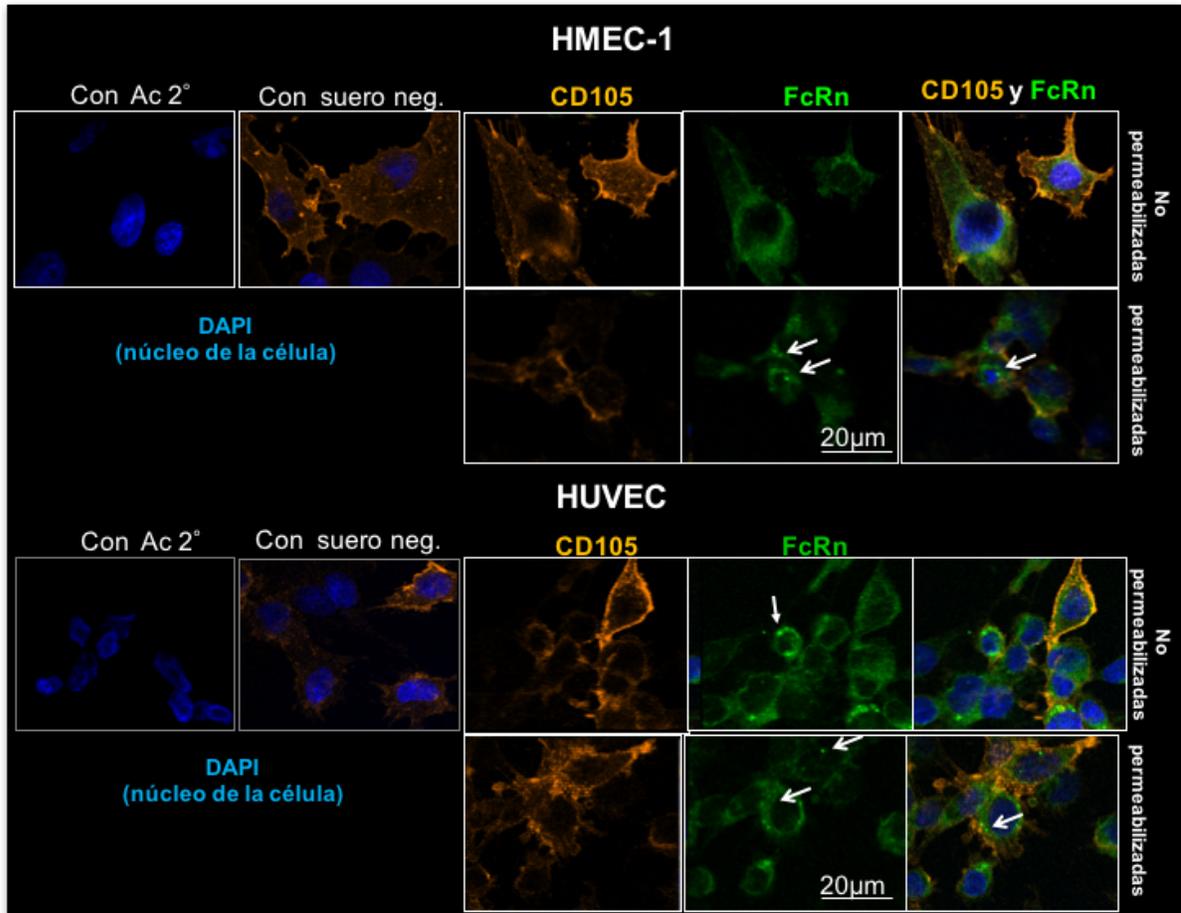


Figura 21

Identificación del FcRn (verde) en células HMEC-1 y HUVEC, utilizando un anticuerpo primario anti-FcRn humano, revelado con un anticuerpo secundario anti-IgG conejo marcado con FITC (verde); el marcador específico de células endoteliales (CD105) pegado a un fluorocromo (APC) . Los núcleos de las células fueron marcados con DAPI (azul). El FcRn se observa en algunas vesículas marcadas con flechas.

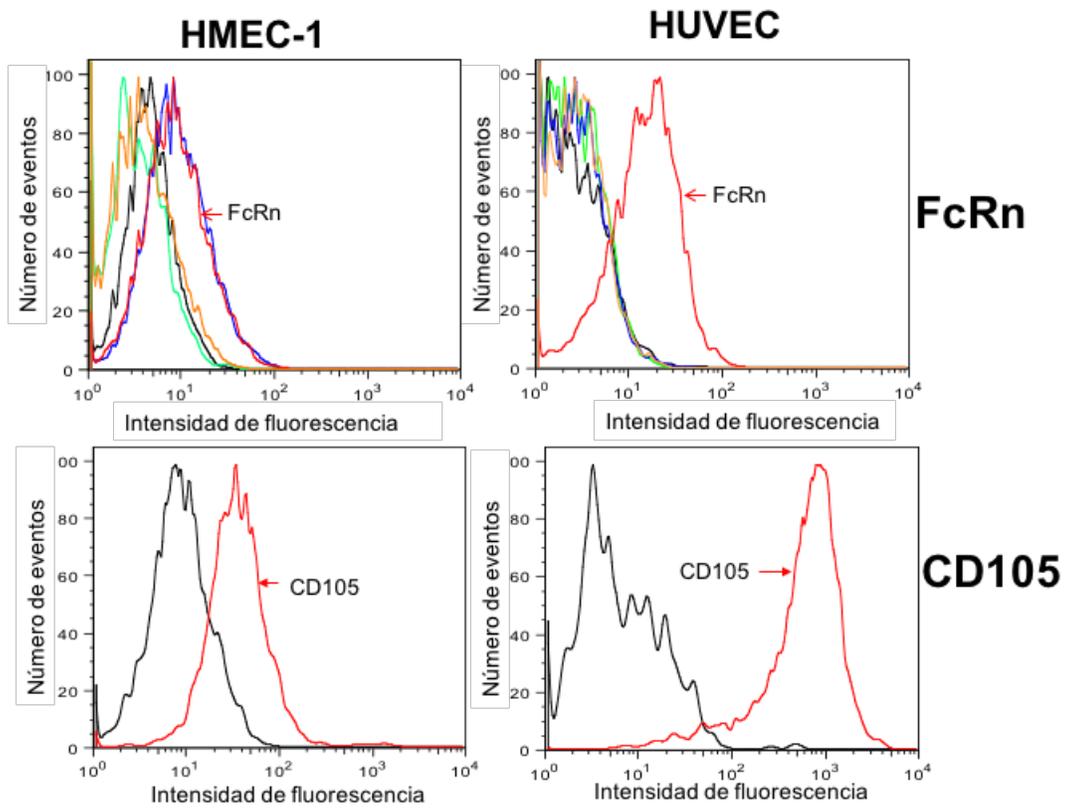


Figura 22

Arriba Identificación del FcRn en células HMEC-1 y HUVEC medido por citometría de flujo, utilizando el anticuerpo específico anti- FcRn humano, en líneas rojas a la derecha; a la izquierda se muestran los controles: con suero negativo (línea azul); anticuerpo primario no relacionado (línea naranja); solo anticuerpo secundario (línea verde); y autofluorescencia (línea negra). Abajo identificación del CD105 (específico de células endoteliales), en ambos tipos celulares con un anti-CD105 con fluorocromo APC (línea roja, a la derecha), a la izquierda es la autofluorescencia (línea negra).

## **Sensibilización de taquizoitos de las cepas RH y ME49 por anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma**

En las figuras 23 y 24 se observa la sensibilización de los taquizoitos de ambas cepas con anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma, los cuales se unieron a la superficie parasitaria. Los taquizoitos permanecieron sensibilizados por lo menos durante dos horas, tiempo utilizado en los experimentos de interacción con las células (ver más adelante). También por citometría de flujo fue confirmada la sensibilización de ambas cepas de *T. gondii*, como se puede observar en la Figura 25.

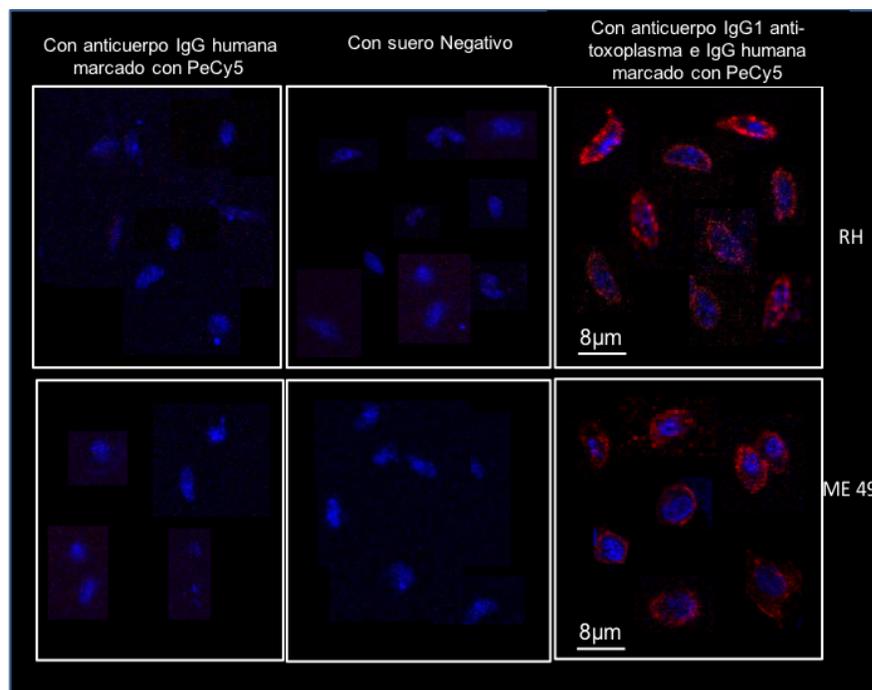


Figura 23

*Sensibilización de los taquizoitos RH y ME49 de T. gondii. De izquierda a derecha taquizoitos incubados con suero negativo; incubados con el anticuerpo secundario anti-IgG humana acoplado a PeCy-5 (marca roja) diluido 1:50 y taquizoitos incubados con el anticuerpo IgG1 anti-Toxoplasma dilución 1:1600 y revelado con el anticuerpo secundario. El núcleo de los taquizoitos en azul por el DAPI. Evaluada por microscopía confocal.*

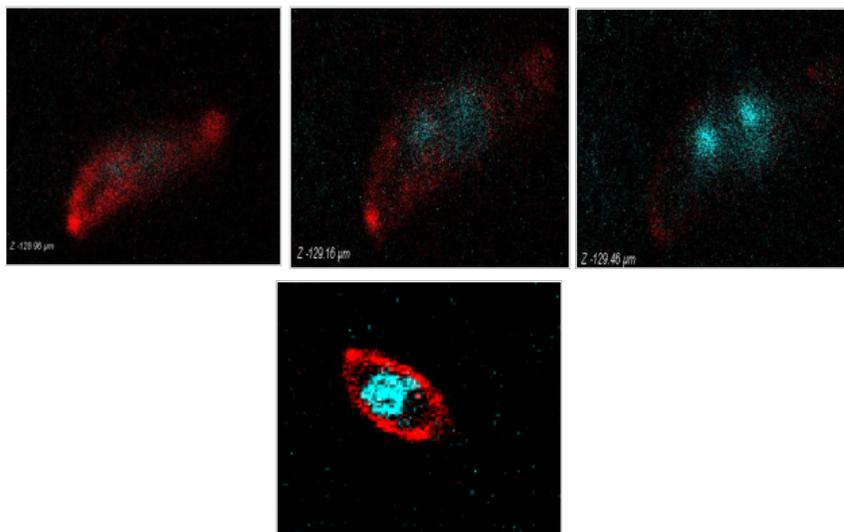


Figura 24

Imágenes de microscopía confocal de la sensibilización de los tachizoitos RH de *T. gondii* con anticuerpos IgG1 humana anti-*Toxoplasma*, dilución 1:1600 y revelado con un conjugado anti-IgG humana acoplado a PeCy-5 (marca roja) diluido 1:100. Panel superior, de izquierda a derecha, cortes en Z a diferentes profundidades de un tachizoito. Foto inferior: imagen de otro tachizoito en el que se ve la disposición superficial de la marca. El núcleo se tiñó de azul con DAPI. Evaluada por microscopía confocal a 60X.

### **Cinética de invasión de células endoteliales HUVEC y HMEC-1 por las cepas RH y ME49 de *Toxoplasma gondii***

Los porcentajes de invasión celular usando las relaciones 2:1 y 4:1 durante 60 minutos, fueron menores al 1% (Figura 26). Por lo anterior, se llevó a cabo el ensayo de infección incrementando la relación a 10:1, así como los tiempos de interacción desde 30 minutos hasta 4 horas. En los resultados se pueden observar tres fenómenos: a) que las células HUVEC son más resistentes a la invasión que las HMEC-1; b) que la cepa ME49 de *T. gondii* invade más que la cepa RH a ambos tipos celulares, y c) que los antibióticos tuvieron un efecto inhibitorio de la invasión (Figura 27).

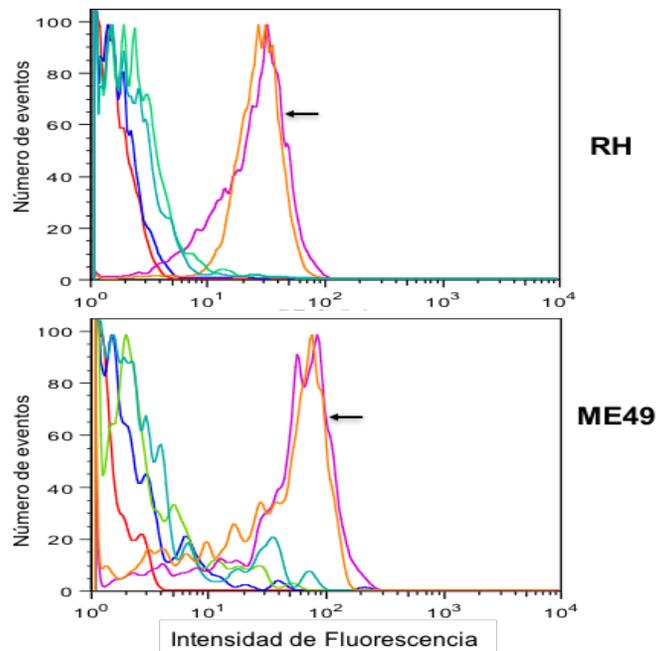


Figura 25

Sensibilización de taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *T. gondii* con una mezcla de sueros que contiene anticuerpos humanos específicos de clase IgG1 diluido 1:200 (línea rosa) y 1600 (línea naranja), revelado con el conjugado IgG humana diluido 1:100 acoplado a PeCy-5 (rojo). Las gráficas de la izquierda son los controles: células incubadas con un suero negativo (línea azul); con sólo anticuerpo secundario (línea verde); la autofluorescencia (línea negra).

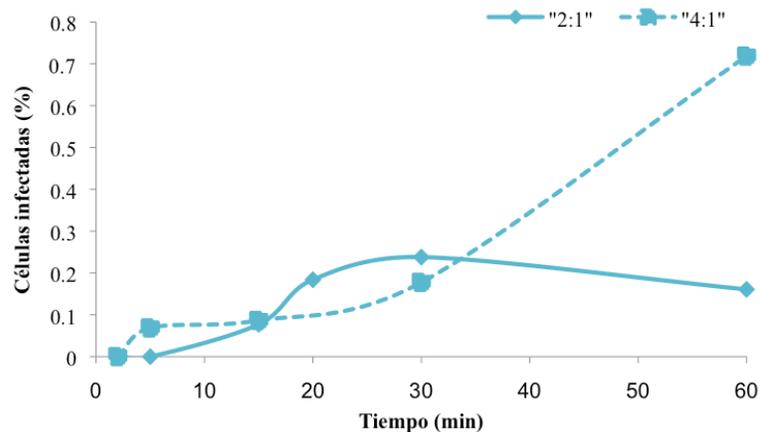


Figura 26

Cinética de invasión de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* a células HUVECs a relación parásito:célula de 2:1 y 4:1

Con base en estos resultados, se decidió utilizar las siguientes condiciones en los ensayos subsecuentes: sin antibióticos-antimicóticos en el medio de invasión, una relación de parásito: célula 10:1 y una incubación de 2 horas, ya que a las 3 y 4 horas no se observa aumento significativo en los porcentajes de invasión; además a las 4 horas podría ocurrir replicación de la cepa RH (Radke et al., 2001; Contreras-Ochoa, 2013). Finalmente, a tiempos menores de 2 horas, podríamos no encontrar o encontrar muy pocas células HUVEC infectadas (Figura 27).

En la figura 28A se muestran ejemplos de las micrografías de células HMEC-1 incubadas con la cepa ME49, y se puede observar que hay células infectadas al lado de células no invadidas. Se puede observar en la figura 28B, que conforme avanza el tiempo de interacción, la cinética de invasión mostró que aumentan el número de parásitos por célula infectada, en lugar de aumentar la proporción de células invadidas. Lo anterior ocurrió en todas las combinaciones, excepto en las HUVEC infectadas con la cepa RH, en las cuales no se observó un aumento significativo en el número de vacuolas, pues el 70-80% de las células invadidas tenían sólo una vacuola aun a las 4 horas; además, todas las vacuolas contenían un solo parásito, lo que indica que no hubo replicación parasitaria (Figura 29).

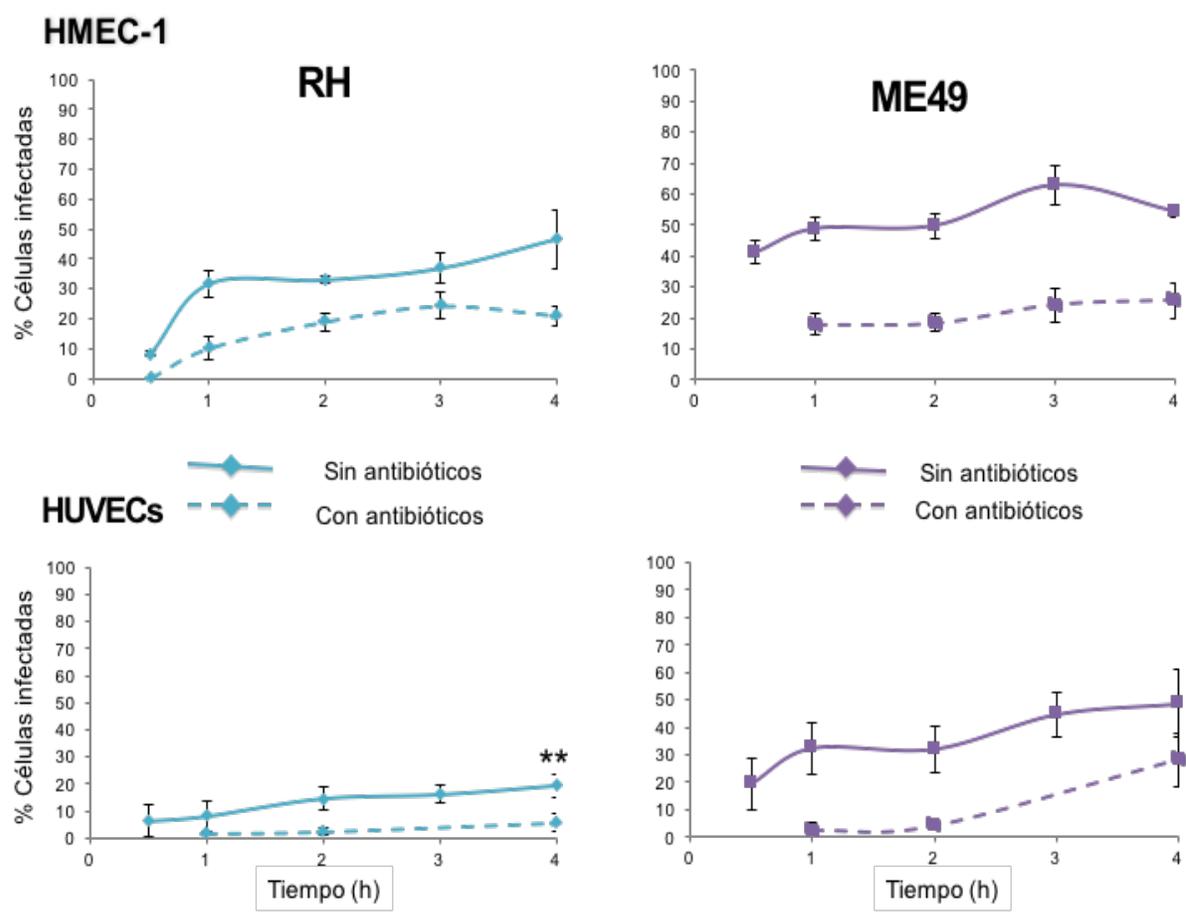
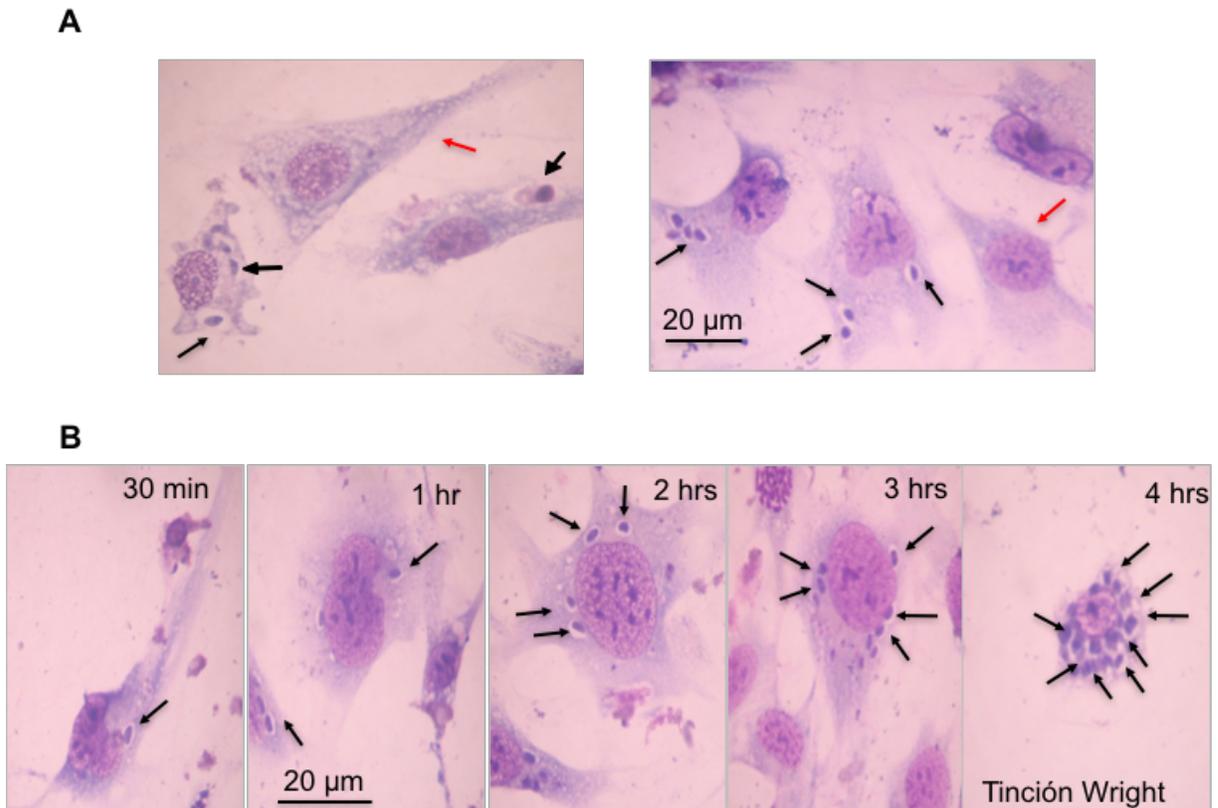


Figura 27

Gráficas comparativas de la cinética de invasión de células HMEC-1 y HUVECs por taquizoítos RH (líneas azules) y ME49 (líneas moradas); con antibióticos (líneas punteadas) y sin antibióticos (líneas continuas). Se usó a relación de parásitos: células 10:1. Los porcentajes de invasión son diferentes entre tipo celular y entre tipo de cepa de *T. gondii*. El porcentaje de invasión en HUVECs con la cepa RH (\*\*), es significativamente diferente de los otros tres grupos a lo largo del tiempo (Kruskal-Wallis,  $P < 0.01$ ), con excepción de HMEC-1 invadidas por la cepa RH a 30 min.



*Figura 28*

*Micrografías de células HMEC-1 infectadas con taquizoitos de la cepa ME49 de T. gondii teñidas con Wright, marcados con flechas, en A: células infectadas con más de un parásito señaladas con las flechas negras y células cercanas sin infección marcadas con flechas rojas. En B células infectadas, aumenta en el número de parásitos por células marcados con las flechas negras conforme al tiempo, vistos por microscopio óptico.*

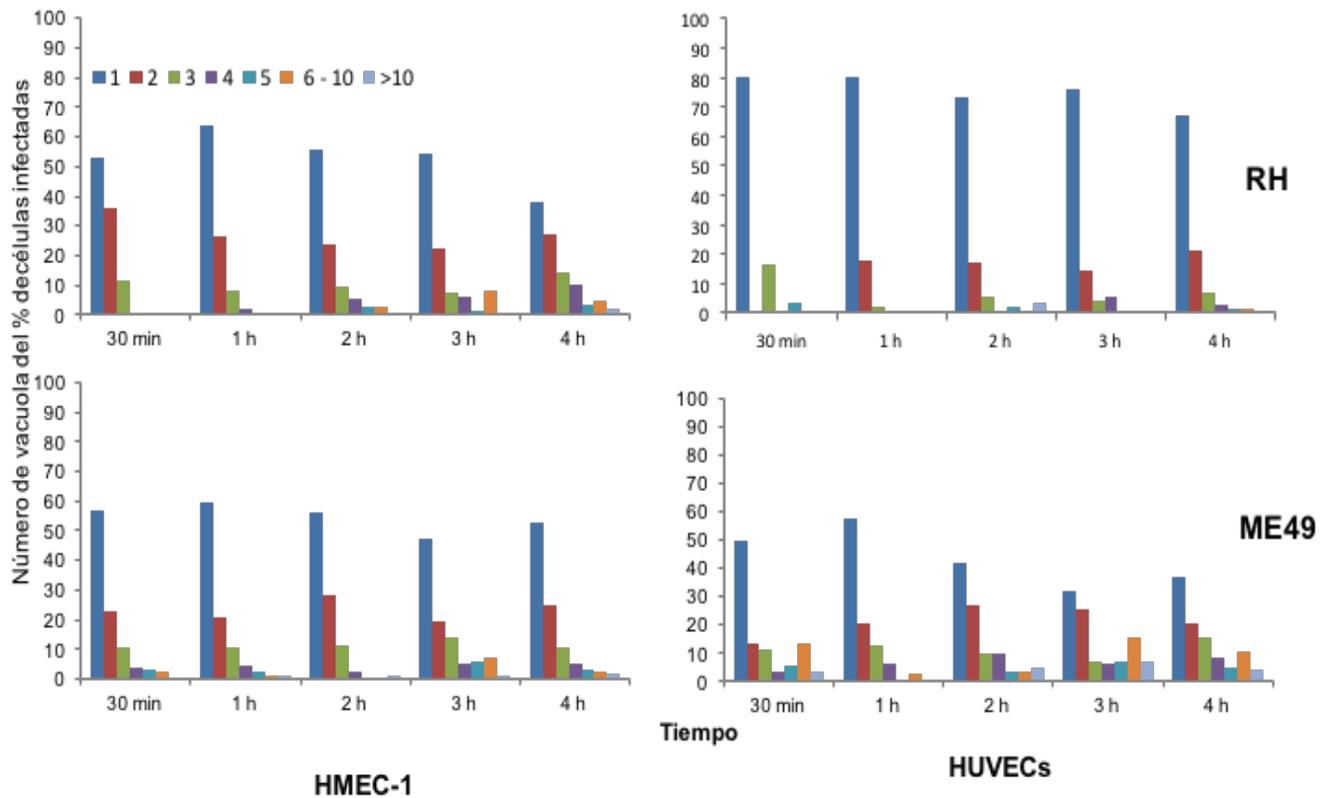


Figura 29

Distribución en el número de vacuolas parasitófora durante la cinética de infección de células endoteliales HMEC-1 (izquierda) y HUVECS (derecha) con las cepas RH (arriba) y ME49 (abajo) de *T. gondii*. Las barras de diferentes colores indican el número de vacuolas por célula infectada. Las células HMEC-1 infectadas con la cepa RH fue similar a las HUVEC infectadas con la cepa ME49, por lo que ambos grupos fueron estadísticamente diferentes a los otros dos grupos (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). La barra con asterisco muestra diferencias significativas a los tres grupos en el número de vacuolas a lo largo del tiempo (Prueba de U de Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ).

## ***Internalización de taquizoitos sensibilizados con anticuerpos IgG1 anti Toxoplasma y marcados con la CFSE a las células HUVEC y HMEC-1***

### ***Por citometría de flujo***

Con el fin de realizar experimentos en los que se pudiera contar un mayor número de células por citometría de flujo, se marcaron los taquizoitos con CFSE, el cual no disminuyó su viabilidad (no se muestra). En la figura 30 se muestra un ensayo de invasión de ambos tipos celulares con las dos cepas y puede observarse que se encuentran células multi-infectadas, y que la mayoría de los parásitos se encuentran completos y cerca del núcleo.

Con el fin de determinar si se podían contar las células no infectadas, las infectadas con pocos parásitos y las multi-infectadas por separado, se realizaron ensayos de invasión con parásitos marcados con CFSE y se separaron poblaciones con diferentes grados de marca, los cuales fueron analizadas por microscopía confocal; esto se muestra en la figura 31. Como se puede observar se pueden identificar células no infectadas o con pocos parásitos (zonas grises) poblaciones con bajo grado de infección (en color verde) y poblaciones menores de células multi-infectadas (en color azul).

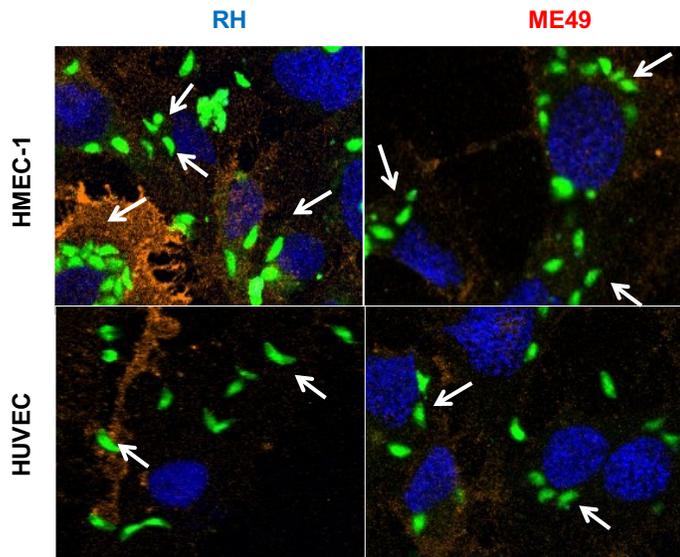


Figura 30

*Entrada de taquizoitos marcados con CFSE a las células HMEC-1 y HUVEC (color verde)  
 En azul el ADN de las células por el DAPI, en color naranja la superficie de las células  
 endoteliales marcado por anticuerpo anti-CD105 con el fluorocromo APC, los taquizoitos  
 marcados en verde (con flechas) por la CFSE, imágenes tomadas por microscopía confocal  
 en 60X.*

Posteriormente se realizó el ensayo de sensibilización de taquizoitos y se midió el efecto por citometría de flujo. Los resultados revelaron que la marca con CFSE incrementó la invasividad de los taquizoitos la cepa RH a los dos tipos de células y de la ME49 a las HMEC-1 (cuadro 1).

Se encontró un efecto inhibitorio del suero negativo sobre la entrada de los parásitos de ambas cepas a las células (cuadro 1). En relación a estos valores, el suero positivo a los anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma provocó un aumento aparente, con excepción de las células HUVEC expuestas a los taquizoitos de la cepa ME49.

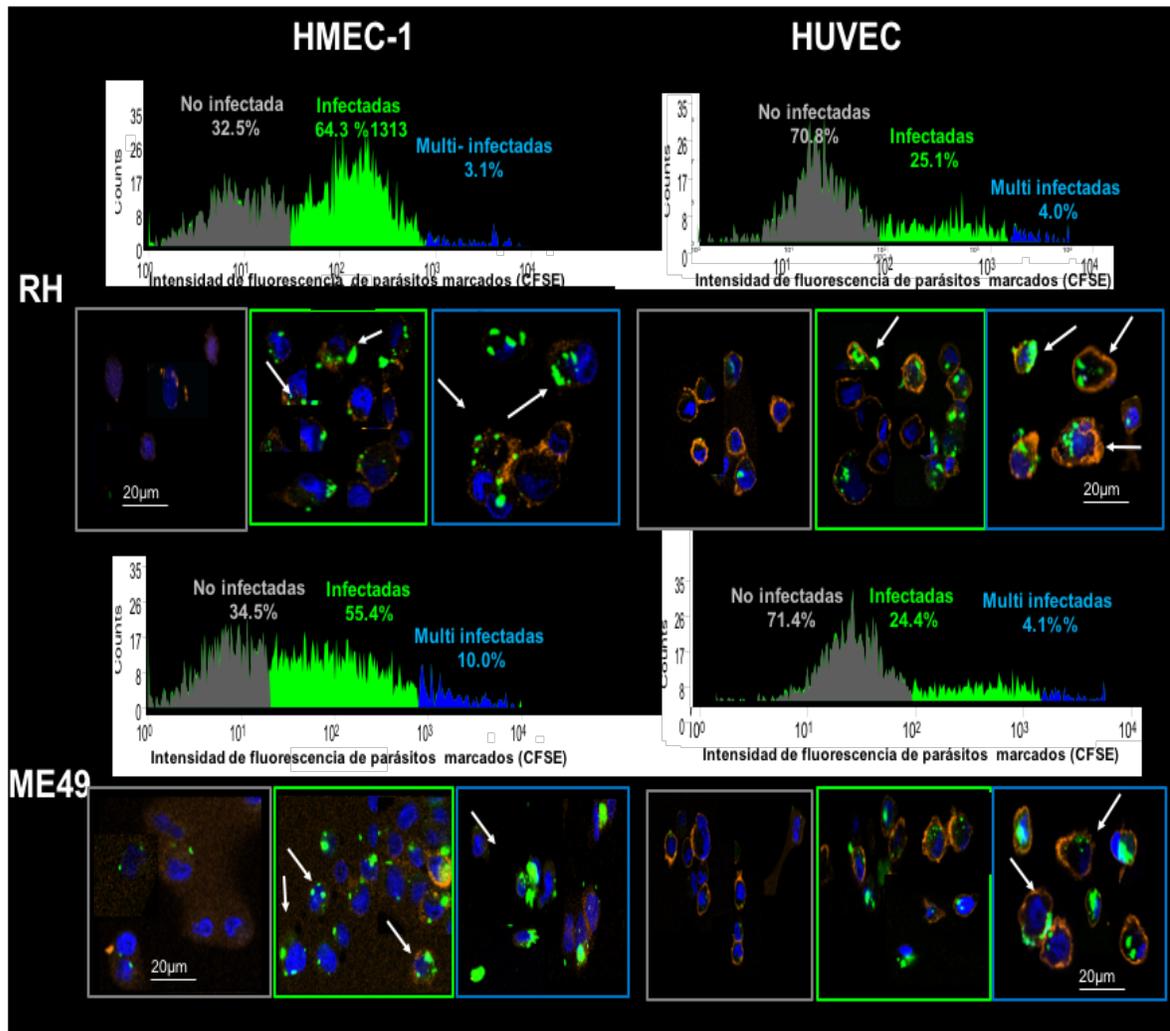


Figura 31

*Invasión de células HMEC-1 y HUVEC por taquizoítos RH y ME49 de Toxoplasma gondii marcados con CFSE. En los histogramas obtenidos por citometría de flujo, se muestra la fluorescencia de las tres poblaciones: no infectados (color gris); infectadas con pocos parásitos (color verde); células multi-infectadas (color azul). Abajo se muestran imágenes de células infectadas correspondientes a las tres zonas, analizadas por microscopía confocal.*

Cuadro 1. Efecto de la sensibilización de taquizoitos sobre el porcentaje de células HMEC-1 y HUVEC infectadas, determinado por citometría de flujo\*

Cepa de <i>T. gondii</i>	HUVEC			HMEC-1		
	Sin	Suero	Suero	Sin	Suero	Suero
	tratamiento**	negativo	positivo	tratamiento**	negativo	positivo
RH	35.3 (15)	12.5	23.0	62.0 (33)	37.5	65.3
ME49	32.7 (32)	18.6	17.6	67.0 (50)	46.1	49.6

\*Se usaron parásitos teñidos con CFSE \*\*Los valores entre paréntesis son los valores encontrados previamente con parásitos no marcados con CFSE

Con el fin de determinar si el efecto de la marca se debía a un cambio en los parásitos y no a un problema técnico, se comparó la internalización a las células HMEC-1 por taquizoitos de la cepa RH marcados y no marcados con la CFSE, leyendo la invasión por microscopía óptica (Figura 32). En los taquizoitos no marcados, el porcentaje en la internalización de los taquizoitos sin tratamiento usados como control de invasión, fue del 29.8%, similar a lo encontrado previamente, de 33% (Figura 32), mientras que los teñidos presentaron una invasión de 56%.

A pesar de que este resultado es interesante, su implicación nos impidió sacar conclusiones del efecto de la sensibilización usando parásitos marcados con CFSE. Por ello, se realizaron los siguientes experimentos con parásitos sin marcar y evaluando por microscopía de luz. Se observó un aumento en la internalización de los taquizoitos sensibilizados con el anticuerpo IgG1 humana anti-Toxoplasma (48.5%) en comparación con aquellos tratados con suero negativo (23%; Figura 32). Por lo tanto, la sensibilización de los taquizoitos con anticuerpos IgG1 anti-Toxoplasma parece favorecer su entrada a las células HMEC-1.

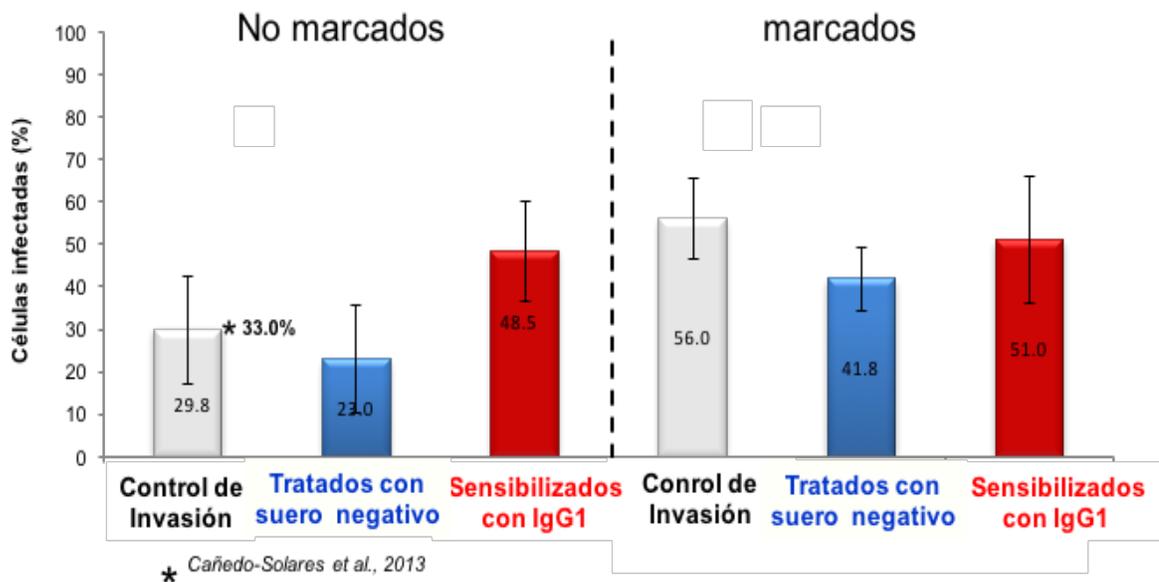


Figura 32

*Internalización de taquizoitos de la cepa RH de T. gondii marcados y no marcados a las células endoteliales HMEC-1 sin tratamiento o previa incubación con suero negativo o suero positivo (sensibilizados). El asterisco muestra el porcentaje correspondiente a las condiciones de 2 horas de los experimentos originales (33%).*

## Efecto de la sensibilización con anticuerpos IgG1 en *Toxoplasma gondii* en la internalización a las células endoteliales HMEC-1

Los resultados revelaron que la internalización a las células de taquizoitos sin tratamiento (incubados con PBS) fueron los de mayor porcentaje para ambas cepas, RH y ME49 (Figura 33). La sensibilización de los taquizoitos con anticuerpos humanos IgG1 produjo un aumento de la internalización en comparación con el tratamiento con suero negativo (control verdadero), especialmente en el caso de la cepa ME49 (Figura 33). Asimismo, el porcentaje en el número de vacuolas parasitóforas por célula, refleja el número de parásitos internalizados a cada célula o carga parasitaria, fue mayor para los grupos de taquizoitos sensibilizados (Figura 34). Con los dos efectos anteriores, se cuantificó el número total de parásitos que invadieron 100 células, aumentó considerablemente con los parásitos sensibilizados que los que se incubaron con suero negativo (Figura 35).

Cabe resaltar que el número de parásitos en las células expuestas a taquizoitos sin ningún tratamiento más que en PBS, fue mayor aquella de los taquizoitos tratados con sueros.

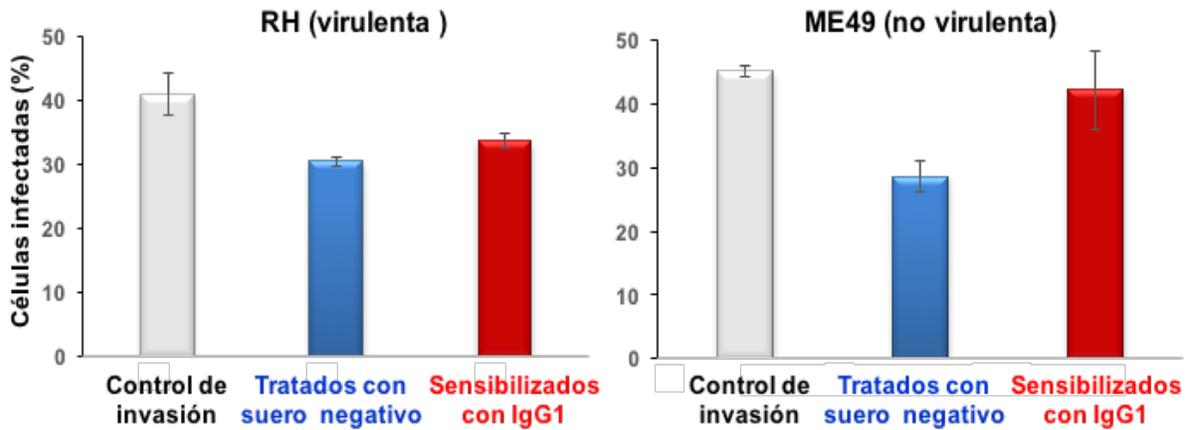


Figura 33

Internalización a las células endoteliales HMEC-1 de taquizoitos RH y ME49 de *T. gondii* tratados con PBS (control de invasión), suero negativo o suero con anticuerpos IgG1 anti-*Toxoplasma*. Las barras representan promedios de triplicados  $\pm$  desviación estándar.

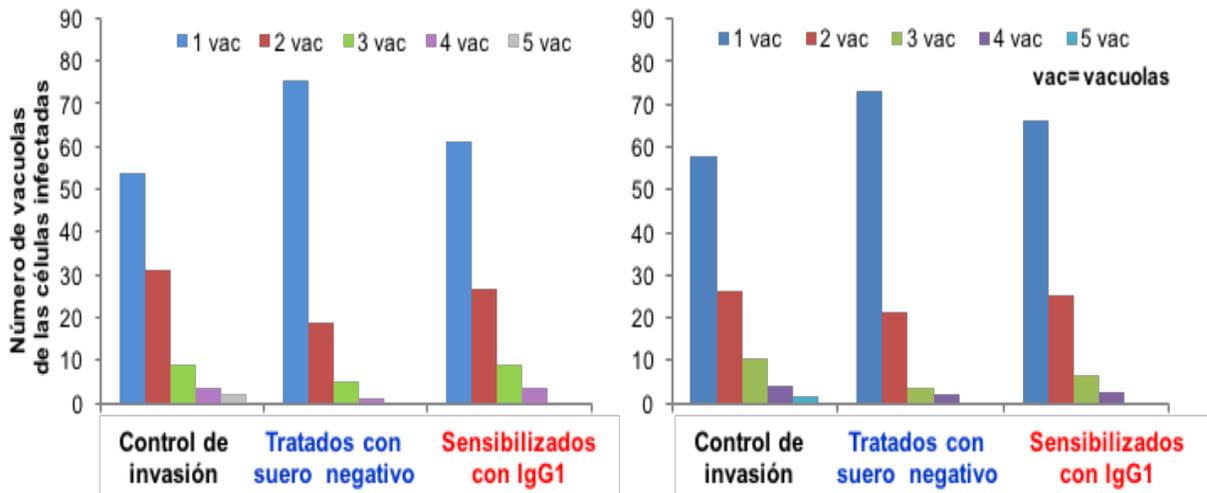


Figura 34

Número de vacuolas parasitóforas en células endoteliales HMEC-1 infectadas con taquizoitos de las cepas RH y ME49 de *T. gondii* en las tres condiciones: incubados en PBS (control de invasión), suero negativo y suero positivo IgG1 anti-*T. gondii*. Vac=vacuolas

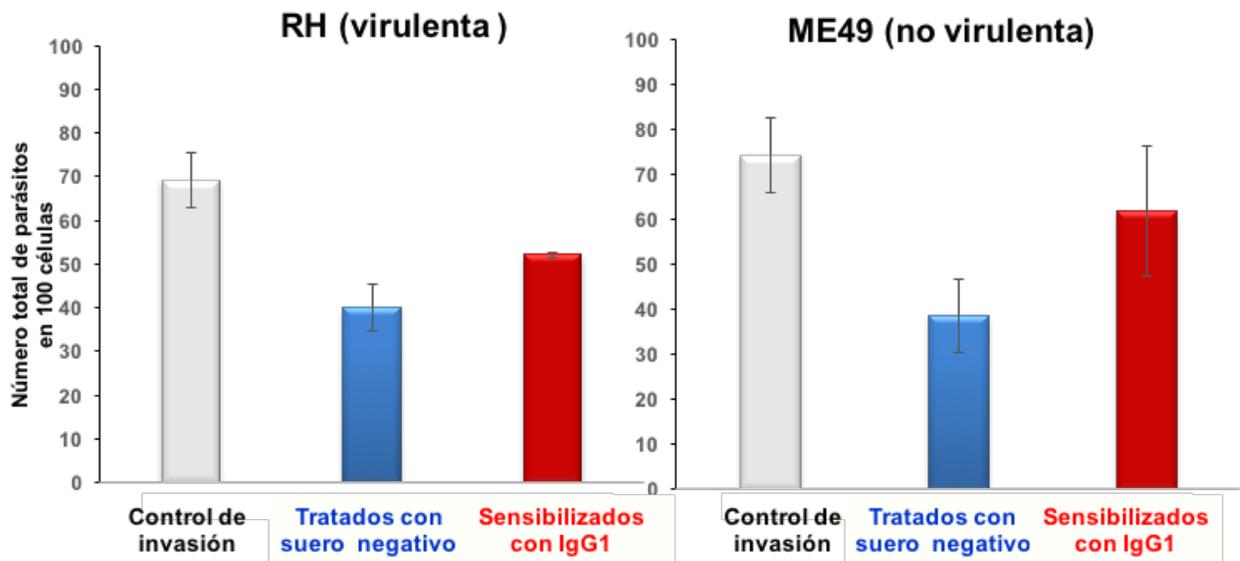


Figura 35

Cuantificación del total de parásitos en 100 células con la cepa RH y ME49 en las células HMEC-1. Con taquizoitos sin tratamiento (barra blanca); con taquizoitos tratados con suero negativo (barra azul) y taquizoitos sensibilizados con el suero positivo IgG1 anti-*T. gondii* (barra roja).

## DISCUSIÓN

*Toxoplasma gondii* puede atravesar las barreras epiteliales y endoteliales de la placenta, e infectar cualquier célula nucleada y diseminarse rápidamente, provocando la transmisión congénita (Dunn et al, 1999; Correa et al, 2007b). Uno de los aspectos más importantes en esta forma de infección y su patogenia es la virulencia del parásito. Particularmente, se sabe que dos terceras partes de los casos de toxoplasmosis congénita se deben a variantes de baja virulencia (tipo II), aunque también se han descrito cepas atípicas o recombinantes (Rico-Torres et al., 2016). En este trabajo establecimos un modelo de invasión *in vitro* en dos tipos de células endoteliales, y comparamos la capacidad de invasión de una cepa tipo I con la de una tipo II. El hecho de que la cepa no virulenta invadió más células endoteliales que la cepa virulenta y con mayor número de parásitos, fue contrario a lo que se esperaba con base en los estudios *in vivo*: las de tipo I diseminan más rápidamente que las de tipo II en ratones (Barragán et al., 2005; Saeij et al., 2005). Lachenmaier et al., en 2011 obtuvieron resultados similares, con una tasa de infección inicial significativamente más alta (7.5%) con la cepa ME49 que con la RH (2%), también usando células endoteliales de microvasculatura de cerebro de ratón y células mononucleares periféricas, a una dosis parásito: célula de 1:1 y 2 horas pos infección. La conclusión de estos hallazgos es que la virulencia no depende de la entrada a la célula, sino de su replicación, lo cual es apoyado por nuestros resultados (Lachenmaier et al., en 2011). En este sentido cabe mencionar que la cepa RH tiene un tiempo medio de replicación de 4 horas mientras que la ME49 se replica cada 7-8

horas (Radke et al, 2001).

Por otra parte, observamos que las células HMEC-1 presentan porcentajes de invasión más altos por ambas cepas de *T. gondii*, que las células de los cultivos primarios (HUVEC). Se ha descrito que este parásito es capaz de desregular el ciclo celular de la célula hospedera para favorecer su invasión y tiene predilección por células que están en la fase S del ciclo celular. Esto se ha observado en fibroblastos, trofoblastos y células HeLa (Blader et al., 2009). Más aun, se ha descrito que *T. gondii* puede inducir a la célula a entrar en la fase S del ciclo celular (Youn et al., 1991; Angeloni et al., 2009; Lavine y Arrizabalaga, 2009). Un trabajo reportado por Brenier-Pinchart et al., 2004 realizado con líneas celulares de glioblastoma, demostró que estas células son más susceptibles a la infección por la cepa RH de *T. gondii*, que las células de astrocitos provenientes de cultivos primarios, pero no se observaron diferencias en la replicación. Con base en los datos de la literatura, podríamos sugerir que como las células HMEC-1 también forman una línea semi-inmortal, serían más susceptibles a la invasión por los taquizoitos y posiblemente las células con mayor carga parasitaria sean las que se encuentren en esta fase S de su ciclo celular.

Tanto la transmisión vertical como el daño ocasionado por *Toxoplasma gondii* dependen de la etapa de gestación en la que se infecta la madre por primera vez (Dunn et al., 1999). Conforme ocurre más tardía la infección la patogenia en el producto es menor; esto se puede deber a la maduración del sistema inmune fetal a lo largo de la gestación (revisado en Correa et al., 2007b y Ortiz-Alegría et al., 2010). Lo que es un enigma es el aumento de la probabilidad de infección fetal conforme

avanza la gestación. Los datos previos en modelos animales y en seres humanos apuntan a factores del hospedero, entre ellos a los anticuerpos de clase IgG, y especialmente los de la subclase IgG1. Por un lado, la expresión del FcRn (fetal) comienza hacia la mitad del embarazo, y los anticuerpos maternos son transferidos a través de esta molécula. Por otro lado, hay relación directa entre la IgG1 materna y daño en los recién nacidos con infección congénita (Cañedo-Solares et al., 2008). De ahí la hipótesis de esta tesis, que fue evaluada en un modelo de células endoteliales *in vitro*. En principio en este trabajo demostramos la expresión del FcRn por células tanto de cultivos primarios HUVEC como de la línea semi-inmortalizada HMEC-1, y por ende la factibilidad de emplear alguno de los dos tipos celulares para probar el efecto de los anticuerpos sobre la internalización. En el caso de las células HUVEC encontramos un trabajo reportado por Zhao et al., 2011, en el cual identificaron este receptor por inmunohistoquímica en el endotelios de arterias y venas de cordón umbilical. A pesar que en la literatura se ha reportado la presencia del FcRn en diversos tipos de células endoteliales (Antohe et al., 2001; Cianga et al., 2011) no se habían reportado datos que nos indicaran la presencia de este receptor en células HMEC-1. Por consiguiente, nos dimos a la tarea de identificar este receptor, y demostramos que ambos tipos celulares lo expresan. El FcRn fue detectado principalmente en el interior de las células como en pequeñas vesículas, algunas de éstas cerca del núcleo, que podrían ser parte del Aparato de Golgi; otras vesículas positivas al FcRn localizadas en el citoplasma, los cuales podrían ser responsables de la unión de la IgG y su traslocación a través de la célula e incluso a compartimentos endosómicos para el reciclado de la IgG como lo describe la

literatura (Ye et al., 2008). También se observó la marca en la superficie de las células, lo que sugiere que el receptor está localizado intracelular y extracelularmente. Esta localización ubicua del receptor sugiere que el parásito opsinizado puede unirse a la superficie celular o entrar por un mecanismo del tipo de la macro-pinocitosis, que podría ser “mega”.

Por citometría de flujo parecía que la expresión del FcRn es menor en las HMEC-1 que en las HUVEC; esto pudo deberse a un efecto de la tripsina sobre esta molécula, ya que se usa mucho más concentrada para despegar a las primeras que para las HUVEC (0.25% y 0.05% respectivamente). Esta explicación se refuerza por una menor marca del CD105 en las HMEC-1 que las HUVEC y una marca similar entre los dos tipos celulares, de ambas moléculas evaluado por microscopía confocal, para lo cual se usaron laminillas sin tratamiento con tripsina.

Las HMEC-1 provienen del endotelio microvascular, por lo que se esperaba que expresaran este receptor, si bien, por ser células transformadas podían haber perdido esta función (Ober et al., 2004; Goebel et al., 2008). Por otro lado, no es claro el papel del FcRn en la vena del cordón, aunque también podría estar relacionado con la homeostasis de la IgG (Frigo et al., 2016). Interesantemente, se observó variabilidad en la expresión del mRNA entre HUVECs y vellosidades de distintos individuos y entre tejidos del mismo individuo. Se sabe que la expresión del FcRn se relaciona con el número de repeticiones de 37 pares de bases en tándem (o “VNTRs”) presentes dentro del promotor del gen para la cadena alfa y que este número es polimórfico (Sachs et al., 2006; Passot et al., 2013). Sin embargo, el estudio de esta región del gen en una muestra de cerca de 100 mexicanos no ha

revelado variaciones en los VNTR (Ortiz-Alegría, comunicación personal). La variación entre individuos y entre tejidos del mismo individuo también puede deberse a factores como la edad gestacional, o bien la zona del cordón o de la placenta de donde se tomó la muestra para el estudio (Ortiz-Alegría et al., 2016).

El hecho de que ambos tipos celulares expresan el FcRn permitió proponer a estas células como modelos de estudio de la invasión de microorganismos recubiertos por anticuerpos opsonizantes de la subclases de IgG1. Esta subclase como ya se mencionó anteriormente, tiene la particularidad de unirse a los patógenos para ser reconocidos por los receptores Fc que se encuentran en la superficie de los fagocitos y ser degradados. Existen pocos trabajos sobre el papel de los receptores Fc en la opsonización de *T. gondii*, y están enfocados a los receptores FcR $\gamma$ I, FcR $\gamma$ II y FcR $\gamma$ III presentes en macrófagos y monocitos, los cuales tienen efectos protectores, inhibiendo la replicación o mediando la destrucción por actividad fagocítica (Anderson et al., 1976; Joiner et al., 1990; Konishi y Nakao, 1992; Fadul et al., 1995). Sin embargo, se ha reportado que el parásito puede evitar la degradación intracelular escapando del fagosoma temprano, inhibir la acidificación de la vacuola parasitófora, bloquear señales de maduración del endosoma e inhibir la producción de oxígeno reactivo, entre otros (Joller et al., 2011). Una vez que se escapa del fagosoma, forma su vacuola parasitófora y se replica dentro de la célula evitando su destrucción (Toulah et al., 2011). Recientemente se describió una vía intermedia o híbrida entre la vía endocítica y la invasión activa. Una vez internalizado por fagocitosis, el parásito comienza la invasión activa formando una unión móvil en la membrana del fagosoma

para establecer una vacuola parasitófora. Esta vía es conocida como internalización de fagosoma a vacuola parasitófora (PTVI). Los autores mencionan que esta vía es utilizada preferentemente por cepas no virulentas de *T. gondii* (Zhao et al., 2014). La captación de la cepa tipo II por los macrófagos, probablemente implica el reconocimiento de los ligandos del parásito presentes en estas cepas y ausentes en las cepas virulentas, por receptores de superficie del hospedero. En todo caso, esta vía explicaría por qué los taquizoitos de la cepa ME49 invadieron más células y con más vacuolas por células que los de la cepa RH. Por supuesto, esto hay que demostrarlo.

El papel del FcRn en las células endoteliales no es fagocitar, sino proteger a los anticuerpos de clase IgG de la degradación lisosomal. Por lo anterior, en este trabajo nos propusimos investigar si el recubrimiento de los taquizoitos de *T. gondii* por anticuerpos IgG1 favorece la entrada a estas células, ya que existe la paradoja de que la IgG1 lejos de proteger favorece el daño fetal, posiblemente aumentando la invasión de las células, y permitiendo el paso de la madre al hijo durante la gestación, como lo propuso Maidji et al. en 2006 para Citomegalovirus. Dado que el tamaño de *T. gondii* es mucho mayor, propusimos la hipótesis alterna de que el FcRn pueda tener un efecto concentrador al reconocer los parásitos recubiertos por anticuerpos IgG1, aumentando así la carga parasitaria adherida a la superficie del sincitiotrofoblasto o el endotelio fetal. En efecto, los resultados revelaron que la proporción de células infectadas por los taquizoitos sensibilizados con anticuerpos humanos anti-Toxoplasma de la subclase IgG1, fue mayor y con mayor número de vacuolas/célula infectada que la de aquellas células expuestas a los taquizoitos

tratados con suero negativo. Si lo extrapolamos a las vellosidades de la placenta, el hecho de tener más parásitos por célula aumentaría la probabilidad de transmisión y de daño fetal. Lo anterior, puede explicar el papel paradójico de los anticuerpos IgG1 en la toxoplasmosis congénita (Cañedo-Solares et al., 2008)

Una observación interesante fue la aparente inhibición de la entrada del taquizoito a la célula por el suero negativo cuando se comparó con los taquizoitos no tratados; *T. gondii* podría adherir moléculas inespecíficas del suero negativo que bloqueen la adhesión a la célula hospedera. Un trabajo realizado por Vercammen et al., en 1999, demostró que el revestimiento de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* con un anticuerpo inespecífica policlonal de ratón, disminuyó su capacidad invasiva y/o de proliferación tanto en células fagocíticas (macrófagos) como no fagocíticas (células Vero), analizado por citometría de flujo. Sin embargo, en esta tesis no se observó pegado de la IgG humana del suero negativo a la superficie de los parásitos, por lo que es posible que sea algún otro componente. En otro estudio Nam et al., en 1993 observaron que el suero fetal bovino (SFB) no descomplementado, inhibía la invasión de los taquizoitos a enterocitos; en cambio cuando el SFB fue tratado por calor, el efecto inhibitorio disminuyó; ellos proponen dos hipótesis: que los factores del complemento del SFB participan en la neutralización de material secretado por el parásito, o que interfieren con la unión receptor a su ligando en el momento de la invasión del parásito. Cabe comentar que en el presente trabajo ambos sueros fueron descomplementados a 56°C durante 30 minutos, para evitar el daño por efecto del complemento. Además, ninguno de los sueros afectó la movilidad de los

taquizoitos, la cual fue observada durante la evaluación de viabilidad de los parásitos.

Los resultados de la presente tesis, junto con el hecho de que la transferencia materno-fetal de anticuerpos IgG aumenta conforme la placenta crece a lo largo del embarazo, sugieren un papel del FcRn y los anticuerpos IgG1 maternos en el incremento de la probabilidad de transmisión congénita de *T. gondii* a lo largo de la gestación. Se ha propuesto en la literatura que el FcRn puede llevar consigo agentes infecciosos viables en forma de complejos inmunes (Radulescue et al., 2005; Maidji et al., 2006), lo que podría sugerir que este receptor podría ser utilizado como caballo de Troya para concentrar o internalizar a los taquizoitos de *T. gondii*, favoreciendo su transmisión de la madre al feto.

## **CONCLUSIONES**

1. Las células HUVEC y las HMEC-1 expresan el FcRn, por lo que pueden ser usadas como modelos de estudio de funciones de este receptor, como la internalización y el tránsito de IgG.
2. La línea celular endotelial HMEC-1 es más susceptible a la invasión de *T. gondii* que las células endoteliales de los cultivos primarios aisladas de la vena de cordón umbilical humano.

3. Los taquizoitos de la cepa no virulenta invadieron más células, con más vacuolas por células y más rápidamente que los de la cepa virulenta

4. La sensibilización de los taquizoitos de *T gondii* con anticuerpos humanos de clase IgG1 favorece la internalización a las células endoteliales, aumentando la carga total de parásitos.

## **PERSPECTIVAS**

- Se requieren experimentos de inhibición del FcRn con anticuerpos o silenciamiento del mRNA de la cadena alfa, para demostrar que el FcRn es el responsable de este aumento en la internalización y posiblemente del tránsito del parásito.
- Falta realizar experimentos en los que se mida la replicación parasitaria de los tres grupos, y determinar así el efecto de los anticuerpos sobre el destino del parásito.
- Por otra parte, en macrófagos se ha visto que algunos parásitos se escapan del fagosoma y proliferan (Morisaki et al., 1995), pero en células endoteliales no se sabe qué ruta toman, ni sabemos si algunos son degradados como en el caso de la IgG. Por lo tanto, vale la pena analizar en cual compartimento celular se localizan los parásitos tratados de varias formas.

## REFERENCIAS

Abou-Bacar A, Pfaff AW, Georges S, Letscher-Bru V, Falsetto D, Villard O, Antoni E, Klein JP, Candolfi E. 2004. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infect Immun.* 72: 1397-1401

Abrahams VM, Mor G. 2005. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta.* 26: 540-547

Adamski FM, Kin AT, Demmer J. 2000. Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brush-tail possum). *Moll Immunol.* 37:435-444

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. 2002. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 250: 358-373

Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 99: 683-690

Augustine SA. 2016. Towards Universal Screening for Toxoplasmosis: Rapid, Cost-Effective, and Simultaneous Detection of Anti-Toxoplasma IgG, IgM, and IgA Antibodies by Use of Very Small Serum Volumes. *J Clin Microbiol.* 5: 1684-1685

Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 34: 1185-1196

Ajzenberg D, Dumètre A, Dardé ML. 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 43: 1940-1943

Alberts, Bruce, et al. *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Publishing, 2000.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 5: 266-271

Anderson SE, Bautista SC, Remington JS. 1976. Specific antibody-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Clin Exp Immunol.* 26: 375-380

Andrade WA, Souza MC, Martinez ER, Nagpal K, Dutra MS, Melo MB, Bartholomeu DC, Ghosh S, Golenbock DT, Gazzinelli RT. 2013. Combined action of Nucleic Acid-

Sensing Toll-Like Receptors (TLRs) and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host Microbe*. 13: 42-53

Angeloni MB, Silva NM, Castro AS, Gomes AO, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. 2009. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. *Placenta*. 30: 785-791

Antohe F, Radulescu L, Gafencu A, Ghetie V, Simionescu M. 2001. Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum Immunol*. 62: 93-105

Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Mentis A & Michalas S. 2002. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn*. 22: 1107-1111

Ambroise-Thomas P, Petersen E. 2000. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, Francia. 324 pp.

Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*. 2: 481-485

Baumann M, Deborde S, Illsley NP. 2002. Placental glucose transfer and fetal growth. *19*: 81-9

Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. 2014. The Role of FcRn in Antigen Presentation. *Front Immunol*. 5: 1-12

Barbosa BF, Silva DA, Costa IN, Mineo JR, Ferro EA. 2008. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- $\gamma$ , interleukin-10 and transforming growth factor-1. *Clin Exp Immunol*. 151: 536-545

Barbosa BF, Gomes AO, Ferro EA, Napolitano DR, Mineo JR, Silva NM. 2012. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* in both in vitro and in vivo experimental models. *Vet Parasitol*. 187: 44-52

Barragan A, Brossier F, Sibley LD. 2005. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol*. 7: 561-568

Ben M'Barek K, Molino D, Quignard S, Plamont MA, Chen Y, Chavrier P, Fattaccioli J. 2015. Phagocytosis of immunoglobulin-coated emulsion droplets. *Biomaterials*. 51: 270-277

Bennouna S, Denkers EY. 2005. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF- $\alpha$  to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high level dendritic cell TNF- $\alpha$  production. *J. Immunol*. 174: 4845-4851

Bern M, Sand KM, Nilsen J, Sandlie I, Andersen JT. 2015. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis. *J Control Release*. 211: 144-162

Borrok MJ, Luheshi NM, Beyaz N, Davies GC, Legg JW, Wu H, Dall'Acqua WF, Tsui P. 2015. Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by endowing IgG with Fc $\alpha$ RI (CD89) binding. *MAbs*. 7: 743-51

Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64: 607-623

Blader IJ, Saeji JP. 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*. 117: 458-476

Brenier-Pinchart MP, Blanc-Gonnet E, Marche PN, Berger F, Durand F, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. 2004. Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression in vitro. *Acta Neuropathol*. 107: 245-249

Bright NA, Ockleford CD, Anwar M. 1994. Ontogeny and distribution of Fc gamma receptors in the human placenta. Transport or immune surveillance? *J Anat*. 188: 297-308

Caballero-Ortega H, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Cedillo-Pelaez C, Vargas-Villavicencio JA, Luna-Pasten H, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Correa D. 2012. Seroprevalence and national distribution of human toxoplasmosis in Mexico: analysis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 106: 653-659

Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez ML, Luna-Pastén H, Rodríguez Pérez LR, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Correa D. 2008. Human congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs *Pediatr Infect Dis J*. 27: 469-474

Carlson M Bruce. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 4<sup>a</sup> edition. Edit. Elsevier Mosby. 2014. 140- 145

Carruthers VB. 1999. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int*. 48: 1-10

Carruthers VB. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*. 81: 111-122

Carruthers V, Boothroyd JC. 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol.* 10: 83-89

Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Salas-Garrido CG, Correa D. 2011. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Vet Parasitol.*180: 368-371

Cervenack J, Bender B, Schneider Z, Magna M, Valer Carstea B, Liliom K, Erdei A, B'osze Z, and Kacs Kovics I. 2011. Neonatal FcR overexpression boosts humoral immune response in transgenic mice. *J Immunol.* 186: 959-968

Cianga C, Cianga P, Plamadeala P, Amalinei C. 2011. Neoclassical major histocompatibility complexes I-like Fc neonatal receptor (FcRn) expression in neonatal human tissues. *Hum Immunol.* 72: 1176-1187

Contreras Ochoa-CO, Lagunas-Martinez A, Belkind-Gerson J, Correa D. 2012. *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol Res.*110: 2089-2094

Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martinez A, Belkind-Gerson J, Correa D. 2013. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp Parasitol.* 134: 256-265

Correa D, Coballase UE, Cañedo SI, Rico TC. 2006. Toxoplasmosis. En: Flisser A, Pérez TR, editores. *Aprendizaje de la parasitología basado en problemas.* Editores de Textos Mexicanos. México, D.F., México. 355-367 pp

Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. 2007a. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 29: 651-660

Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Becerra-Torres E, Olmedo-Hernández M, Medina-Escutia ME, Murrieta S, Hernández-Islas JL. 2007b. Immunobiology of congenital toxoplasmosis. En: Terrazas LI (ed). *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases.* Research Signpost. Kerala, India. pp. 387

Chaouat G, Ledée-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. 2004. Th1/Th2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the Th1/Th2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol.* 134: 93-119

Chaouat G. 2007. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol.* 29 : 95-113

Chiang CF, Flint M, Lin JS, Spiropoulou CF. 2016. Endocytic pathways used andes virus to enter primary human lung endothelial cells. PLoS One 11 : e0164768

Croos JC., Werb Z., Fisher SJ. 1994. Impalntation and the palcenta : key pices of the development puzzle. Science. 266 :1508-1518.

Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL. 2002. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. Mol Cell Endocrinol. 187: 207-712

Dardé ML. 2004. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanità. 40: 57-63

Dawson HD, Beshah E, Nishi S, Solano-Aguilar G, Morimoto M, Zhao A, Madden KB, Ledbetter TK, Dubey JP, Shea-Donohue T, Lunney JK, Urban JF Jr. 2005. Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. Infect Immun. 73:1116-1128

De Oliveira Gomes A, de Oliveira Silva DA, Silva NM, de Freitas Barbosa B, Franco PS, Angeloni MB, Fermino ML, Roque-Barreira MC, Bechi N, Paulesu LR, Dos Santos MC, Mineo JR, Ferro EA. 2011. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. Am J Pathol. 178: 2792-2801

Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Bennouna S. 2004. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. Int J Parasitol. 34: 411-421

Dubey JP. 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J Parasitol. 82: 957-961

Dubey JP. 2004. Toxoplasmosis a waterborne zoonosis. Vet Parasitol. 126: 57-72 Review.

Dubey JP. 2010. Toxoplasmosis of Animals and Human. CRC Press. Boca Raton Florida, USA 2a edition

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. 2003. CD105 is important for angiogenesis: Evidence and potential applications. FASE J. 17:984-992

Dunay IR, Sibley LD. 2010. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Opin Immunol. 22: 461-466

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counseling. *Lancet*. 353: 1829-1833

Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol*. 34: 793-813

Dupont CD, Christian DA, Selleck EM, Pepper M, Leney-Greene M, Harms Pritchard G, Koshy AA, Wagage S, Reuter MA, Siblez LD, Betts MR, Hunter CA. 2014. Parasite fate and involvement of infected cells in the induction of CD4+ and CD8+ T cell responses to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*. 10:1-17 e1004047

Einarsdottir HK, Stapleton NM, Scherjon S, Andersen JT, Rispens T, van der SCE, Vidarsson G. 2014. On the perplexingly low rate of transport of IgG2 across the human placenta. *PLOS One*. 9:1-9 e108319

Fadul CE, Channon JY, Kasper LH. 1995. Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. *Infect Immun*. 63: 4290-4294

Fallarino F, Grohmann U, Puccetti O. 2012. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol*. 28: 1932-1937

Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol*. 6: 22-31

Ferro EA, Mineo JR, Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Silva DA, Sorda G, Bevilacqua E, Paulesu LR. 2008. Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Up-Regulated in Human First-Trimester Placenta Stimulated by Soluble Antigen of *Toxoplasma gondii*, Resulting in Increased Monocyte Adhesion on Villous Explants. *Am J Pathol*. 172: 50-58

Filisetti D, Candolfi E. 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 40: 71-80

Firan M, Bawdon R, Radu C, Ober RJ, Eaken D, Antohe F, Ghetie V, Ward ES. 2001. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the materno fetal transfer of g-globulin in humans. *Int Immunol*. 13: 993-1002

Furtado JM, Winthrop KL, Butler NJ, Smith JR. 2013. Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clin Exp Ophthalmol*. 41: 82-94

Franco PS, Gomes AO, Barbosa BF, Angeloni MB, Silva NM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. 2011 Azithromycin and spiramicyn

induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *T. gondii* but are able control infection. *Placenta*. 32: 838-844

Fricker-Hidalgo H, Cimon B, Chemla C, Darde ML, Delhaes L, L'Ollivier C, Godineau N, Houze S, Paris L, Quinio D, Robert-Gangneux F, Villard O, Villena I, Candolfi E, Pelloux Hidalgo H. 2013. *Toxoplasma* seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in Pregnant Women: Myth or Reality? A French Multicenter Retrospective Study. *J Clin Microbiol*. 51: 2103-2111

Frigo G, Tramentozzi E, Orso G, Ceolotto G, Pagetta A, Stagni C, Menin C, Rosato A, Finott P. 2016 Human IgGs induce synthesis and secretion of IgGs and neonatal Fc receptor in human umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology*. 221:1342-1342

Girardi G, Bulla R, Salmon JE, Tedesco F. 2006. The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol Immunol*. 43: 68-77

Goebel NA, Babbey CM, Datta-Mannan A, Witcher DR, Wroblewski VJ, Dunn KW. 2008. Neonatal Fc receptor mediates internalization of Fc in transfected human endothelial cells. *Mol Biol Cell*.19: 5490-5505

Ghetie V, Ward ES. 1997. FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. *Immunol Today*. 18: 592-598

Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. 2004. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol Infect*. 132:541-548

Hall AO, Beiting DP, Tato C, John B, Oldenhove G, Lombana CG, Pritchard GH, Silver JS, Bouladoux N, Stumhofer JS, Harris TH, Grainger J, Wojno ED, Wagage S, Roos DS, Scott P, Turka LA, Cherry S, Reiner SL, Cua D, Belkaid Y, Elloso MM, Hunter CA. 2012. The cytokines interleukin 27 and interferon- $\gamma$  promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity*. 37: 511-523

Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. 1996. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neuron and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55:1150-1156

Halonen SK, Weiss LM. 2013. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 114:125-145

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*. 6: 41-61

Hill DE, Sreekumar Ch, Jones J, and Dubey JP. *Toxoplasma gondii in: Infectious Disease: Foodborne Diseases* Edited by: S. Simjee © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2007. p. 337-353

Høgdall E, Vuust J, Lind P, Petersen E. 2000. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the noncoding *Toxoplasma gondii* (TGR)-gene sequences. *Int J Parasitol.* 30: 853-858

Howe DK, Sibley LD. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages, correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172: 1561-1566

Hunter CA, Sibley LD 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol.* 10: 766-778

Hunter CA, Kastelein R. 2012. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity.* 37: 960-969

Ishikawa T, Takizawa T, Iwaki J, Mishima T, Ui-Tei, Takeshita T, Matsubara S, Takizawa T. 2015 Fc gamma receptor IIb participates in maternal IgG trafficking of human placental endothelial cells. *Int J Mol Med.* 35:1273-1289

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52: 2745-2756

Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH & Mellman I. 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor transfected fibroblasts. *Science.* 249: 641-646

Joller N, Weber SS, Oxenius A. 2011. Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens. *Eur J Immunol.* 41: 889-897

Kawano Y, Noma T, Kou K, Yoshizawa I, Yata J. 1995. Regulation of human IgG subclass production by cytokines: human IgG subclass production enhanced differentially by interleukin-6. *Immunology.* 84: 278-284

Kawano Y, Noma T. 1996. Role of interleukin-2 and interferon-gamma in inducing production of IgG subclasses in lymphocytes of human newborns. *Immunology* 88: 40-48

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C. 2005. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun.* 73: 617-621

Kuo TT, Baker K, Yoshida M, Qiao SW, Aveson VG, Lencer WI, Blumberg RS. 2010. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. *J Clin Immunol.* 30: 777-789

- Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R. 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*. 33: 2980-2992
- Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R, J, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD. 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis Brazil. *Emerg Infect Dis*. 12: 942-949
- Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol*. 41: 645-655
- Kim K. 2004. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Trop*. 91: 69-81
- Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, and Ghosh S. 2013. Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 38: 119-130
- Koga K, Mor G, 2010. Toll-like receptors at the maternal–fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol*. 63: 587-600
- Konishi E, Nakao M. 1992. Naturally occurring immunoglobulin M antibodies: enhancement of phagocytic and microbicidal activities of human neutrophils against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 104: 427-432
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*. 27: 485-517
- Kristoffersen EK, Ulvestad E, Vedeler CA, Matre R. 1990. Fc gamma receptor heterogeneity in the human placenta. *J Immunol*. 31: 561-564
- Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O. 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood–brain barrier. *J Neuroimmunol* 232:119-130
- Laliberté J, Carruthers VB. 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci*. 65: 1900-1915
- Lavine MD, Arrizabalaga G. 2009. Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 64: 95-99
- Li Z, Zhao ZJ, Zhu XQ, Ren QS, Nie FF, Gao JM, Gao XJ, Yang TB, Zhou WL, Shen JL, Wang Y, Lu FL, Chen XG, Hide G, Ayala FJ, Lun ZR. 2012. Differences in iNOS

and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *Toxoplasma gondii* infection. PLoS ONE. 7: e35834

Lieberman LA, Hunter CA. 2002. The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. Int Rev Immunol. 21: 373-403

Liesenfeld O, Parvanova I, Zerrahn J, Han SJ, Heinrich F, Muñoz M, Kaiser F, Aebischer T, Buch T, Waisman A, Reichmann G, Utermöhlen O, von Stebut E, von Loewenich FD, Bogdan C, Specht S, Saftel M, Hoerauf A, Mota MM, Könen-Waisman S, Kaufmann SH, Howard JC. 2011. The IFN- $\gamma$ -inducible GTPase, Irga 6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens. PLoS One. 6: e20568.

Lu W, Zhao Z, Zhao Y, Yu S, Zhao Y, Fan B, Kacs Kovics I, Hammarström L, and Li N. 2007. Over-expression of the bovine FcRn in the mammary gland results in increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice. Immunology. 122: 401-408

Lynden TW, Robinson JM, Tridandapani S, Teillaud JL, Garber SA, Osborne JM, Frey J, Budde P, Anderson CL. 2001. The Fc receptor for IgG expressed in the villus endothelium of human placenta is Fc gamma RIIB2. J Immunol. 166: 3882-3889

Maidji E, Mc Donagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. 2006 Maternal antibodies enhancer or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. Am J Pathol. 168: 1210-1226

McCarthy KM, Lam M, Subramanian L, Shakya R, Wu Z, Newton EE, Simister NE. 2001. Effects of mutations in potential phosphorylation sites on transcytosis of FcRn. J Cell Sci. 114:1591-1598.

Mack DG, McLeod R. 1992. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. J Clin Invest. 90: 2585-2592

Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaidis KH, Schneider H. 1996. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulin during human pregnancy. Am J Reprod Immunol. 36: 248-255

Malek A. 2003. Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. Vassine. 21: 3362-3364

Malek A. 2013. Role of IgG antibodies in association with placental function and immunologic diseases in human pregnancy. Expert Rev Clin Immunol. 93: 235-249

Martins-Duarte ÉS, de Souza W, Vommaro RC, 2013. *Toxoplasma gondii*: the effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. *Exp Parasitol.* 133: 294-299

Montoya JG, Liesenfeld O, 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 363: 1965-1976

Montoya JG, Remington JS. 2008. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 47: 554-566

Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci.* 108: 2457-2464

Mukherjee S, Ghosh Rn, Maxfield FR. 1997 Endocytosis. *Physiol Rev.*77:759-803

Muñoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. 2011. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Rev.* 240:269-285

Mus AM, Cornelissen F, Asmawidjaja PS, BoonL, Hendriks RW, Lubberts E. et al 2010. Interleukin -23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T bet and FoxP3 and is required for elevation of interleukin-22 but not, interleukin 21 in autoimmune experimental. *Arthritis Rheum.* 62: 1043-1050

Myatt L, Cui X, 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 122: 369-382

Nascimento FS, Suzuki LA, Rossi CL. 2008. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenat Diagn.* 28:749-752

Nam HW, Kim DJ, Park SK, Choi WY. 1993. Inhibition of entry of *Toxoplasma gondii* into MDCK cells by fetal bovine serum. *Korean J Parasitol.* 31: 379-382

Nickdel MB, Roberts F, Brombacher F, Alexander J, Roberts CW. 2001. Counter-protective role for interleukin-5 during acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun.* 69: 1044-1052

Nicolle C, Manceaux LH 2009. On a Leishman body infection (or related organism) of the *gondii* 1908. *Int J Parasitol.* 39: 863-864

Ober RJ, Martínez C, Vaccaro C, Zhou J, Ward, ES. 2004. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I related receptor, FcRn. *J Immunol.* 172: 2021-2029

Oh N, Parck JH. 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cell. *Int J Nanomedicine.* 6: 51-63

Orabona C, Pallotta MT, and Grohmann U. 2012. Different Partners, Opposite Outcomes: A New Perspective of the Immunobiology of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Mol Med.* 18: 834-842

Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina–Escutia ME, Correa D. 2010. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for transmission and pathogenesis. *Genes Immun.* 11: 363-373

Ortiz-Alegría LB, Cañedo-Solares I, Vadillo-Ortega F, Castillo-Castrejón M and Dolores Correa. 2016. Potential of HMEC-1 Line and HUVEC Primary Culture Cells to Study the Neonatal IgG Fc Receptor *in vitro*. *Am J Immunol.* 3029-3033

Páez A, Méndez-Cruz AR, Varela E, Rodríguez E, Guevara J, Flores-Romo L, Montaña LF, Massó FA. 2005. HUVECs from newborns with a strong family history of myocardial infarction overexpress adhesion molecules and react abnormally to stimulating agents. *Clin Exp Immunol.* 141: 449-458

Passot C, Azzopardi N, Renault S, Baroukh N, Arnoult C, Ohresser M, Boisdron-Celle M, Gamelin E, Watier H, Paintaud G, Gouilleux-Gruart V. 2013. Influence of FCGRT gene polymorphisms on pharmacokinetics of therapeutic antibodies. *MAbs.* 5: 614-619

Petersen E, Dubey JP. 2001. Biology of toxoplasmosis. In: Joynson DHM, Wreghitt TG, editors. *Toxoplasmosis*. Cambridge: Cambridge University Press; p. 1-42

Pfaff AW, Georges S, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Klein JP, Mousli M, Candolfi E. 2005. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. *Immunol Cell Biol.* 83: 483-489

Pfaff AW, Georges S, Candolfi E. 2008. Different effect of *Toxoplasma gondii* infection on adhesion capacity of fibroblasts and monocytes. *Parasite Immunol.* 30: 487-490

Pfaff AW, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M, Candolfi E. 2007. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology.* 134: 1895-18902. Review

Pleass RJ, Woof JM. 2001. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol.* 11: 545- 555

Qiao SW, Kobayashi K, Johansen FE, Sollid LM, Andersen JT, Milford E, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9337-9342.

Rai A, Cross JC. 2014. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol.* 387: 131-141

Rabilloud M, Wallon, M, Peyron, F. 2010. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. *Pediatr Infect Dis. J.* 29: 421-425

Radulescu L, Antohe F, Jinga V, Guetie V, Simionescu M. 2005. Neonatal Fc receptor discriminates and monitors the pathway of native and modified immunoglobulin G in placental endothelial cells. *Hum Immunol.* 65: 578-585

Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, White MW. 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 115:165-175

Rico-Torres CP, Figueroa-Damián R, López-Candiani, C, Macías-Avilés H, Cedillo-Peláez C, Cañedo-Solares I, Luna-Pastén H, Tecuati-Herrada BL and Correa D. 2012. Molecular Diagnosis and Genotyping of cases of perinatal Toxoplasmosis in México. *Pediatr Infect Dis J.* 31: 411-413

Roopenian DC, Akilesh S. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Rev.* 8: 715-725

Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A, Rahmah N. 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in Vero cell line. *Trop Biomed.* 27: 125-130

Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. 2005. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect Immun.* 73: 695-6702

Sachs UJ, Socher I, Braeunlich CG, Kroll H, Bein G, Santoso S. 2006. A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter. *Immunol.* 119: 83-89

Santana SS, Silva DA, Vaz LD, Pirovani CP, Barros GB, Lemos EM, Dietze R, Mineo JR, Cunha-Junior JP. 2012. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunol Lett.* 143: 193-201

Selvaraj P, Fifadara N, Nagarajan S, Cimino A, Wang G. 2004. Functional regulation of human neutrophil Fc gamma receptors. *Immunol Res.* 29: 219-30

Sellge G, Barkowsky M, Kramer S, Gebhardt T, Sander LE, Lorentz A, Bischoff SC. 2014. Interferon- $\gamma$  regulates growth and controls Fc $\gamma$  receptor expression and activation in human intestinal mast cells. *BMC Immunol.* 15:1-10

Sensini A. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect.* 12: 504-512

Sibley LD, Boothroyd JC, 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359: 82-85

Sibley LD. 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunological Review.* 240: 72-91

Silva CH, Andrade GQ, Januário JN, Carneiro AC, Carneiro M, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RW. 2012. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 107: 342-347

Simister NE, Story CM, Chen HL, and Hunt JS. 1996. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol.* 26: 1527-1531

Simister NE, Story CM. 1997. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol.* 37: 1-23

Simister NE. 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 22: 3365-3369

Silva, CH, Andrade GQ, Januario JN, Caneiro ACV, Caneiro M, Vasconcelos-Santos DV, Vitor RWA, 2012. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107: 342-347

Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 137: 1-11

Sulica A, Morel P, Metes D, Herberman RB. 2001. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int Rev Immunol.* 20: 371-414. Review

Suzuki Y, Sa Q, Gehman M, Ochiai E. 2011. Interferon-gamma-and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. *Expert Rev Mol Med.* 13: e31 Review

Schmidt SK, Siepmann S, Kuhlmann K, Meyer HE, Metzger S, Pudenko S, Leineweber M, Däubener W. 2012. Influence of Tryptophan Contained in 1-Methyl-Tryptophan on antimicrobial and immunoregulatory functions of indoleamine 2,3-dioxygenase. *PLoS One*. 7: 1-13

Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG. 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parásitol Res*. 107: 253-260

Sturge CR, Yarovinsky F. 2014. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* Infection. *Infect Immun*. 82: 3090-3097

Takizawa Toshihiro, Anderson Clark L. and Robinson John M. 2005. A Novel Fc gamma R-defined IgG-containing organelle in placental endothelium. *J Immunol*. 175: 2331-2339

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2001. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 31: 217-220

Tinti M, Posentii A, Cherchi S, Baraca S, Spano F. 2003. Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organization in virulent and avirulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Int J for Parasitol*. 33: 1605-1616

Tesan DB, Björkman PJ. 2010. An intracellular traffic jam: Fc receptor-mediated transport of immunoglobulin G. *Curr Opin Struct Biol*. 20: 226-233

Toulah FH, Sayed Al-Ahl SA, Amin DM, Hamouda MH. 2011. *Toxoplasma gondii*: Ultrastructure study of the entry of tachyzoites into mammalian cells. *Saudi J Biol Sci*. 18: 151-156

Tuma PL, Hubbard AL. 2003. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev*. 83: 871-932 Review

Van den Berg JP, Westerbeek EA, van der Klis FR, Berbers GA, van Elburg RM. 2011. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev*. 87: 67-72

Vargas-Villavicencio JA, Besné-Mérida A, Correa D. 2016. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. *Vet Parasitol*. 223:195-204

Vázquez-Rodríguez S, Bouchan-Valencia P, González-Jimenez MA, Paredes-Vivas L, Calixto-González R, Cébulo-Vázquez A. 2011. Mecanismos de Tolerancia Inmunológica en el embarazo. *Perinatología y Reproducción Humana*. 25: 39-45

Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez ML, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C, Correa D. 2005. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 72: 142-144

Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C. 1992. Epidemiología de la toxoplasmosis en México. *Salud Publica Mex.* 34: 222-229

Vercammen M, Scorza T, El Bouhdidi A, Van Beeck K, Carlier Y, Dubremetz JF, Verschueren H. 1999. Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. *Parasite Immunol.* 21: 555-563

Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers F E, de Haas M, and van de Winkel JG. 2006. FcRn: An IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Am Soc Hematology.* 108: 3573-3579

Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity.* 19: 645-655

Villena I, Jaussaud R, Aubert D, Chemla C, Martinot F, Pinon JM. 2003. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 41: 1681-1686

Wang Y, Zhao S. 2010. *Vascular Biology of the Placenta.* Granger DN, Granger JP (eds). Morgan & Claypool Life Sciences series. 98 pp.

Warrington K, Hillarby MC, Li C, Letarte M, Kumar S. 2005. Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells. *Anticancer Res.* 25: 1851-1864

West AP, Bjorkman PJ. 2000. Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor. *Biochemistry.* 39: 9698-9708

Wilczynski JR. 2005. Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod. Biol.* 122: 136-143

Wu X, Wei H, Zhang J, Tian Z. 2006. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. *Cell Mol Immunol.* 3: 131-137

Xiao G, Gan LS. 2013. Receptor-Mediated Endocytosis and Brain Delivery of Therapeutic Biologics. *Int J Cell Biol.* 2013: 1-11

Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, N Kamiyama, Saiga H, Ohshima J, Sasai M, Kayama H, Okamoto T, Huang DC, Soldati-Favre D, Horie K, J Takeda, Takeda K. 2012. A cluster of interferon- $\gamma$ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 37: 302-313

Ye L, Liu X, Rout SN, Li Z, Yan Y, Lu L, Kamala T, Nanda NK, Song W, Samal SK, Zhu X. 2008. The MHC Class II-Associated Invariant Chain Interacts with the Neonatal Fc gamma receptor and Modulates Its Trafficking to Endosomal/Lysosomal Compartments. *J Immunol.* 181: 2572-85

Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS, Choi WY. 1991. Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Korean. J Parasitol.* 29: 121-128

Zhang J, Croy BA, Tian Z. 2005. Uterine natural killer cells: their choices, their missions. *Cell Mol Immunol.* 2:123-129

Zhao Y, Liu Y, Chen Z, Korteweg C, Gu J. 2011. Immunoglobulin G (IgG) expression in human umbilical cord endothelial cells. *J Histochem Cytochem.* 59: 474-488

Zhao Y, Marple AH, Ferguson DJ, Bzik DJ, Yap GS. 2014. Avirulent strains of *Toxoplasma gondii* infect macrophages by active invasion from the phagosome. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 111: 6437-6442

## **PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS**

## Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains

Irma Cañedo-Solares · Montserrat Calzada-Ruiz ·  
Luz Belinda Ortiz-Alegria · Alda Rocío Ortiz-Muñiz ·  
Dolores Correa

Received: 18 February 2013 / Accepted: 21 May 2013 / Published online: 10 June 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** *Toxoplasma gondii* disseminates and causes congenital infection by invasion of the endothelial cells. The aim of this study was to analyze the ability of two strains to invade two endothelial cell types. Tachyzoites of the RH and ME49 strains were expanded in Balb/c and C57BL6-RAG2<sup>-/-</sup> mice, respectively. Tachyzoites were harvested from 72 h Vero cell cultures and incubated for 30 min to 4 h at 10:1 parasite/cell ratio in 24-well plates, containing monolayers of either HMEC-1 line or human umbilical cells (HUVECs). The number of infected cells and parasitic vacuoles per infected cell were counted in Wright stained slides. A slow increase in the proportion of infected cells occurred but varied according to cell type–parasite strain combination: ME49 tachyzoites invaded up to 63 % HMEC-1 cells, while RH parasites infected up to 19 % HUVECs. ME49 and RH tachyzoites invaded 49 and 46 % HUVECs and HMEC-1 cells, respectively. Reinvasion and formation of new parasitophorous vacuoles of infected cells was more frequent than invasion of noninfected cells. The results support that the factors influencing invasion, and thus dissemination and vertical transmission, are parasite type, host cell type/subtype, and activation state.

Interestingly, *T. gondii* virulence does not seem to relay on its invasion efficiency, but probably on replication speed.

### Introduction

*Toxoplasma gondii* is a protozoan of the phylum Apicomplexa, together with numerous pathogens of significant medical and veterinary importance (Dubey 2010). The tachyzoites replicate inside nucleated cells making invasion an essential step of the life cycle, which it is a complex multistage process involving initial attachment to the host cell, followed by sequential discharge of specialized secretory organelles, and active formation of the parasitophorous vacuole (Carruthers and Boothroyd 2007). Replication and egression are other two processes that may determine parasite virulence and dissemination (Kafsack et al. 2009).

Transplacental passage of the protozoan may occur, causing congenital toxoplasmosis (Elsheikha 2008). It is known that strain virulence may influence generation of clinical problems, migration across epithelial/endothelial barriers, and vertical transmission efficiency (Ortiz-Alegria et al. 2010; Saeij et al. 2005). Paradoxically, less virulent strains seem to be more frequent among humans and domestic animals, with either acquired or congenital infection, at least in some parts of the world (reviewed in Ortiz-Alegria et al. 2010). Infection of endothelial cells lining the placental blood vessels is thought to be among the major transmission routes to the fetus; therefore, the study of their invasion is of great interest (Dimier and Bout 1993).

Actually, it is known that *T. gondii* tachyzoites invade, replicate, and traverse endothelial cells (Benedetto et al. 1997; Cortez et al. 2005; Dimier and Bout 1993, 1996; Smith et al. 2004; Zamora et al. 2008). Available data suggest that infection and proliferation depends on the endothelial cell tissue origin (Smith et al. 2004) and the parasite strain/virulence, but these

I. Cañedo-Solares · M. Calzada-Ruiz · L. B. Ortiz-Alegria · D. Correa  
Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de  
Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría Secretaría  
de Salud, Mexico, Distrito Federal, Mexico

I. Cañedo-Solares  
Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad  
Autónoma Metropolitana, Mexico, Distrito Federal, Mexico

A. R. Ortiz-Muñiz  
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, Mexico, Distrito Federal, Mexico

D. Correa (✉)  
Av. Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco,  
04530, Mexico, Distrito Federal, Mexico  
e-mail: mariadol@yahoo.com

aspects have been scarcely studied and only at one time during invasion of this cell type, i.e., before replication starts (Lachenmaier et al. 2011). The kinetics of invasion has not been analyzed comparing two endothelial cell types and two *T. gondii* strains of different virulence.

## Materials and methods

**Ethics and bioethics** The results of the present work originated from project 037/2007, approved by the research and animal care revision boards of the Instituto Nacional de Pediatría, SSA, Mexico, which lie in national as well as international regulations for research with humans and animals.

**Endothelial cells isolation and culture** HUVECs were obtained by the procedure reported before by Paez et al. (2005). Briefly, term cords were treated with 0.2 % type II collagenase (Roche, Hertfordshire, UK) and cultured until confluence at 37 °C in a 7 % CO<sub>2</sub> atmosphere, using M199 medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin sulfate, and 0.25 µg/mL amphotericin B (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA); 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Hyclone Logan, Utah, USA); 40 µg/mL bovine endothelial cell growth factor (bECGF; Roche, IN, USA); 5 IU/mL porcine heparin, 10 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). The HUVECs used in all experiments were of the third pass being >95 % cells positive for CD105, endothelial specific marker (BD PharMingen San Diego, CA USA; not shown).

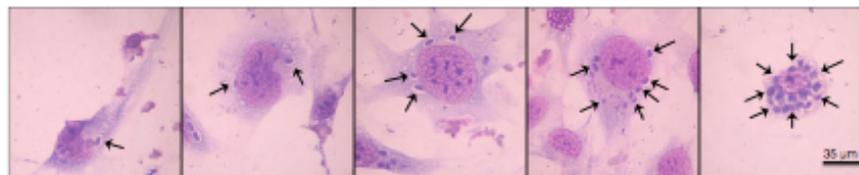
The HMEC-1 (CDC/EU HMEC-1) is a semi-immortalized and stable cell line obtained from human microvasculature (Bonnefoy et al. 2001; Xu et al. 1994). These cells were cultured according to Ades et al. (1992) and Unger et al. (2002) at 37 °C, with 7 % CO<sub>2</sub> in MCDB131 medium, supplemented with 1.0 µg/mL hydrocortisone, penicillin G (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL), and amphotericin B (0.025 µg/mL) (Gibco, Invitrogen, Grand Island, USA); 10 % FCS (Hyclone, Utah, USA), 10 mM L-glutamine, and 20 µg/mL endothelial cell growth factor bovine (bECGF; Roche, IN, USA).

Both cell types present many of the activities of endothelial cells (Pauly et al. 1992; Boufis et al. 2001).

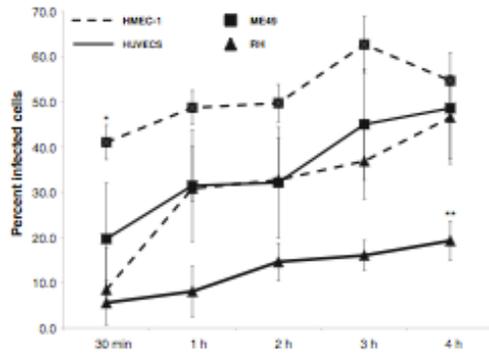
**Parasites and invasion experiments** Tachyzoites from the virulent RH and nonvirulent ME49 strains of *T. gondii* were maintained by intraperitoneal passage in Balb/c and C57BL6/RAG2<sup>-/-</sup> knockout mice, respectively. The parasites were collected in RPMI-1640 medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) from the peritoneal cavity 96 h after infection, counted, inoculated on confluent Vero cell cultures, and left for 72 h in DMEM medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10 % FCS and L-glutamine. The tachyzoites were harvested from the supernatant by low speed centrifugation, counted, and used to infect endothelial cells. Parasites were utilized only if their viability was superior to 95 %, as assessed by Trypan blue exclusion.

For invasion experiments, cells were cultured on round plastic coverslips located inside 24-well plates (Nunc, Inc., Naperville, FL), at a density of 100,000 per well in their respective complete culture media and left 72 h to allow monolayer formation. Afterwards, tachyzoites of either RH or ME49 strain were added at a dose of infection (doi) of 10:1 parasite/cell for 0.5, 1, 2, 3, or 4 h in the respective media added with 10 % FCS. This doi was chosen from preliminary experiments, in which 1:1, 2:1, 4:1, and 10:1 parasite/cell ratios were tested (not shown). We chose incubations of up to 4 h, since it has been reported that the intracellular duplication time of RH strain in human fibroblasts is around 4 h (Radke et al. 1998, 2001). After washing off the free parasites, the slides were fixed with absolute methanol and stained with Wright dye. Examples of cells infected with different numbers of vacuoles are shown in Fig. 1. Percent infected cells and number of vacuoles/infected cell were determined using an optical microscope (Carl Zeiss, Munich, Germany) at ×100 magnification, completing at least 100 cells per slide and 4 fields. Three experiments, each in triplicate, were performed.

**Statistical analysis** Differences along time and among groups were evaluated by Kruskal–Wallis ANOVA, followed, when appropriate, by Mann–Whitney *U* test, using the SPSS V18.0 software.



**Fig. 1** Examples of cell invasion by *T. gondii*. In the slides are HMEC-1 cells infected with ME49 strain at different times: 30 min, 1, 2, 3, and 4 h. Arrows indicate tachyzoites in their parasitophorous vacuoles

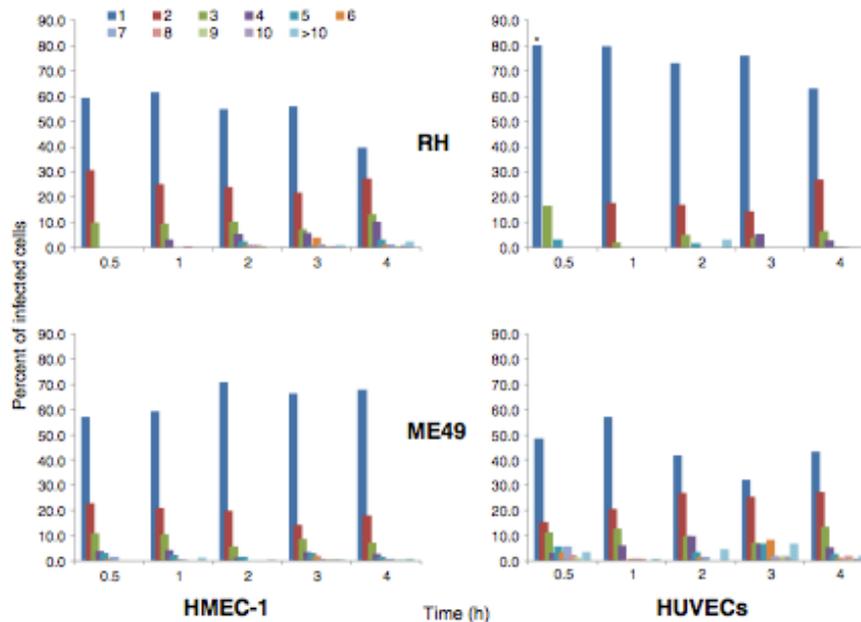


**Fig. 2** *Toxoplasma gondii* RH and ME49 invasion kinetics in two cell types, HMEC-1 and HUVECs. Parasite/cell ratio used was 10:1. Values are mean  $\pm$  SD of three experiments in triplicate. (Asterisk) significantly different to the other three combinations at 30 min only (Mann–Whitney U test,  $P < 0.05$ ). (Double asterisk) significantly different from the other three groups along time (Kruskal–Wallis,  $P < 0.01$ ), except for HMEC-1 infected by RH strain at 30 min

## Results

HMEC-1 cells were rapidly invaded by ME49 tachyzoites, i.e., more than 40 % of cells were already infected 30 min after exposure (Fig. 2). In contrast, less than 10 % HUVECs had been invaded by RH parasites at this time. In spite of this infection degree difference, the kinetics was similar, with no significant increase up to 4 h (Fig. 2). Except for HUVECs infected with RH strain, the number of vacuoles per cell significantly increased along the time, with more than 30 vacuoles per cell in some cases (Fig. 3).

Invasion of HMEC-1 cells by RH parasites and HUVECs by ME49 tachyzoites was of intermediate degree, i.e., around 30 % of cells were infected after 1 h of incubation. Nevertheless, the increase slope was not different among all groups, except for that of HMEC-1 cells infected with the RH strain, mainly because of a stepped increase from 30 to 60 min. A nonsignificantly different proportion of around 40 % was reached at the end of the incubation time, except in the case of HUVEC cells infected with RH strain, which remained very low (below 20 %) (Fig. 2).



**Fig. 3** Number of parasitophorous vacuoles per infected cell at different times of HMEC-1 and HUVECs exposition to RH and ME49 strains. The kinetics of infection was similar in HMEC-1 cells infected with the RH strain and HUVECs exposed to ME49 parasites; they

statistically differed from the other two groups along the experiment (Kruskal–Wallis,  $P < 0.05$ ). (Asterisk) significantly different from the other three groups at 30 min of exposure only (Mann–Whitney U test,  $P < 0.05$ )

## Discussion

Migration through epithelial and endothelial barriers is a major event during *T. gondii* migration and dissemination within the host body (Barragán et al. 2005; Sacij et al. 2005). Also, infection of the endothelial cells of the placental blood vessels of the decidua and within the chorionic villi is probably the main transmission route to the fetus. Thus, it is of relevance to study endothelial cell invasion. Published studies about this subject have mainly focused on the analysis of subcellular events that lead to vacuole formation or on the effect of various hormonal or immunological stimuli on tachyzoite replication (Benedetto et al. 1997; Cortez et al. 2005; Dimier and Bout 1993; 1996). Thus, there is little evidence on invasion susceptibility. For this reason, we compared the invasion kinetics of two *T. gondii* strains, RH (virulent) and ME49 (nonvirulent) in two endothelial cell types, HMEC-1 (skin microvasculature), and HUVECs (cord vasculature). Quite unexpected, the less virulent strain invaded a greater proportion of cells than the more aggressive RH strain. Lachenmaier et al. (2011) reported similar results, i.e., that RH tachyzoites invade a lower proportion of rat brain microvasculature endothelial cells in vitro than those of the ME49 strain. Even though, they only analyzed invasion at one time (2 h) and with low parasite dose (doi=1.0), which resulted in very low proportion of infected cells (<10 %). We decided to test different doses and times, and found that comparisons could not adequately be made at low doi and short times because results were largely variable among experiments. At 30 min to 4 h exposure and with a doi=10, clear differences could be seen, both in the proportion of infected cells and the number of parasitophorous vacuoles per cell. Lachenmaier et al. (2011) results were confirmed and extended regarding strain virulence influence on invasion and sustain the apparently paradoxical higher frequency of low virulence strains among subclinical acquired and congenital human cases of toxoplasmosis in some parts of the world (reviewed in Ortiz-Alegria et al. 2010).

As mentioned, the proportion of infected cells was unique for each cell type/parasite combination at 30/60 min exposure, with a slow and almost steady increase thereafter, partially due to further invasion of infected cells (the number of vacuoles per cell increased significantly along time). These data suggest that there are limiting amounts of superficial parasite or host cell mutual “receptors”, which may vary within species (polymorphisms) among cell types/subtypes within an individual and among activation states of a given cell subtype. The influence of host cell type/subtype on *T. gondii* susceptibility has been documented: It is known for example that neurons, microglia, and astrocytes are differently invaded; also, human retinal endothelial cells seem more permissive to RH tachyzoites than those obtained from the aorta, the dermis, or the umbilical vein, although it is unclear if this is due to invasion or replication related phenomena (Contreras-

Ochoa et al. 2012, 2013; Smith et al. 2004; Zamora et al. 2008). On the parasite side, *T. gondii* microneme protein 2 (MIC2) binds to the host adhesion ICAM-1, expressed by endothelial cells and the syncytiotrophoblast of the placenta (Abou-Bacar et al. 2004; Barragán et al. 2005). Variations among parasite strains in MIC2 expression could induce different invasiveness of adult or fetal endothelia. On the other hand, different levels of ICAM-1 expression might have an important impact on body dissemination and congenital toxoplasmosis occurrence.

The higher susceptibility of HMEC-1 cells to *T. gondii* invasion in comparison to HUVECs might also be related to the host cell cycle: it has been reported that RH and especially the ME49 tachyzoites preferentially invade fibroblasts, trophoblasts, or HELA cells during S phase, and that the parasite may induce the invaded cell as well as the neighboring ones to enter S phase (Angeloni et al. 2009; Lavine and Arrizabalaga 2009; Youn et al. 1991). Thus, since HMEC-1 cells are more constantly replicating, the probability that the parasite finds them in this phase is higher than in the case of HUVECs. In this regard, it has been reported that glioblastoma cell lines seem to be more susceptible to infection by RH strain than primary cultured astrocytes (Brenier-Pinchart et al. 2004).

The results of the present work support the notion that not all endothelial cells are susceptible to invasion at a given moment of exposure, and their proportion will determine the extent of the parasite dissemination or the risk for vertical transmission. Factors influencing invasion are parasite type, as well as host cell type/subtype, and activation state. Interestingly, *T. gondii* virulence relies more on its replication speed than on its invasion efficiency.

**Acknowledgments** The authors are in debt to Dr. Felipe A. Massó and Dr. Araceli Pérez for their invaluable advice and support in the collection of cords and the in vitro culture of HUVECs, to Dr. Guadalupe Santiago-Ramos for cord collection and donation, and to Héctor Luna-Pastén and Rafael López-Reboeseño for technical assistance in tachyzoite reproduction in mice. This work was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT, grant number 139721).

## References

- Abou-Bacar A, Pfaff AW, Letscher-Bru V, Filisetti D, Rajapakse R, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E (2004) Role of gamma interferon and T cells in congenital Toxoplasma transmission. *Parasite Immunol* 26:315–318
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99:683–690
- Angeloni MB, Silva NM, Castro AS, Gomes AO, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA (2009) Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo

- trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. *Placenta* 30:785–791
- Barragán A, Brossier F, Sibley LD (2005) Trans epithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol* 7:561–568
- Benedetto N, Folgore A, Ferrara C, Molierno M, Galdiero F (1997) Effects of alpha-adrenergic agonists on *Toxoplasma gondii* replication in human umbilical vein endothelial cells. *Pathol Biol* 45:9–18
- Bonnefoy A, Harsfalvi J, Pfliegler G, Fauvel-Lafève F, Legrand C (2001) The sub endothelium of the HMEC-1 cell line supports thrombus formation in the absence of von Willebrand factor and collagen types I, III, and VI. *Thromb Haemost* 85:552–559
- Bouïs D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH (2001) Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4:91–102
- Brenier-Pinchart MP, Blanc-Gonnet E, Marche PN, Berger F, Durand F, Ambroise-Thomas P, Pelloux H (2004) Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression in vitro. *Acta Neuropathol* 107:245–249
- Carruthers V, Boothroyd JC (2007) Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr Opin Microbiol* 10:83–89
- Contreras-Ochoa CO, Laguna-Martínez A, Belkind-Gerson J, Correa D (2012) *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol Res* 110:2089–2094
- Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, Díaz-Chávez J, Correa D (2013) *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Exp Parasitol* 134:256–265
- Cortez E, Stumbo AC, de Carvalho TM, Barbosa HS, Carvalho L (2005) NAD(P)H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. *J Parasitol* 91:1052–1057
- Dimer IH, Bout DT (1996) Inhibitory effect of interferon gamma-activated ovine umbilical vein endothelial cells on the intracellular replication of *Toxoplasma gondii*. *Vet Res* 27:527–534
- Dimier IH, Bout DT (1993) Cooperation of interleukin-1b and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *Immunology* 79:336–338
- Dubey JP (2010) *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, Florida
- Elsheikha HM (2008) Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. *Public Health* 22:335–353
- Kafsack BFC, Pena JDO, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB (2009) Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* 323:530–533
- Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O (2011) Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 232:119–130
- Lavine MD, Arrizabalaga G (2009) Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. *Mol Biochem Parasitol* 64:95–99
- Ortiz-Alegria LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, Correa D (2010) Congenital toxoplasmosis: the role of host and parasite genetics on transmission and pathogenesis. *Genes Immun* 11:363–373
- Paez A, Mendez-Cruz AR, Varela E, Rodríguez E, Guevara J, Flores-Romo L, Montaña LF, Massó FA (2005) HUVECs from newborns with a strong family history of myocardial infarction overexpress adhesion molecules and react abnormally to stimulating agents. *Clin Exp Immunol* 141:449–458
- Pauly RR, Passaniti A, Crow M, Kinsella JL, Papadopoulos N, Monticone R, Lakatta EG, Martin GR (1992) Experimental models that mimic the differentiation and dedifferentiation of vascular cells. *Circulation* 86:68–73
- Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, White MW (2001) Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 115:165–175
- Radke JR, White MW (1998) A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Biochem Parasitol* 94:237–247
- Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC (2005) Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect Immun* 73:695–702
- Smith JR, Franc DT, Carter NS, Zamora D, Planck SR, Rosenbaum JT (2004) Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1157–1161
- Unger RE, Konvalinkova VK, Peters K, Kirkpatrick CJ (2002) In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc Res* 64:384–397
- Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, Bosse D, Ades EW, Lawley TJ (1994) Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol* 102:833–837
- Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS, Choi WY (1991) Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Korean J Parasitol* 29:121–128
- Zamora DO, Rosenbaum JT, Smith JR (2008) Invasion of human retinal vascular endothelial cells by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Br J Ophthalmol* 92:852–855

Original Research Paper

## Potential of HMEC-1 Line and HUVEC Primary Culture Cells to Study the Neonatal IgG Fc Receptor *in vitro*

<sup>1,2</sup>Luz Belinda Ortiz-Alegria, <sup>1</sup>Irma Cañedo-Solares,  
<sup>3</sup>Felipe Vadillo-Ortega, <sup>3</sup>Marisol Castillo-Castrejón and <sup>1</sup>Dolores Correa

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México D.F., México

<sup>2</sup>Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

<sup>3</sup>Unidad de Vinculación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, México D.F., México

### Article history

Received: 15-01-2016

Revised: 19-03-2016

Accepted: 21-03-2015

Corresponding Author:  
Dolores Correa

Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México D.F., México  
Tel: +52 (55) 10840900, ext 1860 or 1873  
Email: mariadol@yahoo.com

**Abstract:** The neonatal IgG Fc receptor (FcRn) plays an important role in IgG homeostasis and immunity passive transfer. Fine points regarding these mechanisms, however, are still emerging. In order to obtain information about these phenomena, it is essential to have *in vitro* models of endothelium that express this receptor. In this study we chose two widely used models of human endothelial cells: the semi-immortalized and stable cell line HMEC-1 (CDC/USA) and the Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) which maintain morphological, phenotypical and functional characteristics of human micro and macro-vasculature endothelia, respectively. We found that both cells express the FcRn mRNA and protein using real-time RT-PCR, flow cytometry and confocal microscopy, respectively. We detected differences in mRNA expression levels in HUVECs among individuals. The protein was found on the cell surface but also intracellularly within vesicles. This study supports the use of two cell types as models of FcRn expression, allowing either to understand or to manipulate the mechanisms in which the receptor is involved *in vivo*.

**Keywords:** FcRn, Endothelial Cells, HMEC-1, HUVECs

### Introduction

Half a century ago Francis Brambell and collaborators proposed that a saturable receptor for Fc of IgG (FcRn) was responsible both for transcytosis across the intestinal epithelium or the placenta and for protection of IgG from catabolism, extending its half-life in serum (Brambell *et al.*, 1964).

This receptor, composed by an alpha chain (FCGRT) in association with Beta-2-Microglobulin (B2M), is expressed in different cell types of various organs and systems, in a wide variety of animal species, but endothelial cells are considered the main mediators of FcRn-IgG processes (Johnson *et al.*, 1975; Rodewald, 1980; Ghetie *et al.*, 1996; Borvak *et al.*, 1998; Cianga *et al.*, 2011; Rath *et al.*, 2013). It has been demonstrated in endothelial cells of the lung, term placenta villi and retino-choroids (Borvak *et al.*, 1998; Antohe *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2003; Radulescu *et al.*, 2004; Perez-Montoyo *et al.*, 2009;

Powner *et al.*, 2014). The FcRn thus seems widely distributed in the human body. It is constitutively expressed, is up-regulated by TNF- $\alpha$  and LPS and down-regulated by IFN- $\gamma$  (Liu *et al.*, 2007; 2008).

Although, there are many recent articles related to FcRn, most are focused in therapeutic uses. Several advances in engineering antibodies had been made, for half-life delay and pH-dependent binding, with consequent improvements in efficacy (Ward *et al.*, 2015). Also, the inhibition of FcRn reduces IgG levels in the organism and clears pathogenic and autoreactive antibodies, ameliorating some diseases, like idiopathic thrombocytopenic purpura, myasthenia gravis, arthritis and multiple sclerosis in mouse models (Ellinger and Fuchs, 2012; Ward *et al.*, 2015). Nevertheless, these studies have not been confirmed in humans and little is known in relation to expression levels in many cell subtypes, or whether it performs the same functions. The FcRn is an unusual receptor, because it binds IgG at acidic pH; however, specific mechanisms remain to be

elucidated (Rath *et al.*, 2013). It is not clear whether IgG uptake occurs via fluid phase pinocytosis or whether this is a receptor-mediated phenomenon at the surface level; neither is it certain whether this mechanism depends on the cellular type. Knowledge about how FcRn carries out its function in human cells is of relevance to understand how IgG levels are regulated (Borvak *et al.*, 1998).

FcRn not only binds to monomeric IgG but also to antigen/antibody complexes. In some cases it facilitates efficient immune responses towards opsonized antigens or pathogens (Johnson *et al.*, 1975; Qiao *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2012; 2014). In other cases this route could serve microorganisms to traverse epithelial barriers, e.g., Cytomegalovirus covered with human IgG, is suggested to traverse the syncytiotrophoblast and the fetal endothelium at the villi, reaching the fetus (Maidji *et al.*, 2006). Likewise, HIV-1 transcytosis across epithelia is enhanced by this receptor (Gupta *et al.*, 2013). Furthermore, IgG transfer offers opportunities for delivery of therapeutic antibodies or coupled proteins, so it is of great interest to examine and characterize the FcRn interaction on IgG transport, due to its potential effect on their *in vivo* pharmacokinetic dynamics (Mathur *et al.*, 2013).

In order to examine these phenomena at sub-cellular level and their regulation, *in vitro* cultures of endothelial cells expressing FcRn would be useful. Two widely used models of human endothelial cells are the semi-immortalized and stable cell line HMEC-1 (CDC/USA) obtained and transformed in 1992 by Ades *et al.* (1992) and the Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), originally isolated by Jaffe *et al.* (1973). The first shares similar morphological, phenotypical and functional characteristics with human microvascular endothelial cells (Ades *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1994; Unger *et al.*, 2002). Even though they have been used to assess the intracellular route of the FcRn protein by means of transfection experiments with the gene recombined to green fluorescent protein, it has not been reported that these cells are able to express the endogenous gene (Ober *et al.*, 2004a).

The second cell type is probably the most frequently used model of normal human endothelia, since it is more readily available than those obtained from other vessels, is commonly free of pathological processes and is physiologically relevant (Marin *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003). The presence of FcRn has been shown in endothelial cells of the arteries and the vein of cord samples by immunohistochemistry (Zhao *et al.*, 2011). Yet, the location and function of the FcRn in these cells are unknown; this is relevant because they form the wall of large vessels, where these aspects are intriguing.

Thus, we performed assays to determine the expression (both messenger and protein) and location of this receptor in HMEC-1 and HUVECs and present our findings in the following pages.

## Materials and Methods

### Human Cords and Ethical Aspects

This project was sanctioned by the Research and Ethics Committees of the National Institute of Pediatrics, of the Ministry of Health of Mexico (No.060/2011), which abides by national and international research regulations.

HUVECs were isolated from seven term human cords (38-40 gestation weeks) from indicated caesarean delivery, with neither active labor nor clinical or microbiological evidence of infection. Patients were recruited at the Hospital Materno Infantil Inguaran of the Ministry of Health of Mexico City, Mexico and gave their informed consent. Samples were immediately transferred to suitable media composed by M199 medium (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA), an antibiotic-antimycotic mixture [100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin sulfate and 0.25 µg mL<sup>-1</sup> amphotericin B] (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Hyclone Logan, Utah, USA); and transported in sterile conditions to the laboratory within one hour after collection.

### Cell Culture

Isolation of HUVECs was carried out according to the procedure described by Paez *et al.* (2005). Briefly, cells were collected by 0.2% collagenase type II digestion (Roche, Hertfordshire, UK) for 30 min at 37°C, then, cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (Beckton Dickinson, NJ, USA) and cultured until confluence, at 37°C in a 7% CO<sub>2</sub> atmosphere, in M199 medium (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA) supplemented with antibiotic-antimycotic mixture (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA); 10% heat-inactivated FCS (Hyclone Logan, Utah, USA); 40 µg mL<sup>-1</sup> bovine endothelial cell growth factor (bECGF; Roche, IN, USA); 5 IU mL<sup>-1</sup> porcine heparin, 10 mM HEPES and 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO, USA). Confluent HUVECs were subcultured twice after 0.05% Trypsin-EDTA treatment (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA); therefore, the cells used in all experiments were of the third pass (if > 95% viable). HMEC-1 cells were cultured according to Ades *et al.* (1992) in MCDB131 medium (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA), supplemented with 1.0 µg mL<sup>-1</sup> hydrocortisone, penicillin G (100 IU mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 µg mL<sup>-1</sup>) and amphotericin B (0.025 µg mL<sup>-1</sup>) (Gibco/BRL, Life Technologies, Grand Island, USA), 10% FCS (Hyclone Logan, Utah, USA), 10 mM L-glutamine and 20 µg mL<sup>-1</sup> bovine endothelial cell growth factor (bECGF; Roche, IN, USA) at 37°C, with 7% CO<sub>2</sub>, until confluence. They were detached using 0.25% Trypsin-

EDTA (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) for 2-3 min at 37°C. Only cells with a maximum of four passages were used in this study. Four samples of HMEC-1 were taken from different cultures and tested to detect FcRn mRNA in triplicate. The action of Trypsin was stopped in both cases by adding media complemented with 5% FCS and then by centrifugation (1200 rpm for seven min).

#### *FcRn $\alpha$ -Chain (FCGRT) mRNA Detection by Real-Time RT-PCR*

RNA was isolated using TRIzol® (Ambion, Life Technologies, Grand Island, USA) according to manufacturer instructions, under RNase-free conditions, added directly to the culture flasks at 0.5 mL/1×10<sup>6</sup> HMEC-1 or HUVEC cells and 1.0 mL/100 mg human microvilli, used as positive controls (Simister et al., 1996). The concentration and quality of extracted RNA were verified using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA) and 1% agarose gel electrophoresis. cDNA was obtained by Reverse Transcription (RT) from 0.4 µg total RNA, in a volume of 20 µL, using the TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, USA) and according to manufacturer instructions. Validated Real time PCR primers and TaqMan probes designed by Applied Biosystems were: FCGRT (assay ID: Hs01108967\_m1, FAM-MGB) and B2M (TaqMan endogenous control, RefSeq: NM\_004048.2, VIC-MGB). PCR was performed in a final volume of 10 µL, using 5 µL of 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2.5 and 1.25 µL of FCGRT and B2M TaqMan set probes, respectively and 250 ng of cDNA per sample, in an Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaction conditions were: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. In some cases it was possible to obtain paired samples of placental villi and umbilical cord, which were analyzed simultaneously. The fluorescence intensity values of FCGRT and B2M were plotted; the medians were compared and the differences were calculated by Mann-Whitney U-test, considering  $p < 0.05$  statistically significant. Relative expression changes of the FCGRT gene were calculated using the FCGRT/B2M index.

#### *FcRn $\alpha$ -Chain Protein Detection by Flow Cytometry and Confocal Microscopy*

Human endothelial cells were evidenced with APC-labeled anti-human CD105 (endoglin) antibody, produced in mouse (BioLegend, San Diego, CA, USA) at 1:50 dilution (25 µg mL<sup>-1</sup>).

Detection of FcRn  $\alpha$ -chain was carried out with the anti-human FCGRT antibody, produced in rabbit (Sigma St.

Louis, MO, USA) at a 1:100 dilution and as a secondary antibody a FITC goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, USA) at 2.4 µg mL<sup>-1</sup>. As a negative control a non-related rabbit serum, at equivalent dilution, was used.

For surface immunodetection, cells were incubated with 100 µL of combined primary antibodies, at 4°C, for 30 min and washed with PBS. Afterwards, 100 µL of FcRn secondary antibody was aggregated and cells were newly incubated at 4°C, for 30 min and washed. To assess the intracellular location, both endothelial cell types were permeabilized, using the FOXP3 fix/permeabilization buffer set solution (BioLegend, CA, USA), according to manufacturer instructions. Briefly, CD-105 surface staining was done first. Afterwards, cells were incubated for 20 min with FOXP3 Fix/Perm solution and washed once with PBS and once again with FOXP3 Perm buffer. The pellets were resuspended in the latter, incubated for 15 min and centrifuged. Next, they were incubated for 30 min with the anti-FcRn antibody diluted in FOXP3 Perm buffer, washed twice and resuspended in PBS. All incubations were performed in the dark and at room temperature.

For flow cytometry, cells were detached from the culture dish by incubation for 3-5 min at 37°C with Trypsin-EDTA (Gibco, Life Technologies, Grand Island, USA) at 0.05 and 0.25%, for HUVECs and HMEC-1, respectively. Later, 10<sup>5</sup> cells per tube were subjected to intracellular or surface immunodetection. Finally, cells were resuspended in 0.5% buffered paraformaldehyde and analyzed on a Becton Dickinson FACSAria flow cytometer and using the FlowJo 8.3 software (San Jose CA, USA).

For confocal microscopy, cells were grown directly in 24 wells plates (Corning, NY, USA) with round coverslips (Nunc, Thermanox, NY, USA) and after confluence they were subjected to surface or intracellular immunodetection. DAPI was utilized to counterstain cell nuclei (DNA). Confocal images were captured using an Olympus FluoView™ FV1000 Confocal Laser Scanning Microscope (Olympus America Inc., NY, USA), equipped with lasers providing excitations at 405, 473, 559 and 635 nm. The images were captured using a 60 NA oil immersion objective and processed using FV10-ASW 1.7 Viewer. All system settings were kept identical for all experiments and signal saturation was avoided. Images to be compared were always contrast-enhanced identically.

## Results

### *FcRn $\alpha$ -Chain mRNA Levels*

The human FCGRT mRNA relative levels and the FCGRT/B2M index were homogeneous among HMEC-1 cells of different cultures and significantly higher when compared to HUVECs and villi (Fig. 1A and 1B). These differences were not due to amounts or quality of mRNA, since the B2M endogenous control was homogeneous (Fig. 1C).

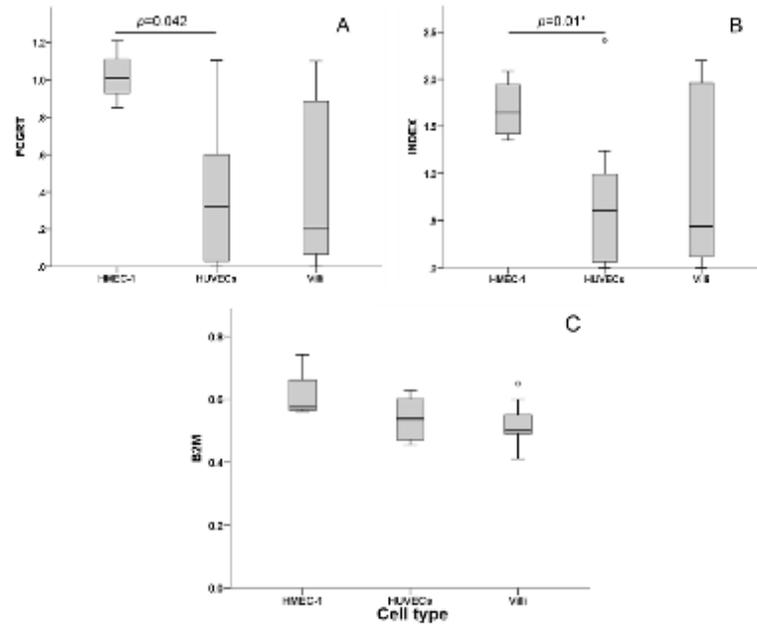


Fig. 1. FCGR2 and B2M mRNA expression measured by semi-quantitative RT-PCR. Absolute levels (A and C) and FCGR2/B2M index (B) were determined for HMEC-1 cultures (n = 4) or HUVECs and villi samples (n = 7 each). Statistical significance was calculated by Mann-Whitney U-test. \*This difference was calculated excluding the upper extreme value; the value including it was  $p = 0.074$

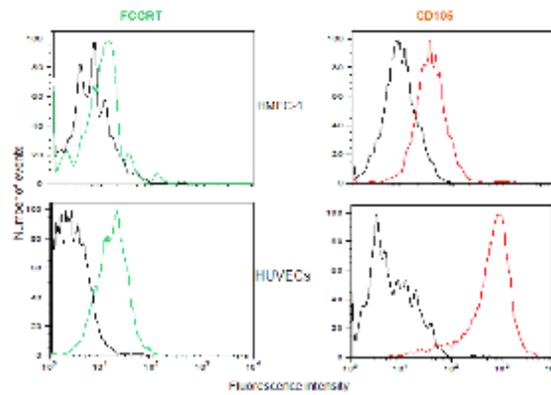


Fig. 2. Expression of the FcRn by HMEC-1 and HUVECs assessed by immunostaining and flow cytometry. Antibodies against CD105 (specific endothelial surface marker in orange) and the alpha chain of the FcRn (green) were simultaneously used to determine expression at the protein level. The black curves correspond to negative controls

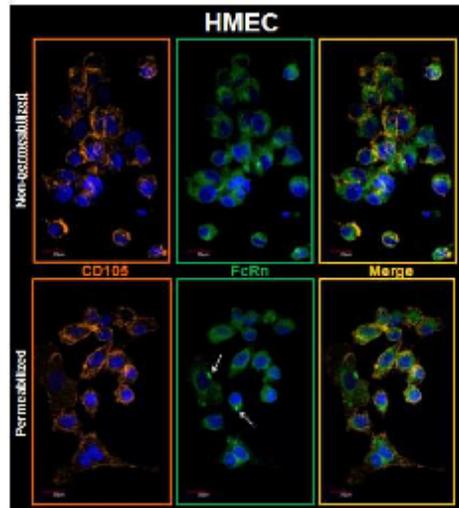


Fig. 3. Expression of the FcRn by HMEC-1 assessed by immunostaining and confocal microscopy. Antibodies against CD105 (specific endothelial surface marker in orange) and the alpha chain of the FcRn (green) were simultaneously used to determine co-localization (yellow). Nuclei are marked with DAPI (blue). Arrows point FcRn located in intracellular vesicles

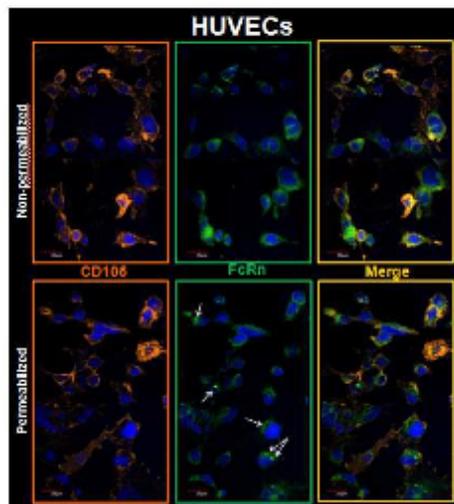


Fig. 4. Expression of the FcRn by HUVECs assessed by immunostaining and confocal microscopy. Antibodies against CD105 (specific endothelial surface marker in orange) and the alpha chain of the FcRn (green) were simultaneously used to determine co-localization (yellow). Nuclei are marked with DAPI (blue). Arrows point FcRn located in intracellular vesicles

An aspect worth remarking is the heterogeneity of FCGRT expression among individuals who donated HUVECs or villi both determined in absolute levels or index.

#### *FcRn $\alpha$ -Chain Protein Detection*

Representative cytometry graphs of human FcRn  $\alpha$ -chain protein expression by HMEC-1 and HUVECs are shown in Fig. 2. As it can be observed, both cell types are positive for this protein, although HMEC-1 apparently expressed lower levels in comparison to HUVECs. However, they loom similarly stained in the confocal microscopy images; the location is also similar, co-localizing with the orange stain of CD-105 in the majority of cells (Fig. 3 and 4). The FcRn  $\alpha$ -chain fluorescence was throughout the cell surface; however, when the cells were permeabilized the fluorescence was also detected in the cytoplasm, including vesicles. The FcRn fluorescence intensity detected by cytometry and confocal microscopy was similar among HUVECs of different individuals (data not shown).

#### **Discussion**

Human FcRn is a receptor involved in two important mechanisms of IgG-mediated passive protection and homeostasis, described long ago: Transcytosis and internalization (Ward and Ober, 2009), which are performed by epithelial and endothelial cells (Borvak et al., 1998). It is probably also related to amelioration of pathogenic events, but this has not been confirmed in humans. Furthermore, due to controversy about sub-cellular mechanisms underlying these phenomena, it is important to have human cell models that express FcRn.

In this study we demonstrate that two varieties of human endothelial cells, HMEC-1 and HUVECs, of microvasculature and of macrovasculature, respectively, express the receptor and its location. We chose these two cell subtypes because they are easy to obtain and grow *in vitro* and they have specific characteristics of endothelia (Ades et al., 1992; Xu et al., 1994; Unger et al., 2002; Lang et al., 2003). Using RT-PCR, cytometry and confocal microscopy we found that both cell types express FCGRT mRNA and protein and can therefore be used as models to study processes mediated by this receptor. Zhao et al. (2011) detected the FcRn in the cytoplasm of both arterial and venous endothelial cells by immunohistochemistry in sections of umbilical cords from full-term healthy pregnant women; so our results are consistent with theirs. However, we could semi-quantify mRNA of the alpha chain of the receptor and we found expression heterogeneity among individuals. Also, we located the molecule both superficially and intracellularly.

Regarding HMEC-1, Ober et al. (2004a; 2004b) used FcRn-Green Fluorescent Protein (GFP)-transfected HMEC-1 cells to analyze the trafficking of the receptor and its IgG ligand. They demonstrated the capacity of these cells to express both B2M and FcRn alpha chain genes if transfected, but they did not show expression of the endogenous gene. In this study we confirmed that HMEC-1 cells are expressing this molecule on the surface, where it co-localized with CD105, but also within vesicle-like structures in the cytoplasm.

It was interesting to find that HMEC-1 cells homogeneously express higher mRNA levels than HUVECs and villi. In the later two, mRNA expression differed among individuals. This could be due to gender, gestational age or the part of the cord taken to isolate the cells. This was reinforced by the fact that different levels were found with the samples of the same individual (not shown). Another explanation is differential gene regulation. In this regard, Liu et al. (2007) found that stimulation of intestinal epithelial cell lines, macrophage-like THP-1 and freshly isolated human monocytes with TNF- $\alpha$  up-regulated FcRn gene expression. In addition, the TLR ligands LPS and CpG oligodeoxynucleotide enhanced FcRn expression, specifically in THP-1 and monocytes. Addition of NF- $\kappa$ B in TNF-stimulated THP-1 resulted in down-regulation of the FcRn gene. Likewise, the same group showed that IFN- $\gamma$  down-regulated FcRn expression at both mRNA and protein level, which was STAT-1 signaling pathway-dependent in the same cells but detected a relative inability of IFN- $\gamma$  to down-regulate FcRn production in Caco-2 cells (Liu et al., 2008). These findings indicate that control mechanisms of FcRn transcription regulation differ among cell types (Liu et al., 2008).

In our study, the protein amount seemed not to vary as assessed by confocal microscopy, but we found differences between HMEC-1 and HUVECs by flow cytometry, in this case being HMEC-1 cells less positive. Nevertheless, this could be due to the fact that they were detached with higher concentrations of trypsin; the receptor may be sensitive to the action of the protease, which is reinforced by a similarly lower label of the endothelial marker CD105 (Fig. 2).

In permeabilized cells of both types, some vesicle-like structures filled with FcRn, but not CD105 were seen, which supports that the location of the receptor is superficial and intracellular (probably in endosomes).

The results suggest that the HMEC-1 line could serve as a good model to study FCGRT related processes. However, it is important to consider that it is a transformed line and some of the regulatory mechanisms could be altered. In fact, mRNA levels of FCGRT are much higher in these cells than in HUVECs or villi, although for B2M they were similar (Fig. 1).

One question that remains unclear is the biological function of the FCGR1 in HUVECs *in vivo*, for these cells are not likely to be involved in transcytosis. Since they belong to macro-vasculature endothelium, it is also unlikely that they have an important role in IgG level regulation, like microvasculature cells do, but this cannot be ruled out. Of interest is that the absolute and relative mRNA expression of both FCGR1 and B2M genes were similar between HUVECs and chorionic villi, but important differences among individuals were found.

### Conclusion

HMEC-1 and HUVEC endothelial cells express the neonatal Fc gamma receptor on the surface as well as intracellularly, enabling them as models for FcRn expression. This grants the possibility of understanding and manipulating the mechanisms in which the receptor is involved. Of importance is that expression of the alpha chain varies of among HUVECs from different individuals.

### Acknowledgement

This article is part of the PhD Thesis of OALB within the "Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)". She also was granted with scholarship 174371 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

We are indebted to Dr. Araceli-Paez Arenas and Dr. Felipe Alonso Masso-Rojas, from the National Institute of Cardiology, for their training in HUVECs and HMEC-1 isolation and culture and to Dr. Anaclara Castro-Santana for critical conceptual and language review.

### Funding Information

This work had partial support from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT, grant No. 139721) and Federal Funds from INP (No. 060/2011).

### Author's Contributions

All authors read and approved the final manuscript.

**Luz Belinda Ortiz-Alegria:** Design and conduction of work; data analysis and manuscript writing.

**Irma Cañedo-Solares:** Experiments design and conduction; review and correction of the manuscript.

**Felipe Vadillo-Ortega:** Intellectual expertise, review and correction of design and manuscript.

**Marisol Castillo-Castrejón:** Collection of samples; review and correction of the manuscript.

**Dolores Correa:** Research line leader, who conceived and designed the study. Data analysis and interpretation and manuscript writing.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflicting interest in this work.

### References

- Ades, E.W., F.J. Candal, R.A. Swerlick, V.G. George and S. Summers *et al.*, 1992. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.*, 99: 683-690. PMID: 1361507
- Antohe, F., L. Radulescu, A. Gafencu, V. Ghetie and M. Simionescu, 2001. Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum. Immunol.*, 62: 93-105. DOI: 10.1016/S0198-8859(00)00244-5
- Baker, K., T. Rath, W.I. Lencer, E. Fiebigler and R.S. Blumberg, 2012. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70: 1319-1334. DOI: 10.1007/s00018-012-1100-8
- Baker, K., T. Rath, M. Pyzik and R.S. Blumberg, 2014. The role of FcRn in antigen presentation. *Front. Immunol.*, 5: 408-408. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00408
- Borvak, J., J. Richardson, C. Medesan, F. Antohe and C. Radu *et al.*, 1998. Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int. Immunol.*, 10: 1289-1298. DOI: 10.1093/intimm/10.9.1289
- Brambell, F.W., W.A. Hemmings and I.G. Morris, 1964. A theoretical model of  $\gamma$ -globulin catabolism. *Nature*, 203: 1352-1354. DOI: 10.1038/2031352a0
- Cianga, C., P. Cianga, P. Plamadcala and C. Amalinei, 2011. Nonclassical major histocompatibility complex I-like Fc neonatal Receptor (FcRn) expression in neonatal human tissues. *Hum. Immunol.*, 72: 1176-1187. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.08.020
- Ellinger, I. and R. Fuchs, 2012. HFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport: Protection of and threat to the human fetus and newborn. *Wien. Med. Wochenschr.*, 162: 207-213. DOI: 10.1007/s10354-012-0085-0
- Ghetie, V., J.G. Hubbard, J.K. Kim, M.F. Tsen and Y. Lee *et al.*, 1996. Abnormally short serum half-lives of IgG in  $\beta$ 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, 26: 690-696. DOI: 10.1002/eji.1830260327
- Gupta, S., J.S. Gach, J.C. Becerra, T.B. Phan and J. Pudney *et al.*, 2013. The Neonatal Fc Receptor (FcRn) enhances Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS Pathog.*, 9: e1003776-e1003776. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003776

- Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker and C.R. Miinick, 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, 52: 2745-2756. DOI: 10.1172/JCI107470
- Johnson, P.M., P. Trenchev and W.P. Faulk, 1975. Immunological studies of human placenta. Binding of complexed immunoglobulin by stromal endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 22: 133-138. PMID: 765018
- Lang, I., M.A. Pabst, U. Hiden, A. Blaschitz and G. Dohr *et al.*, 2003. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Cell. Biol.*, 82: 163-173. DOI: 10.1078/0171-9335-00306
- Liu, X., L. Ye, Y. Bai, H. Mojidi and N.E. Simister *et al.*, 2008. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN- $\gamma$  can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *J. Immunol.*, 181: 449-463. DOI: 10.4049/jimmunol.181.1.449
- Liu, X., L. Ye, G.J. Christianson, J.Q. Yang and D.C. Roopenian *et al.*, 2007. NF- $\kappa$ B signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. *J. Immunol.*, 179: 2999-3011. DOI: 10.4049/jimmunol.179.5.2999
- Maidji, E., S. McDonagh, O. Genbacev, T. Tabata and L. Pereira, 2006. Maternal antibodies enhance or prevent Cytomegalovirus infection in the placenta by Neonatal Fc Receptor-mediated transcytosis. *Am. J. Pathol.*, 168: 1210-1226. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050482
- Marin, V., G. Kaplanski, S. Gres, C. Farnarier and P. Bongrand, 2001. Endothelial cell culture: Protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J. Immunol. Meth.*, 254: 183-190. DOI: 10.1016/S0022-1759(01)00408-2
- Mathur, A., T. Arora, L. Liu, J. Crouse-Zeiniedini and V. Mukku, 2013. Qualification of a homogeneous cell-based neonatal Fc Receptor (FcRn) binding assay and its application to studies on Fc functionality of IgG-based therapeutics. *J. Immunol. Meth.*, 390: 81-91. DOI: 10.1016/j.jim.2013.01.011
- Ober, R.J., C. Martinez, X. Lai, J. Zhou and E.S. Ward, 2004a. Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: An analysis at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11076-11081. DOI: 10.1073/pnas.0402970101
- Ober, R.J., C. Martinez, C. Vaccaro, J. Zhou and E.S. Ward, 2004b. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J. Immunol.*, 172: 2021-2029. DOI: 10.4049/jimmunol.172.4.2021
- Paez, A., A.R. Méndez-Cruz, E. Varela, E. Rodriguez and J. Guevara *et al.*, 2005. HUVECs from newborns with a strong family history of myocardial infarction over express adhesion molecules and react abnormally to stimulating agents. *Clin. Exp. Immunol.*, 141: 449-458. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02858.x
- Perez-Montoyo, H., C. Vaccaro, M. Hafner, R.J. Ober and W. Mueller *et al.*, 2009. Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 2788-2793. DOI: 10.1073/pnas.0810796106
- Powner, M.B., J.A. McKenzie, G.J. Christianson, D.C. Roopenian and M. Fruttiger, 2014. Expression of neonatal Fc receptor in the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 55: 1607-1615. DOI: 10.1167/iov.13-12574
- Qiao, S.W., K. Kobayashi, F.E. Johansen, L.M. Sollid and J.T. Andersen *et al.*, 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *PNAS*, 105: 9337-9342. DOI: 10.1073/pnas.0801717105
- Radulescu, L., F. Antohe, V. Jinga, V. Ghetie and M. Simionescu, 2004. Neonatal Fc receptors discriminates and monitors the pathway of native and modified Immunoglobulin G in placental endothelial cells. *Hum. Immunol.*, 65: 578-585. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.02.029
- Rath, T., T.T. Kuo, K. Baker, S.W. Qiao and K. Kobayashi *et al.*, 2013. The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG. *J. Clin. Immunol. Suppl.*, 1: S9-17. DOI: 10.1007/s10875-012-9768-y
- Rodewald, R., 1980. Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat. *J. Cell. Biol.*, 85: 18-32. DOI: 10.1083/jcb.85.1.18
- Simister, N.E., C.M. Story, H.L. Chen and J.S. Hunt, 1996. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur. J. Immunol.*, 26: 1527-1531. DOI: 10.1002/eji.1830260718
- Unger, R.E., V. Krump-Konvalinkova, K. Peters and C.J. Kirkpatrick, 2002. *In vitro* expression of the endothelial phenotype: Comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc. Res.*, 64: 384-397. DOI: 10.1006/mvre.2002.2434
- Ward, E.S., S.C. Devanaboyina and R.J. Ober, 2015. Targeting FcRn for the modulation of antibody dynamics. *Mol. Immunol.*, 67: 131-41. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.02.007
- Ward, E.S. and R.J. Ober, 2009. Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Adv. Immunol.*, 103: 77-115. DOI: 10.1016/S0065-2776(09)03004-1
- Ward, E.S., J. Zhou, V. Ghetie and R.J. Ober, 2003. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int. Immunol.*, 15: 187-195. DOI: 10.1093/intimm/dxg018

- Xu, Y., R.A. Swerlick, N. Sepp, D. Bosse and E.W. Ades *et al.*, 1994. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cell line (HMEC-1). *J. Invest. Dermatol.*, 102: 833-837. PMID: 7516395
- Zhao, Y., Y. Liu, Z. Chen, C. Korteweg and J. Gu, 2011. Immunoglobulin G (IgG) expression in human umbilical cord endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 59: 474-488.  
DOI: 10.1369/0022155411400871