



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“EFECTO PARASITICIDA DE UN AGONISTA DE LA
DEHIDROEPIANDROSTERONA (Δ DHEA) EN EL PARÁSITO
INTRACELULAR *Toxoplasma gondii*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGA

Presenta:

ANGÉLICA LUNA NOPHAL

Director de Tesis:

Dr. Jorge Morales Montor

Asesor Interno:

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez



PAPIIT-IN214011

México D.F. Noviembre, 2012



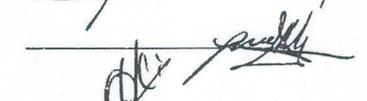
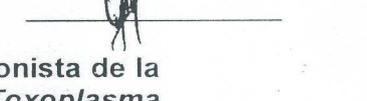
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna LUNA NOPHAL ANGÉLICA, con número de cuenta 406077701, de la carrera de Biología se le ha fijado el día 28 del mes de noviembre de 2012 a las 15:00 hrs. para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE BIÓL. MARÍA DEL CARMEN SALGADO MEREDIZ 
- VOCAL DR. JORGE MORALES MONTOR* 
- SECRETARIO M. en IBSH ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ 
- SUPLENTE DRA. JUANA MONROY MORENO 
- SUPLENTE BIÓL. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ 

El título de la tesis que presenta es: Efecto parasitocida de un agonista de la Dehidroepiandrosterona (ΔDHEA) en el parásito intracelular Toxoplasma gondii.

Opción de titulación: tesis.

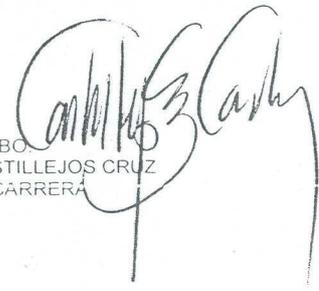
Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE DE ESTUDIOS “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU” México, D. F. a 29 de octubre de 2012.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ ZARAGOZA DIRECCION

RECIBI OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO. DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ JEFE DE CARRERA



DEDICATORIA

A mi mamita que ha sido la persona más importante en toda mi vida, la única que siempre me ha apoyado incondicionalmente en todo lo que he decidido emprender en la vida, ella que ha sido ejemplo de perseverancia, valor, esfuerzo, y amor

A mi papá, un hombre excepcional al cual admiro, amo y me ha apoyado siempre, él me ha enseñado nunca darme por vencida y luchar por todo lo que deseo lograr

A mi esposo y mi hija que han sido mi motivación para superarme desde que estamos juntos compartiendo una vida

A mis hermanitas Sari y Gabi, con las que he compartido todo, nosotras que siempre hemos sido amigas y cómplices en muchas cosas, y aunque nos peleamos o tenemos malos entendidos, siempre nos apoyamos y defendemos unas a la otra

A mi tío Juan que siempre ha sido para mí como un padre más que un tío, de quien siempre he recibido un apoyo incondicional y el mejor ejemplo en todo

A mi abuelita Roberta que es la mujer más ejemplar que he conocido en toda mi vida y de la cuál admiré su fortaleza, valores y el amor que siempre nos ha dado

"El éxito de la vida no está en vencer siempre, sino en no desanimarse nunca."

Anónimo.



AGRADECIMIENTOS

Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por que es un orgullo formar parte de una de las universidades más importantes de América Latina y el mundo.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme admitido y formado como profesional con ayuda de sus excelentes profesores de la mejor carrera: **BIOLOGÍA**.

Al Dr. Jorge Morales Montor por haberme recibido en su laboratorio, haber confiado en mi para desarrollar un proyecto de investigación dentro de su laboratorio y haberme brindado su ayuda y apoyo en todo momento de la realización del proyecto, además por ser uno de los mejores investigadores que he tenido el placer de conocer.

A la Dra. Saé Muñoz Hernández, quién ha sido mi asesora durante todo el desarrollo de la tesis, por soportarme y haber tenido mucha paciencia conmigo, pero sobre todo porque todo lo que sé de *Toxoplasma gondii* lo he aprendido gracias a ella que es una excelente investigadora.

A la Maestra en IBSH. Angélica Flores Ramírez que fue la mejor profesora de asignatura que tuve durante la carrera, por haberme aconsejado tan sabiamente sobre lo que pudiera hacer en un futuro y por haber confiado siempre en mi capacidad y sobre todo por haberme escuchado y guiado cuando más desesperada estaba en el término de la carrera.

A mis sinodales, la Bióloga María del Carmen Salgado Merediz, la Dra. Juana Monroy Moreno y la Bióloga Itzen Aguiñiga Sánchez, por haberme apoyado en la revisión de mi tesis y por los consejos que me dieron.

A la Bióloga Lorena López Griego, Técnico Académico del laboratorio; por su ayuda, enseñanza y asesoría durante el desarrollo de las técnicas que ocupé durante el desarrollo de mi tesis. Y por la amistad y confianza que me ha brindado.

Al Dr. Rómel Hernández Bello por haberme enseñado algunas técnicas que me fueron de gran ayuda en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. José Díaz del Instituto Nacional de Cancerología por haber proveído material indispensable para la realización exitosa de este proyecto de tesis, y por su amable contribución para con la misma.

A mis compañeros de laboratorio Nelly, Rosalía, Itztli, Eli, Monse, Ana, Cristián, Hugo, Nashla, Armando, Víctor, MarIsa, Jonathan, Valeria, Ricardo, Paul, Lorena, sin olvidar a la Dra. Karen; los que en este tiempo que llevo conviviendo con ellos me han aceptado como soy y me han brindado su ayuda cuando la he requerido.

Al programa de la SEP BECANET por haberme otorgado el apoyo para tesis de licenciatura de la convocatoria del año 2011.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-IN214011 por haberme otorgado una beca de tesis en el año 2012.

Personales

A mis padres que me han brindado siempre su apoyo y ayuda incondicional aún cuando me he equivocado; por ser quienes me han dado todo cuanto han podido y por haberme enseñado los mejores valores con los que una persona puede crecer, porque siempre han creído en mí y me han dado todo su amor y comprensión.

A mi esposo Fernando quien a pesar de todos los problemas siempre ha estado conmigo y me ha apoyado incondicionalmente para que pudiera continuar con mis estudios, quién siempre ha estado a mi lado en mis desvelos, cuidado muy bien de nuestra hija cuando salía y a quién amo y espero continuar con él por mucho tiempo más.

A mi hija Cristal que es lo que más amo en esta vida, la que con su llegada más que ser un impedimento ha sido mi principal motivo para que continúe superándome día a día. Quién siempre me espera con una sonrisa cuando llegó de un día pesado en el laboratorio y hace que olvide todo y recuerde que ella es todo para mí.

A mi tío Juan quien es uno de los hombres que más amo, ya que él ha sido más un padre que un tío, el que siempre ha procurado por mi sin tener obligación de hacerlo, solamente por el

gran amor que nos tiene. Gracias a él he salido adelante porque siempre he contado con su apoyo, su ayuda y sus consejos.

A mis hermanas Sarita y Gabita que han sido mis confidentes, mis amigas y sobre todo las mejores hermanas que alguien pueda tener. Ya que siempre he contado con ellas en las buenas y en las malas, las que siempre me han aconsejado, me han felicitado y también me han regañado. Muchas gracias, porque ustedes saben tan bien como yo lo difícil que es llegar hasta donde estamos, las amo mucho “sisteritas”.

A mi Abuelita Roberta que ha sido siempre para mí un gran ejemplo de valor y esfuerzo, quien me ha enseñado que no existe nada que te impida lograr lo que quieras, para quién los valores son lo más importante y en quién siempre he confiado y de la que también he tenido un apoyo y amor incondicional.

A la Dra. Saé quién además de haberme enseñado todo lo que sé, me ha aguantado, y ha sido muy paciente conmigo, quién me ha aconsejado y me ha apoyado siempre, por ser una de las mejores mujeres que he conocido y con los mejores valores que alguien pueda tener y por ser de la más absoluta confianza.

Al Dr. Jorge porque además de ser un excelente investigador, es una persona que no solo me ha brindado su apoyo en el ámbito académico, si no también me ha dado muchos consejos que me han servido en mi vida personal y porque tengo la seguridad de que es un hombre ejemplar en quien se puede confiar.

A mis tíos Roberto y Rosaura porque siempre me han mostrado afecto y aprecio, por los consejos que me han dado y porque siempre me han apoyado cuando se los he pedido, pero sobre todo porque somos familia y tenemos la satisfacción de saber que siempre hemos estado todos unidos.

A mis suegros porque a pesar de todo siempre me han mostrado afecto y cariño, ellos que siempre me han apoyado en el cuidado de mi hija y han comprendido lo difícil que ha sido para mí ser madre, esposa y estudiante. Gracias por la comprensión, la ayuda brindada y los consejos que sabiamente me han dado cuando he cometido errores.

A mi gran amiga Yolis que desde que nos conocimos hemos sido las mejores amigas, juntas hemos pasado de todo, bueno y malo y finalmente después de todos estos años estamos aquí, titulándonos juntas como siempre habíamos querido, por fin lo logramos Yolis. Te quiero mucho amiguita y a lo que sigue.

A mis amigos Jessica y Rodolfo con los cuales la amistad ha perdurado por muchos años y seguirá por muchos más, por los agradables momentos que hemos pasado juntos y por los consejos que nos hemos dado los unos a los otros.

Finalmente y no menos importante a toda mi familia en general por que tengo la satisfacción de tener una muy grande y sobre todo muy unida en las buenas y en las malas.

Gracias a todos en general por que directa o indirectamente han sido participes en la realización y finalización de esta tesis y estoy segura que sin ustedes no se hubiera logrado.

ÍNDICE GENERAL	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Marco Teórico	4
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	4
2. Ciclo de vida	4
a. Replicación sexual	4
b. Replicación asexual	5
3. Formas Infecciosas de <i>T. gondii</i>	6
a. Esporozoíto	6
b. Bradizoíto	6
c. Taquizoítos	7
4. Invasión Activa	8
5. Invasión Pasiva	10
6. Toxoplasmosis	11
a. Tratamiento convencional contra la toxoplasmosis	12
b. Nuevos tratamientos	16
c. Dehidroepiandrosterona (DHEA)	17
IV. Planteamiento del problema	20
V. Hipótesis	21
VI. Objetivos	22
1. Objetivo general	22
2. Objetivos particulares	22
VII. Metodología	23
1. Cultivo de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	23
2. Purificación de taquizoítos	23
3. Ensayos <i>in vitro</i>	23
a. Supervivencia de taquizoítos expuestos al agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA)	23
4. Ensayos <i>ex vivo</i>	23
a. Inducción de macrófagos peritoneales en ratones <i>Balb-cAnN</i>	23
b. Activación de macrófagos <i>ex vivo</i>	24

c. Invasión y Proliferación en macrófagos de ratón de taquizoítos tratados con el Δ DHEA	24
5. Análisis estadístico	26
VIII. Resultados	27
1. Capacidad parasiticida del agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) en taquizoítos extracelulares de la cepa RH de <i>T. gondii</i>	27
2. Capacidad de invasión de los taquizoítos tratados con el agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA), en macrófagos de peritoneo de ratón activados <i>ex vivo</i>	29
3. Capacidad de proliferación de los taquizoítos tratados con el agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA), en macrófagos de peritoneo de ratón activados <i>ex vivo</i>	32
IX. Análisis de resultados	36
X. Conclusiones	40
X1. Perspectivas	41
XII. Referencias	42
XIII. Anexos	45
Anexo 1. Índice de figuras	45
Anexo 2. Índice de tablas	46
Anexo 3. Preparación de reactivos y soluciones	46
Anexo 4. Gráficas de invasión de macrófagos invadidos con taquizoítos tratados por 30 min y 2 h con Δ DHEA y S-P a 2 y 24 horas de incubación	48

I. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo analizar el efecto parasiticida de una agonista de la dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) *ex vivo* e *in vitro* sobre el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*, debido a que este parásito ocasiona la zoonosis denominada toxoplasmosis; la cual es una enfermedad con una alta prevalencia a nivel mundial, y es de gran importancia en la salud pública debido a las patologías que la infección genera, sobre todo en personas con su sistema inmune comprometido, como es el caso de las personas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o personas con trasplantes de órganos y que se encuentran en terapias de inmunosupresión. Aunado a esto, la terapia convencional contra esta zoonosis que es el uso de dos fármacos combinados con actividad sinérgica (sulfadiazina-pirimetamina) ocasiona importantes efectos secundarios y además no es efectiva cuando la enfermedad se encuentra en estadio crónico, por lo que se buscan alternativas de tratamiento que sean más efectivas y que no generen efectos secundarios.

En este estudio se encontró que el Δ DHEA posee un mejor efecto parasiticida *in vitro* comparado con la terapia convencional; lo que nos sugiere la posibilidad de poder utilizarlo *in vivo* para probar su efecto en un modelo murino y de esta manera utilizarlo en un futuro como alternativa en el tratamiento de la toxoplasmosis.

En los ensayos *ex vivo* se encontró que el Δ DHEA tiene un mejor efecto con respecto al proceso de invasión y el tratamiento convencional de S-P posee un mejor efecto en los mecanismos relacionados al proceso de proliferación; afectando en gran medida ambos procesos por efecto de los diferentes fármacos utilizados. Por lo anterior, es probable que al generar un tratamiento combinado de los tres compuestos, Δ DHEA-S-P, se obtenga un efecto sinérgico, debido a que nuestros resultados muestran que ambos tratamientos actúan a diferentes niveles.

Ahora bien, resulta importante probar el efecto de la Δ DHEA de forma *in vivo* ya que como se menciono anteriormente ambos tratamientos (Δ DHEA y S-P) funcionan a niveles diferentes, y cabe la posibilidad de que, si el tratamiento convencional es efectivo solo en la forma extracelular *T. gondii*, el tratamiento que estamos probando (Δ DHEA) al ser un agonista de una molécula endógena al organismo pueda ser más efectiva afectando al parásito en su forma intracelular, generando así una terapia sinérgica.

II. INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una zoonosis que afecta a todos los animales de sangre caliente, es provocada por el parásito *Toxoplasma gondii* (Nicolle y Manceaux, 1908, Tenter *et al.*, 2000; Suárez-Hernández *et al.*, 2005; Ferguson, 2009), y afecta aproximadamente al 40% de la población mundial (Tenter *et al.*, 2000; Muñiz y Mondragón, 2009). Entre las patologías que la infección con el parásito provoca se encuentran: linfopatía, hidrocefalia, coriorretinitis y encefalitis (Tenter *et al.*, 2000). El tratamiento que se administra tradicionalmente es una terapia combinada de pirimetamina y sulfadiazina; sin embargo, un porcentaje considerable de la población presenta intolerancia a las sulfadiazinas y sus derivados (Hill y Dubey, 2002, Dubey, 2008). A la fecha existen reportes que indican que estos compuestos atacan a los glóbulos blancos de la médula ósea provocando anemia; en consecuencia la terapia convencional va acompañada de un complemento con ácido fólico (Rosso *et al.*, 2007).

La toxoplasmosis se presenta a nivel mundial, pero muestra un importante sesgo en el número de casos, siendo mayor en países como Brasil y Cuba, en contraste con países como Vietnam y Corea (Muñiz y Mondragón, 2009). Actualmente, no hay reportes que indiquen las razones por las que se presentan importantes diferencias en la incidencia de la infección entre poblaciones o regiones, algunos factores que deben tomarse en cuenta son: la carga genética, las condiciones medio ambientales y los hábitos regionales tanto alimenticios como de higiene (Tenter *et al.*, 2000). En este sentido, una característica notable es el alto porcentaje de consumo diario tanto de mariscos como de diversas algas.

El desarrollo de nuevos fármacos para combatir las infecciones con *T. gondii* se ha quedado rezagado debido a que la toxoplasmosis ha sido clasificada como importante únicamente para un determinado grupo social que desarrolla uno o más de los síntomas característicos (coriorretinitis, encefalitis, hepatomegalia, linfadenitis hidrocefalia, macrocefalia, calcificaciones intracraneales), personas con su sistema inmune comprometido. Sin embargo, aunque las personas con sistema inmune competente no presenten síntomas al momento de la infección, corren el riesgo de desarrollar de forma tardía la enfermedad, debido a que *Toxoplasma* es un parásito re-emergente (Muñiz y Mondragón, 2009). El tratamiento convencional es una terapia combinada de dos fármacos (sulfadiazina y pirimetamina) generalmente complementada con ácido fólico, para contrarrestar la anemia generada; por lo que resulta de vital importancia contar con tratamientos alternativos eficientes, que carezcan de efectos secundarios.

En México existen muy pocos grupos de investigación enfocados al desarrollo de nuevos fármacos con efecto parasiticida. Nuestro grupo ha orientado parte de sus investigaciones a estudiar el efecto de las hormonas esteroideas sexuales sobre la respuesta inmune a diferentes infecciones parasitarias. Entre las hormonas estudiadas se encuentran la testosterona, el estradiol y la dehidroepiandrosterona (DHEA). Esta última tiene efecto en diferentes parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Taenia crassiceps*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, entre otros, ya que disminuye considerablemente la viabilidad de estos.

Hasta el momento sólo se ha evaluado la respuesta a las hormonas en parásitos de vida libre en el organismo hospedero; sin embargo, poco o nada se conoce del efecto que estos compuestos podrían tener sobre parásitos de vida intracelular, como es el caso de *Toxoplasma gondii*. En este estudio nos propusimos evaluar el efecto parasiticida de un agonista de la DHEA, que si bien homóloga la vía intracelular de la hormona carece de los efectos propios de la misma. De acuerdo a nuestros datos el agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) puede ser una alternativa de tratamiento o prevención, ya que al homologar un compuesto endógeno, no mostraría condiciones alérgicas o efectos secundarios, presentando un mayor número de ventajas sobre el tratamiento convencional.

III. MARCO TEÓRICO

III.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado, que pertenece al phylum *Apicomplexa*. En 1908, los biólogos Charles Nicolle y Louis Manceaux lo identificaron en tejidos del roedor *Ctenodactylus gundi* en el norte de África (Nicolle y Manceaux, 1908). La morfología “común” de media luna de la forma infectiva del parásito (taquizoíto) con un extremo más agudo que el otro, fue descrita en 1909; concluyendo con sus análisis que se trataba de una especie aún no descrita, por lo que propusieron llamar al nuevo género *Toxoplasma* (toxon = arco y plasma = vida) y la especie del género *gondii*, que deriva del nombre del roedor donde fue encontrado; siendo la única especie del género *Toxoplasma* (Nicolle y Manceaux, 1909).

III.2. Ciclo de vida

Toxoplasma gondii tiene un ciclo de vida facultativo heterogéneo con todos los felinos, incluyendo al gato doméstico, como huéspedes definitivos, y todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre, como huéspedes intermediarios. Presenta dos tipos de replicación dependientes de la clase de hospedero donde se lleve a cabo, sexual en huéspedes definitivos, y asexual en huéspedes intermediarios (Tenter *et al.*, 2000).

III.2.a. Replicación sexual

El ciclo comienza cuando algún felino consume una presa que está infectada, con quistes tisulares en sus tejidos. En estos, la forma del bradizoíto se libera en el tracto digestivo y por acción de las enzimas se rompe. Los bradizoítos recién liberados invaden los enterocitos del intestino delgado del huésped definitivo, y se inicia el desarrollo de cinco formas asexuales, morfológicamente distintos, dando lugar a un proceso denominado gametogonia (la cual comprende tres fases de diferenciación sexual), que se refiere a la producción de macrogametos y microgametos. Después el microgameto fertiliza al macrogameto dando como resultado la formación del cigoto, que es el que finalmente dará lugar al ooquiste que contiene en su interior a los esporozoítos. Los ooquistes son liberados al ambiente en las heces de los felinos en forma no esporulada o en forma inmadura, la cual no es infecciosa. Si las condiciones de temperatura y humedad son adecuadas, estos esporulan, e infectan a los hospederos si estos los ingieren (Fig. 1A) (Dubey *et al.*, 1998; Galván y Mondragón, 2001).

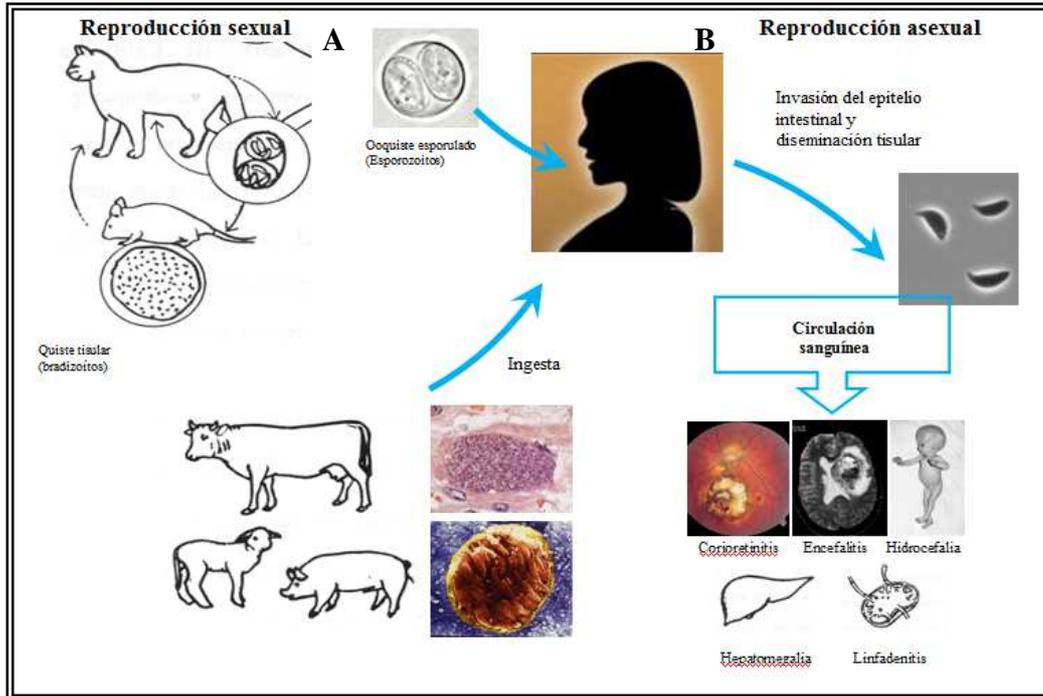


Fig. 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

El ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* se divide en dos fases: **A.** Reproducción sexual, la cual tiene lugar en el huésped definitivo, dando como resultado la formación de ooquistes inmaduros que son liberados al ambiente. **B.** Reproducción asexual, tiene lugar en los huéspedes intermedios, al ingerir ooquistes esporulados del ambiente o quistes tisulares de otros huéspedes intermedios, los esporozoítos y/o bradizoítos se diferencian en taquizoítos, los cuales replican y se diseminan por todo el organismo pudiendo desencadenar diferentes patologías (tomada de Muñiz y Modragón, 2009).

III.2.b. Replicación asexual

El ciclo de replicación asexual inicia cuando algún huésped intermedio ingiere ooquistes maduros libres en el ambiente o quistes tisulares presentes en los tejidos de otros animales de consumo. De manera similar a lo que ocurre en el ciclo sexual, las formas infectivas, esporozoítos y/o bradizoítos, son liberadas a partir de sus quistes por acción de las enzimas digestivas. Una vez libres en el tracto intestinal se diferencian rápidamente a la forma móvil, altamente invasiva, el taquizoíto. Una vez diferenciado a taquizoíto, el parásito invade el epitelio intestinal, atraviesa la lámina propia y llega al torrente sanguíneo a partir del cual se disemina a todos los órganos; se desconoce si en el torrente sanguíneo viaja en forma libre o como parásito intracelular dentro de los eritrocitos (Galván y Mondragón, 2001). El taquizoíto tiene la capacidad de invadir cualquier célula nucleada del organismo y atravesar las diferentes barreras inmunoprivilegiadas como son la hemato-encefálica y la placentaria (Fig. 1B) (Muñiz y Mondragón, 2009).

La fase aguda de la toxoplasmosis se caracteriza por la diseminación de la forma de taquizoíto a todo el cuerpo del hospedero, y su replicación dentro de cualquier célula nucleada. Los taquizoítos se diferencian en bradizoítos, con lo cual comienza la formación de quistes tisulares que aparecen de 7 a 10 días postinfección (Galván y Mondragón, 2001). El desarrollo de quistes en los tejidos a través del tiempo es lo que define la forma de infección crónica del ciclo de vida asexual (Black y Boothroyd, 2000).

III.3. Formas infectivas de *T. gondii*

De acuerdo a los ciclos reproductivos del parásito, éste presenta tres formas infectivas. Las tres formas son infecciosas tanto para el huésped intermediario como para el huésped definitivo, y la infección se puede dar entre huéspedes intermediarios, entre huéspedes definitivos o entre ambos (Tenter *et al.*, 2000).

III.3.a. Esporozoíto

La forma del esporozoítos esta contenida dentro de la estructura del ooquiste. Los ooquistes son expulsados a través de las heces de los felinos como una forma inmadura. Se considera una forma latente, resistente a la mayoría de las condiciones medio ambientales, como son temperatura y humedad. El esporozoíto se convierte en una forma infectiva cuando el ooquiste inmaduro esporula, y da como resultado ocho esporozoítos infecciosos (Fig. 2A) (Galván y Mondragón, 2001; Hill y Dubey, 2002).

III.3.b. Bradizoíto

Es la forma de lenta replicación, se encuentra dentro de los quistes tisulares durante la infección crónica de los hospederos intermediarios. El tamaño de los quistes tisulares varía de 10 a 100 μ m y llegan a contener en su interior miles de bradizoítos (Fig. 2B). La estructura quística es capaz de evadir al sistema inmune del hospedero y a los diferentes agentes terapéuticos utilizados para tratar la toxoplasmosis. Al ser una forma silente, es capaz de permanecer toda la vida del individuo, sin emerger y desarrollar síntomas. Si el sistema inmune del individuo se compromete puede emerger rápidamente, diferenciándose nuevamente a taquizoíto y desencadenando las diferentes patologías (Galván y Mondragón, 2001; Muñiz y Mondragón, 2009).

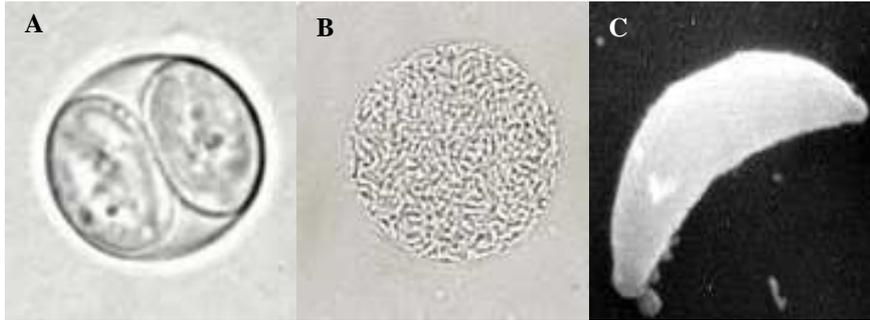


Fig. 2. Formas infectivas de *Toxoplasma gondii*.

- A.** Ooquiste, conteniendo 4 esporozoítos, forma latente presente en el medio ambiente, **B.** Quiste tisular, en su interior contiene cientos de bradizoítos, forma latente en tejidos animales. **C.** Taquizoíto, forma móvil altamente invasiva (tomada de Muñiz-Hernández, 2009).

III.3.c. *Taquizoíto*

El taquizoíto es la forma asexual infectiva, altamente invasiva y estrictamente intracelular, tiene un tamaño aproximado de $3 \times 7 \mu\text{m}$ (Fig. 2C) (Muñiz y Mondragón, 2009). Algunos autores han sugerido que en algunos animales como ovejas y cabras, el taquizoíto puede encontrarse en diversos fluidos corporales como la leche, sangre, saliva, esputo, orina, lágrimas y semen, durante la fase aguda de la infección. La forma del taquizoíto es muy sensible a las condiciones del medio ambiente y mueren rápidamente fuera de sus células huésped (Dubey y Beattie, 1988; Dubey *et al.*, 1998).

El taquizoíto es la forma infectiva encontrada por Nicolle y Manceaux (1908), que dio origen a su taxonomía, mostrando una forma de media luna. En la morfología del parásito es claramente distinguible un extremo apical (Ap) (Fig. 3C) y un extremo posterior (Pp) (Fig. 3C), lo que está determinado por la polarización de tres organelos principales, el conoide (c), las roptrias (r) y los micronemos (mn), en el extremo apical. El taquizoíto posee núcleo (n), retículo endoplásmico (re), una única mitocondria (mt), aparato de Golgi (Fig. 3A); además de poseer dos organelos especializados propios del phylum, el apicoplasto y el acidocalciosoma. El cuerpo del taquizoíto se encuentra rodeado por un complejo de tres membranas, conocido como películo (p), conformado en la parte más externa por la membrana plasmática, que recubre completamente el cuerpo del parásito; y por el complejo membranal interno el cual está compuesto por una doble membrana, que está interrumpida tanto en el extremo apical como en el extremo posterior (Muñiz y Mondragón, 2009). El citoesqueleto lo componen 22 microtubulos (m) que están anclados al anillo polar anterior, por de debajo del conoide, y los cuales recorren el cuerpo del parásito hasta $2/3$ partes

(Nichols y Chiappino, 1987). Entre las dos membranas que conforman el complejo membranal interno se localiza una red subpelicular, formada por actina y proteínas asociadas a actina, como profilina y miosina principalmente (Fig. 3B) (Patrón *et al.*, 2005). El conoide (c) es un organelo apical retráctil que se proyecta contra la membrana plasmática de la célula huésped durante la invasión activa; consiste en subunidades fibrosas de α -tubulina, que característicamente presentan una espiral en sentido contrario a las manecillas del reloj (Fig. 3C) (Nichols y Chiappino, 1987).

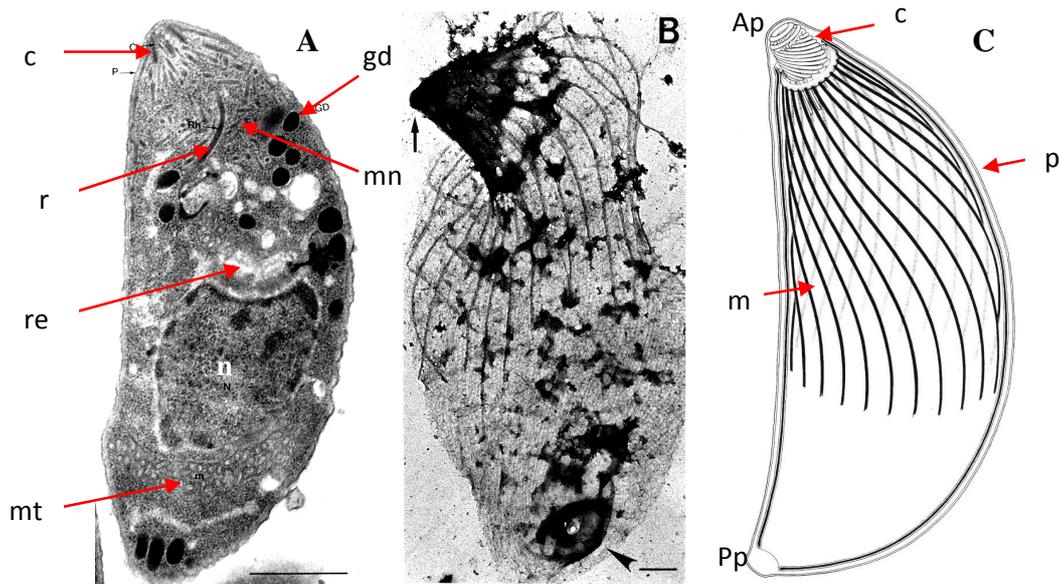


Fig. 3. Morfología del taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.

A. Micrografía de corte fino, mostrando en su interior los diferentes organelos del parásito (tomada de Muñiz-Hernández, 2009) B. Micrografía del citoesqueleto de actina-miosina y la red subpelicular por la técnica de tinción negativa (tomada de Patrón *et al.*; 2005) C. Esquema de la estructura de microtúbulos del parásito y sus membranas (tomada de Nichols and Chiappino, 1987). Conoide (c), granulos densos (gd), micronemos (mn), roptrias (r), reticulo endoplasmico (re), núcleo (n) y mitocondria (mt), extremo apical (Ap), peliculo (p), conoide (c), microtubulos (m) y extremo posterior (Pp).

III.4. Invasión Activa

El parásito carece de órganos de locomoción, pero lleva a cabo una serie de movimientos giratorios sobre su sustrato, a través de su citoesqueleto de actina-miosina (Galván y Mondragón, 2001). El proceso de invasión por penetración activa involucra la participación de organelos secretores (micronemos, las roptrias y gránulos densos), los cuales participan en la adhesión a la célula hospedera, la penetración y la formación de la vacuola parasitófora en la que una vez dentro de la célula huésped el parásito reside y se reproduce asexualmente por endodiogenia (Ravindran *et al.*, 2009; Muñiz y Mondragón, 2009). El proceso de penetración

activa comprende aproximadamente 5 fases: la fase de adhesión (Fig. 4. A) que tiene lugar cuando el taquizoíto entra en contacto con la membrana plasmática de la célula hospedera, se lleva a cabo mediante la liberación del contenido de los micronemos, los cuales adhieren al parásito a la membrana de la célula permitiendo su deslizamiento e iniciando la fase de reconocimiento (Fig. 4. B). El parásito se desliza por la superficie de la célula huésped extruyendo el conoide y sensando el sitio de internalización; la fase de internalización (Fig. 4. C) inicia cuando el parásito vacía el contenido de las roptrías sobre la membrana, desestabilizándola, permitiendo el paso hacia el interior por medio de la constricción del cuerpo del parásito, al mismo tiempo el contenido de las roptrías forma un sello entre las membranas plasmáticas del parásito y de la célula hospedera. Conforme el parásito entra se forma la vacuola parasitófora (Fig. 4. D), que está acompañada de la liberación del contenido de los gránulos densos, esto la modifica y la convierte en el nicho idóneo para su replicación (Fig. 4. E), donde se multiplica asexualmente por endodiogenia. El tiempo de replicación *in vitro* es de aproximadamente 6 – 8 horas (Black y Boothroyd, 2000). El proceso de salida de su célula hospedera se realiza después de varios ciclos de replicación intracelular y comprenden prácticamente las mismas fases (a la inversa) que el proceso de invasión activa. La extrusión de los taquizoítos ocasiona la lisis de sus células huésped, los parásitos salen en forma activa y pueden invadir inmediatamente otra célula hospedera en el microambiente

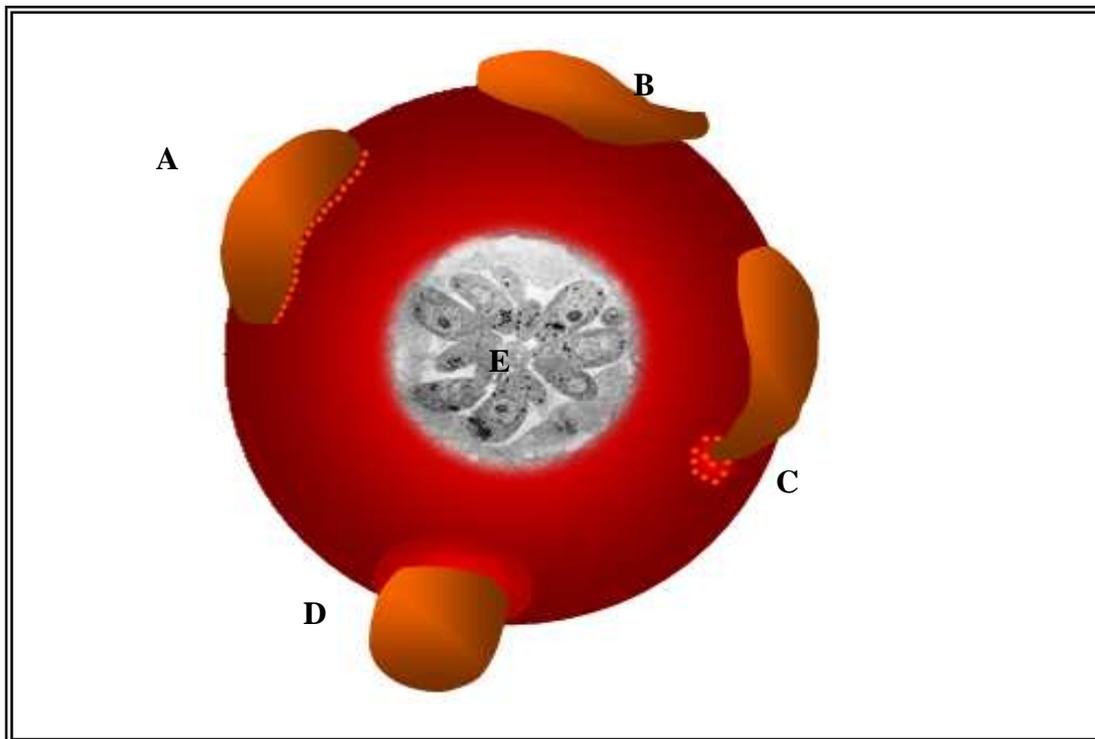


Fig. 4. Invasión Activa representada en un eritrocito.

Pasos de la invasión activa. **A.** Adhesión, **B.** Deslizamiento, **C.** Extrusión del conoide, **D.** Internalización, **E.** Replicación (tomada de Muñiz-Hernández, 2009).

inmediato.

III.5. Invasión Pasiva

La invasión pasiva de *Toxoplasma gondii* se lleva a cabo en las células fagocíticas, las cuales tienen el papel de célula efectora. El parásito adherido (Fig. 5. A) a la célula fagocítica es rodeado por elongaciones de la membrana plasmática de la propia célula (Fig. 5. B) y es internalizado en una vacuola fagocítica hacia el citoplasma celular (Fig. 5. C y D). En el citoplasma celular el parásito prolifera exitosamente (Fig. 5. E) y después de varios ciclos emerge activo, destruyendo a su célula hospedera (Fig. 5. F) y tiene la capacidad para invadir nuevas células. A la fecha existe controversia en la forma que el parásito evade la respuesta lisosomal dentro de la célula fagocítica y evita ser degradado (Black y Boothroyd, 2000, Galván y Mondragón, 2001).

Existen dos hipótesis que explican como el parásito evita la fusión lisosomal; la primera sugiere que cuando el parásito se encuentra en el fagosoma, el taquizoíta libera sustancias que modifican el fagosoma y lo convierte en su vacuola parasitófora en donde se

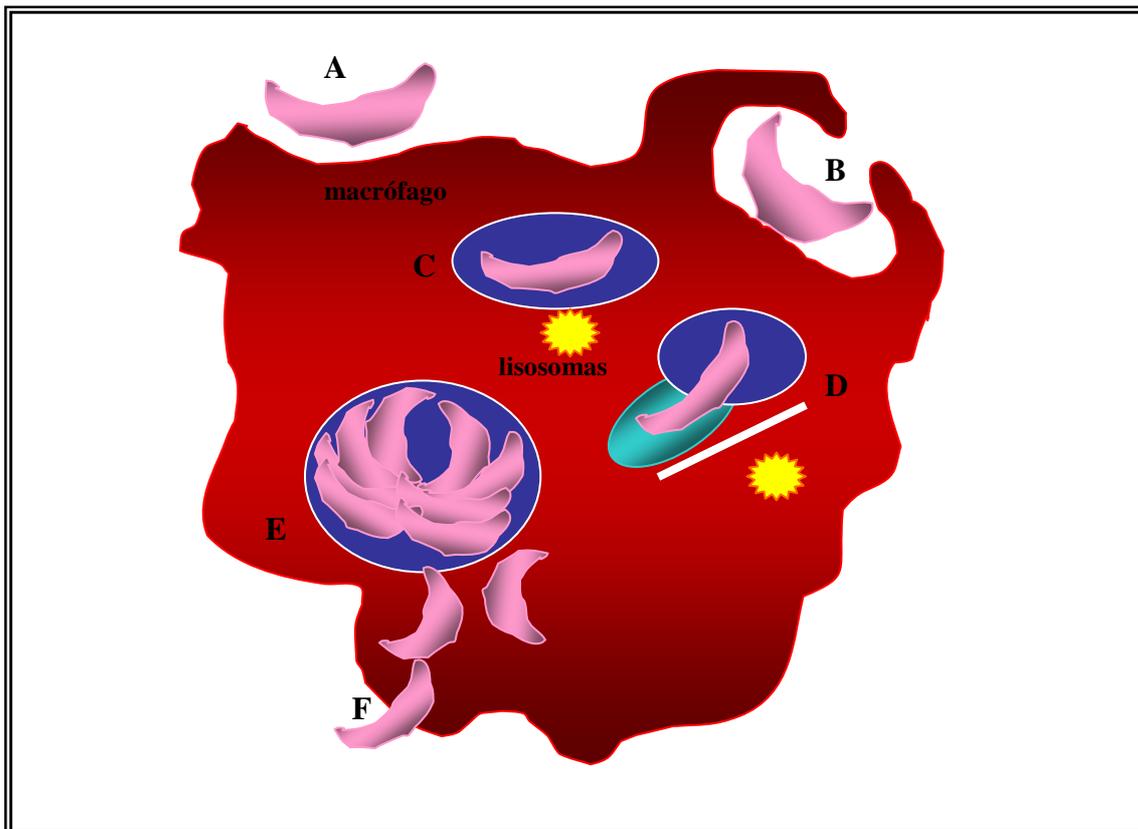


Fig. 5. Representación esquemática del proceso de Invasión Pasiva.

El proceso pasivo se lleva a cabo en células fagocíticas mediante la maquinaria propia de la célula. **A.** Adhesión. **B.** Internalización por medio de elongaciones citoplásmicas. **C.** Modificación de vacuola fagosomal. **D.** Formación de vacuola parasitófora *de novo*. **E.** Replicación. **F.** Externalización.

replica (Fig. 5. C). La segunda hipótesis plantea que el parásito escapa del fagosoma y forma *de novo* una vacuola, que corresponde a la vacuola parasitófora (Fig. 5. D). En este tipo de invasión el parásito no se reorienta y el proceso es lento (2-4 min.) comparado con el proceso llevado a cabo en la invasión activa (2-3 seg.) (Hiroshi *et al.*, 1995).

Independientemente del tipo de invasión, el taquizoíto de *Toxoplasma* nunca entra en contacto con el contenido citoplásmico de sus células hospederas.

III.6. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es la zoonosis, provocada por el parásito *Toxoplasma gondii*, la cual afecta a todos los animales de sangre caliente, como son las aves y los mamíferos, incluyendo el hombre (Tenter *et al.*, 2000; Suárez-Hernández *et al.*, 2005; Ferguson, 2009). La toxoplasmosis tiene una prevalencia a nivel mundial del 40%, es una zoonosis que muestra variaciones tanto por regiones como entre países (Tenter *et al.*, 2000; Muñiz y Mondragón, 2009). Al respecto estudios de epidemiología han reportado, que mientras para Europa la prevalencia ha sido documentada del 9-67%, en países del continente asiático se muestran prevalencias mucho menores, por ejemplo, Corea tiene una tasa del 0.8% y Vietnam del 11.2%. En el continente Americano, Brasil y Cuba reportan las tasas más altas de prevalencia en mujeres embarazadas, del 74.5% y 70.9%, respectivamente (Muñiz y Mondragón, 2009). Debido a que la toxoplasmosis en México no es considerada como una enfermedad con rasgos epidemiológicos, análisis de datos en ese campo no han sido realizados en los últimos años. La Secretaría de Salud México en 1992, pone de manifiesto las cifras de casos reportados en los hospitales regionales de cada estado. Los estados con mayor prevalencia son Tabasco, Veracruz y Campeche, todos estos en la franja costera y con porcentajes entre el 30 y 65%; mientras que estados como Sonora, Coahuila y Durango de la región norte del país presentaron prevalencias inferiores al 13% (Fig. 6) (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992). Vela-Amieva *et al.* (2005), utilizando un banco de muestras de recién nacidos midieron niveles de anticuerpos anti-*Toxoplasma* y encontraron que existe una frecuencia de 2/1,000 recién nacidos que presentan infección congénita por *Toxoplasma*; los datos abarcan los municipios y delegaciones que comprenden el Distrito Federal, Área Metropolitana y Estados incluidos en la Red de Hospitales de Pediatría. En 2012 Caballero-Ortega y su grupo de trabajo reportó a nivel nacional una tasa de seroprevalencia del 43.1%.

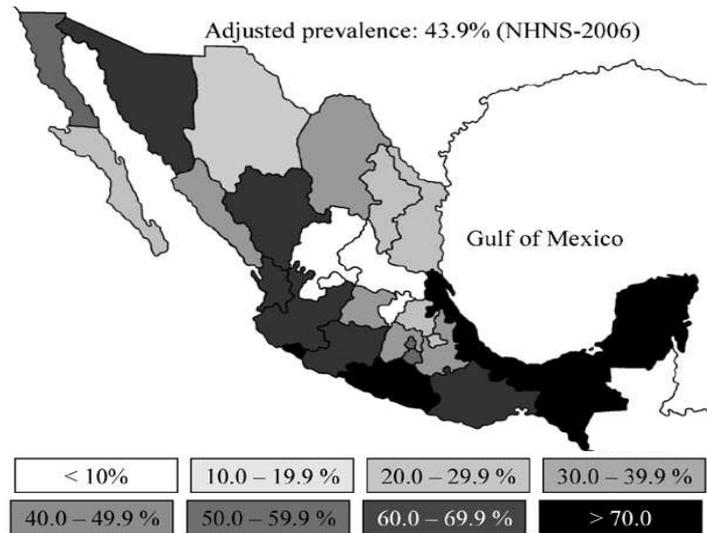


Fig. 6. Seroprevalencia de la toxoplasmosis en México.

El último estudio de seroprevalencia en México fue realizado a partir de la encuesta nacional de salud del 2000 y de la encuesta nacional de salud y nutrición del 2006, en donde la seroprevalencia a nivel nacional se reporta con un promedio de 43.1%, mostrando variaciones entre estados (tomado de Caballero-Ortega *et al*; 2012).

La toxoplasmosis humana se considera una enfermedad asintomática en personas que tienen su sistema inmune competente. Sin embargo, en personas con un sistema inmune comprometido, como son las portadoras del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH); las que están bajo terapias inmunosupresivas (como trasplantes de órganos y personas con cáncer), se desarrollan síntomas diversos. Entre los síntomas que se presentan en una infección por *T. gondii* están: linfadenopatías, cefaleas, miocarditis, hepatitis y en casos más graves puede ocasionar la muerte (Tenter *et al.*, 2000).

T. gondii tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria e infectar al feto, y se desarrolla así la toxoplasmosis congénita. Dependiendo del grado de avance del embarazo una infección por *T. gondii* puede causar hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones intracraneales, sordera, daños en la retina (coriorretinitis), retraso mental ó muerte neonatal (Rosso *et al.*, 2007; Muñiz y Mondragón, 2009). Estudios recientes han sugerido que las infecciones con este parásito en etapas tempranas o fetales inducen cambios conductuales (Costa da Silva y Langoni, 2009). Si la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo se produce el aborto inducido por *Toxoplasma*.

III.6.a. Tratamiento convencional contra la toxoplasmosis

Una vez que se ha diagnosticado la infección por *Toxoplasma gondii* existen diversos fármacos para tratar esta enfermedad; por ejemplo, las sulfamidas. La terapia combinada de

sulfonamidas con pirimetamina es la terapia estándar para la toxoplasmosis en humanos (Hill y Dubey, 2002). La espiramicina tiene actividad antitoxoplásmica en ratones; inclusive se ha utilizado profilácticamente en mujeres durante el embarazo, esto debido a que la espiramicina no es tóxica y no cruza la placenta lo que reduce la transmisión del parásito de la madre al feto (Rosso *et al.*, 2007). El descubrimiento de la actividad antitoxoplásmica de la clindamicina llevó a considerarla otro medicamento para tratar la toxoplasmosis, especialmente en pacientes alérgicos a las sulfamidas (Dubey, 2008). La principal desventaja de las sulfamidas, es la intolerancia que presenta cierto porcentaje de la población y la inducción de anemia durante su uso (Rosso *et al.*, 2007).

Los fármacos que actualmente se utilizan como tratamiento anti-toxoplásmico, están dirigidas contra una de las formas infectivas, el taquizoíto en estado extracelular, por lo que una vez que se internaliza en su célula hospedera y se localiza en la vacuola parasitófora, ninguna de dichos fármacos tiene efecto parasiticida. En la tabla 1 se enumeran algunos de los tratamientos empleados para tratar la toxoplasmosis, lo que depende de condiciones específicas. Actualmente se buscan alternativas en el tratamiento de la toxoplasmosis que sean más efectivas, con menor número de efectos secundarios.

Tabla 1. Fármacos comunmente utilizados contra la toxoplasmosis

El tratamiento y la dosis administrada es dependiente del del tipo ó zona de afección, la sintomatología y el estado del individuo.

Toxoplasmosis	Fármaco	Dosis	Referencia
Toxoplasmosis aguda (Tratamiento estándar)	Pirimetamina + sulfadiazina + ácido polínico	200 mg una vez seguido de 50 – 75 mg c/24 h + 1 – 1.5 g/kg c/6 h + 10 – 25 mg c/24 h	Shanthi <i>et al.</i> , 2011
Toxoplasmosis aguda (Alternativa, derivados del tratamiento convencional)	Trimetoprima + sulfametoxazol	5 – 25 mg/kg c/12 h	Shanthi <i>et al.</i> , 2011
Toxoplasmosis aguda en adultos	Claritromicina Tetraciclinas Sulfametoxazol Trimetoprima	1 gr c/12 h 1 gr/día/10 días 2 gr seguido de 1 gr c/12 h 60 mg c/12 h	Galván y Mondragón, 2001
Toxoplasmosis aguda en niños	Claritromicina Tetraciclinas Sulfametoxazol Trimetoprima Eritromicina	7.5 mg/kg c/12 h 25-40 mg/kg/día 50-60 mg/kg seguida de 25-30 mg/kg c/12 h 8 mg/kg 100 mg/día/3 semanas	Galván y Mondragón, 2001
Toxoplasmosis aguda (pacientes alérgicos a compuestos análogos y derivados de sulfadiazina)	Pirimetamina + ácido fólnico + clindamicina o atovacuona	200 mg una vez seguido de 50 – 75 mg c/24 h + 10 – 25 mg c/24 h + 600 mg c/6 h o 750 mg c/6 h	Shanthi <i>et al.</i> , 2011
Mujeres dentro de las 18 primeras semanas de embarazo	Espiramicina Tabletas 1 g	1 tab. c/8 h	Rosso <i>et al.</i> , 2007
Mujeres después de las 18 primeras semanas de embarazo	Pirimetamina (Tab. 25 mg) + Sulfadiazina (Tab. 500 mg) + Ácido	2 tab. c/12 h x 2 días y luego 1 tab. c/12 h + 37.5 mg/kg c/12 h x 2 días y	Rosso <i>et al.</i> , 2007

Marco teórico. Efecto parasiticida de un agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) en el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*.

	folínico (Tab. 10 mg)	luego 50 mg/kg c/12 h + 10-20 mg c/24 h	
Esquema alternativo independiente de la etapa de gestación	Espiramicina Pirimetamina* Sulfadiazina* Ácido fólico*	3 gr c/24 h 25 mg c/24 h 4 gr c/24 h 15-20 mg c/24 h	Galván y Mondragón, 2001
Recién nacido con diagnóstico o sospecha de infección	Pirimetamina + sulfadiazina + ácido fólico + Prednisona (en caso de coriorretinitis)	2 mg/kg/d x 2 días y luego 1 mg/kg/d por 2-6 meses (1 año) + 50 mg/kg/ 12 h + 10 mg 3 veces/semana (1 año) + hasta resolución de niveles de proteínas en líquido cefalorraquídeo	Rosso <i>et al.</i> , 2007
Toxoplasmosis congénita neonatos	Pirimetamina y sulfadiazina Espiramicina + prednisona	0.5 a 1 mg/kg 100 mg/kg 100 mg/kg 1 mg/kg	Galván y Mondragón, 2001
Pacientes son SIDA	Pirimetamina Ácido fólico (Leucovorin) Sulfadiazina Clindamicina	200 mg seguido de 50-75 mg diarios 10-20 mg y 50 mg post. 1-1.5 gr c/6 h 600 mg c/6 h	Galván y Mondragón, 2001
Tratamientos alternativos	Azitromicina Autovacuna Dapsona	1200-1500 mg c/24 h 750 mg c/8 h/21 días 100 mg c/24 h	Galván y Mondragón, 2001

III.6.b. Nuevos tratamientos

Debido a los efectos adversos que la terapia convencional provoca se buscan alternativas de tratamiento para combatir esta enfermedad zoonótica, además es de gran importancia combatirla debido a los altos valores de prevalencia a nivel mundial.

La hormona dehidroepiandrosterona (DHEA) es una molécula propia del organismo que se ha propuesto para ser utilizada como agente terapéutico en el tratamiento de una amplia gama de parasitosis. Su efecto ha sido probado por diversos grupos de investigación en diferentes tipos de organismos, tanto parásitos intracelulares como extracelulares.

En un estudio *in vitro* realizado en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* se observó que la DHEA afecta la viabilidad de los mismos; al inhibir la proliferación, adherencia y la motilidad e incluso se induce la lisis de los trofozoítos (Carrero *et al.*, 2006). La DHEA también ha sido probada *in vivo* e *in vitro* en metacestodos de *Taenia crassiceps*; al ser administrada en ratones antes de la infección se reduce la carga parasitaria en un 50%. La DHEA *in vitro* reduce la reproducción, motilidad y viabilidad (Vargas-Villavicencio *et al.*, 2008). En *Schistosoma mansoni*, esta hormona también ha sido probada en condiciones *in vitro* en la forma de cercaria, esquistosomula y gusano adulto. La forma de esquistosomula transformada mostró una viabilidad del 100% después de 48 horas de cultivo, en todas las formas la viabilidad se redujo de forma significativa (Morales-Montor *et al.*, 2001).

El empleo de hormonas sexuales como tratamiento en enfermedades parasitarias o de otra índole no es del todo acertado, debido a las funciones propias que tienen las hormonas como tal en el organismo. Por lo que el objeto de probar los efectos de dichas hormonas en una amplia gama de parásitos es sintetizar compuestos análogos que posean los efectos parasiticidas, pero evitando los efectos estereidogénicos propios de las hormonas sexuales.

Existe un análogo de DHEA que carece de los efectos estereidogénicos de la misma, denominado 16 α -bromoepiandrosterona (conocido como HE2000); debido a su estructura conserva algunas funciones celulares, aunque presenta el inconveniente de contener bromo en su estructura, el cual no se podría administrar a futuro en la terapia debido a que este elemento es tóxico. Este análogo ha sido probado también en *Taenia crassiceps* y *Entamoeba histolytica* en condiciones *in vivo* como *in vitro*. En los ensayos *in vitro* se encontró para ambos parásitos una reducción en la reproducción, motilidad y viabilidad. En los ensayos *in vivo* la administración del análogo previo a la infección en la cisticercosis con *Taenia crassiceps* en ratones disminuye en un 50% la carga parasitaria; y en el caso de la infección

con *Entamoeba histolytica* se encontró una reducción del 20% en los abscesos de hígado (Carrero *et al.*, 2010).

III.6.c. Dehidroepiandrosterona (DHEA)

La DHEA es una hormona esteroide producida por las glándulas adrenales, las gónadas y el cerebro a partir del colesterol y sintetizada a partir de la pregnenolona por acción de la enzima 17,20 demolasa (Fardella, 2001). Es la hormona más abundante en el organismo de todos los mamíferos, y es precursor de esteroides sexuales como la testosterona y los estrógenos (Fig. 7) (Mendivil y Borges, 2009).

La dehidroepiandrosterona (DHEA; 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona) (Zapata, 2004) es conocida como la hormona de la juventud, debido a las amplias funciones biológicas y a que las concentraciones de esta hormona en el organismo disminuyen conforme aumenta la edad del individuo. En el feto se sintetiza una cantidad elevada de esta hormona; la cual decrece bruscamente tras el nacimiento para volver a aumentar de forma rápida a los 6-8 años, a los 25-30 años alcanza la máxima concentración y a la edad de 80 años se produce una caída en los niveles hasta llegar a un 10-20% de los máximos valores (Tabla 2) (Mendivil y Borges, 2009).

Tabla 2. Concentraciones normales de DHEA en humanos (López-Mato *et al.*, 1999)

Edad	Valores de DHEA (μ g/L)
1-4 años	0.2-0.4
4-8 años	0.1-1.9
8-10 años	0.2-2.9
10-12 años	0.5-9.2
12-14 años	0.9-20
14-16 años	2.5-20
Mujeres premenopáusicas	2-15
Hombres	0.8-10

En humanos, la forma de la DHEA que se encuentra en mayor concentración en la circulación es la forma sulfatada, mientras que la DHEA en forma libre solamente se

encuentra entre 3-5 % de su concentración total, la DHEA es la forma activa de la hormona. La DHEA es metabolizada principalmente en el hígado donde se convierte a androstendiona, es decir, el principal precursor de esteroides sexuales (Zapata, 2004).

La DHEA ha sido utilizada ampliamente con fines terapéuticos de diferente índole como es el aumentar el vigor sexual y aumento de la masa muscular. También tiene efectos en el sistema nervioso central (SNC) ya que es un antagonista del receptor del ácido gamma amino butírico (GABA), inhibidor de la neurotransmisión, y un agonista del efecto neurotransmisor del glutamato (Mendivil y Borges, 2009).

En el feto; esta hormona estimula la formación de eritrocitos, además, en los

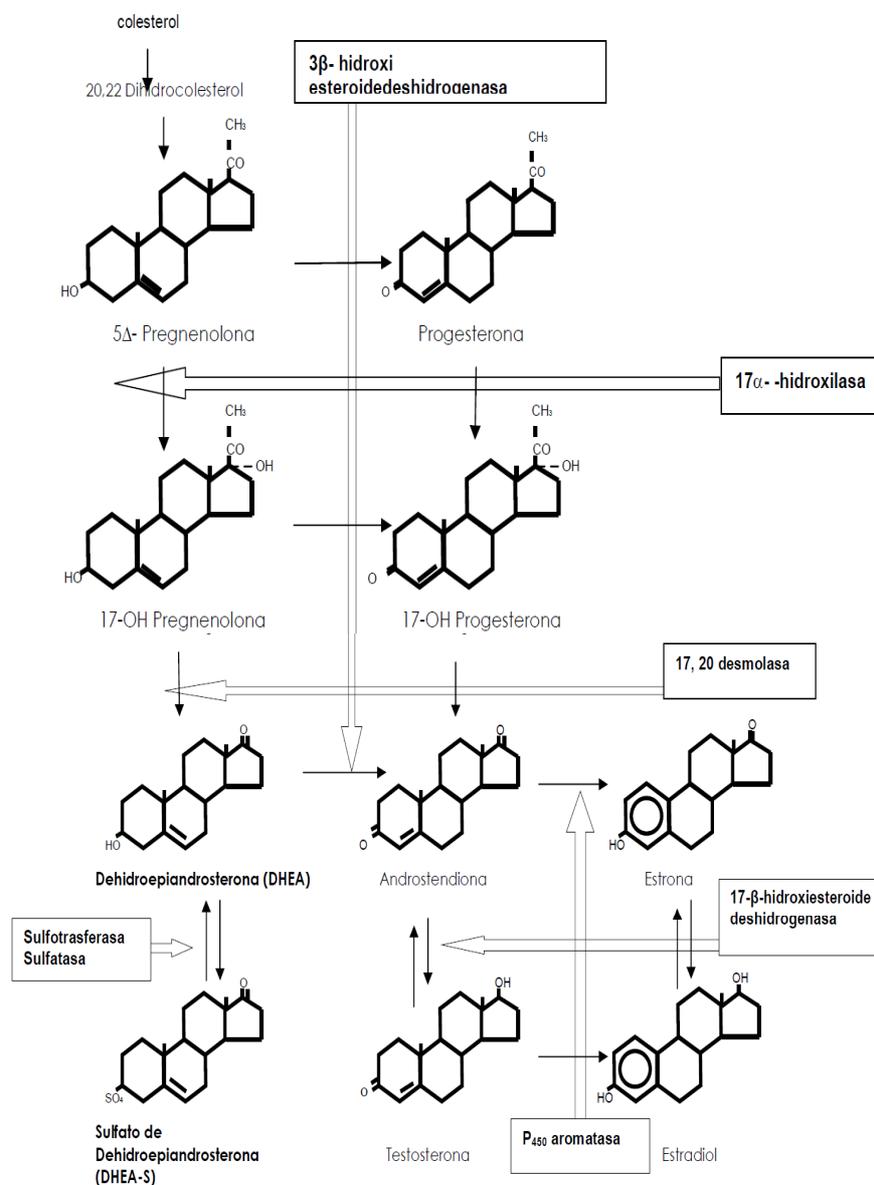


Fig. 7. Síntesis de la Dehidroepiandrosterona (DHEA).

La DHEA se sintetiza a partir del colesterol por acción consecutiva de diferentes enzimas, las cuales sintetizan diferentes compuestos hasta transformar el colesterol a 17-OH Pregnenolona, la que por acción de la enzima 17, 20 desmolasa es sintetizada finalmente en Dehidroepiandrosterona (DHEA) (tomada de Zapata, 2004).

adolescentes genera la aparición del acné, así como la aparición del vello axilar y púbico. En los varones su función se ve opacada por las altas concentraciones de testosterona, por lo que se considera un andrógeno de carácter débil (Zapata, 2004).

En el sistema inmune, la DHEA actúa como agente antiglucocorticoideo y en el proceso de autoinmunidad. En el metabolismo controla los lípidos por disminución de colesterol y triglicéridos. En el músculo propicia la glucogenólisis. En la piel controla el crecimiento piloso y secreción seboreica y aumenta la densidad ósea (López-Mato *et al.*, 1999).

Debido a las evidencias que se tienen de los efectos de la DHEA se ha recurrido a la fabricación de análogos de esta hormona; que posean el mismo efecto protector o curativo y elimine los efectos estereidogénicos (propios de la hormona), que es la principal razón de la dificultad de utilizar a la DHEA en la medicina como terapia para diferentes tipos de patologías. El análogo 16α -bromoepiandrosterona, conocido como HE2000, se ha utilizado en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana, enfermos de tuberculosis y/o malaria, observándose que mejora la inmunidad protectora y aumenta la tasa de supervivencia de estos pacientes (Nicoletti *et al.*, 2009)

La infección sintomática de *Toxoplasma* ocasiona un gran número de muertes debido principalmente a la toxoplasmosis encefálica o a la inducción de abortos; menos drásticos son los efectos sobre órganos y tejidos como ojos, hígado y músculo. Por lo que es probable que de forma similar el agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) tenga efecto parasiticida sobre el taquizoíto de *Toxoplasma gondii*; al servir de agente terapéutico, ya sea mediante su empleo como tratamiento preventivo o curativo a la infección.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica de importancia en la salud pública debido a la severidad en las patologías que genera; con una incidencia mundial que oscila entre el 30-40%; sin embargo, algunas regiones y/o ciudades presentan incidencias cercanas al 90%. La enfermedad se considera asintomática, excepto en personas que tienen su sistema inmune comprometido en quienes se presentan diferentes síntomas como miocarditis, cefaleas, y en casos más severos puede ocasionar la muerte. El tratamiento que actualmente se administra a personas infectadas con *Toxoplasma*, es una combinación de sulfadiazina y pirimetamina; la principal desventaja de esta terapia es que entre el 15-20% de la población presenta alergias contra la sulfadiazina además, el tratamiento induce depresión de la médula ósea por lo que debe administrarse de forma complementaria, ácido fólico. A pesar de la existencia de fármacos contra dicha enfermedad, es imperativo desarrollar e identificar nuevos fármacos para el tratamiento, más eficaces y que no desencadenen reacciones adversas ni tolerancia en los individuos infectados.

La DHEA se ha utilizado recientemente sobre diferentes parásitos protozoarios y helmintos, el cual ha mostrado ser un parasiticida eficaz. Esta hormona y sus análogos se han postulado como moléculas alternativas en el control de una gran variedad de infecciones parasitarias, además al ser un componente natural del hospedero podría evitar reacciones adversas. Por lo anterior, resulta importante determinar si el agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) presenta propiedades parasiticidas contra el taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.

Hipótesis. Efecto parasiticida de un agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) en el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*.

V. HIPÓTESIS

El agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA), tendrá un efecto parasiticida sobre el proceso de invasión y proliferación del taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.

VI. OBJETIVOS

VI.1. Objetivo general

Analizar el efecto parasiticida del agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) sobre taquizoítos de *Toxoplasma gondii* tanto *in vitro* como *ex vivo*.

VI.2. Objetivos particulares

1. Analizar la capacidad parasiticida del agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) en taquizoítos extracelulares de la cepa RH de *T. gondii*.
2. Determinar el efecto del Δ DHEA sobre la capacidad de invasión de taquizoítos tratados, en macrófagos de peritoneo de ratón activados *ex vivo*.
3. Determinar el efecto del Δ DHEA sobre la capacidad de proliferación de taquizoítos tratados, en macrófagos de peritoneo de ratón activados *ex vivo*.

VII. METODOLOGÍA

VII.1. Cultivo de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Los taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH se mantuvieron mediante pases consecutivos de ratones machos Balb-cAnN, de 6 - 8 semanas de edad. Los parásitos se inocularon mediante inyección en el peritoneo, 500×10^3 taquizoítos por ratón, y se dejó transcurrir la infección durante 4-5 días.

VII.2. Purificación de taquizoítos

Los ratones infectados se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el exudado peritoneal conteniendo los taquizoítos libres y en macrófagos, se centrifugo a 1,800 rpm por 15 min. La pastilla conteniendo los taquizoítos libres se resuspendió en una solución búfer de fosfatos (PBS) 1X, se realizaron dos lavados más mediante centrifugaciones repetidas. La pastilla de taquizoítos purificados se resuspendió en PBS1X, y se contaron en Cámara de Neubauer.

VII.3. Ensayos *in vitro*

VII.3.a. Supervivencia de taquizoítos expuestos al agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA)

Para determinar el efecto parasiticida del Δ DHEA sobre los taquizoítos extracelulares; se colocó 6×10^6 de taquizoítos en un volumen final de 300 μ l del Δ DHEA a las diferentes concentraciones (1, 10 y 100 nM; 1 y 10 μ M); se dejó incubar por 30 y 120 min. a temperatura ambiente (TA) en agitación suave. El conteo de parásitos totales (vivos – muertos) se realizó en cámara de Neubauer, mediante la técnica de exclusión de azul tripano.

El tratamiento convencional de sulfadiazina-pirimetamina se utilizó como control positivo a las siguientes concentraciones: 20, 50, 100, 150 y 200 μ g/mL.

VII.4. Ensayos *ex vivo*

VII.4.a. Inducción de macrófagos peritoneales en ratones *Balb-cAnN*

Para analizar el efecto del agonista de la DHEA sobre la capacidad de invasión y proliferación del taquizoíto en cultivos primarios de macrófagos, se realizó la inducción mediante el uso de aceite mineral en el peritoneo de ratones machos (cepa Balb-cAnN); se administró 1 mL de aceite mineral estéril, se permitió la diferenciación de las células durante 5 días, en seguida se

sacrificó al ratón por dislocación cervical, y el exudado peritoneal se obtuvo mediante la inyección de 5 mL de una solución de Glucosa al 1% en Buffer de fosfatos, los macrófagos se centrifugaron a 1,200 rpm por 15 min. Se desechó la fase líquida conteniendo restos del aceite mineral, mediante absorción con pipeta, el botón conteniendo los macrófagos se resuspendió en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 8% y 1% de penicilina-estreptomicina (PES). Los macrófagos purificados se plaquearon en cubreobjetos, previamente esterilizados, a una relación de $250 \times 10^3 \text{ cel}/2.5 \text{ cm}^2$ y se incubaron a 37°C en un ambiente al 5% de CO_2 .

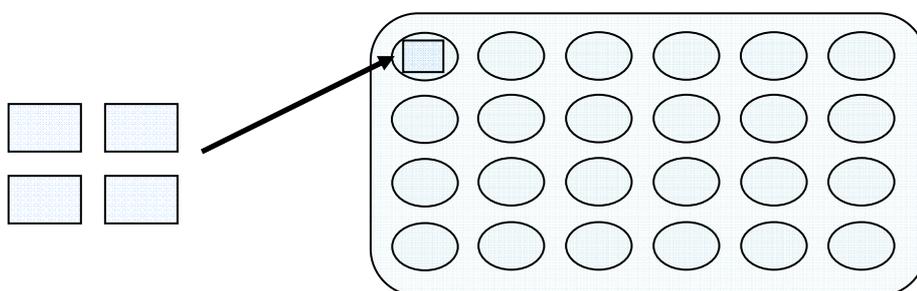


Fig. 8. Acondicionamiento de las placas para cultivo.

Esquema representativo del acomodo de los cubreobjetos en las placas (24 pozos) para el cultivo de los macrófagos peritoneales.

VII.4.b. Activación de macrófagos ex vivo

A las 24 horas los macrófagos se lavaron con medio de cultivo, y posteriormente se activaron con lipopolisacáridos (LPS, marca Sigma) a una concentración final de 50 ng/mL en medio fresco DMEM suplementado. Después de 1 h de activación los macrófagos se infectaron con los taquizoítos en las diferentes condiciones experimentales.

VII.4.c. Invasión y Proliferación en macrófagos de ratón de taquizoítos tratados con el Δ DHEA

Para analizar el efecto del agonista sobre el proceso de invasión del parásito se permitió la interacción con los macrófagos recién activados por 2 h. Al finalizar, las monocapas se lavaron una vez rápidamente con PBS 1X, y se fijaron con formaldehído al 3.7% por 30 min. Se lavaron abundantemente con PBS 1X, se fijaron con hematoxilina-eosina y se montaron en una solución PBS 1X-Glicerol (1:1) para su análisis por microscopía óptica.

El proceso de invasión se evaluó contando 300 células totales, se consideró como células invadidas aquellas que presentaron al menos una vacuola parasitófora en su

citoplasma. Los ensayos de invasión y proliferación se realizaron con 3 repeticiones independientes.

Para medir la capacidad de proliferación, se permitió la interacción parásito-macrófagos por 24 h. Las muestras se procesaron para su análisis por microscopía óptica de manera similar a las muestras de invasión.

La cuantificación de la proliferación se realizó contando en 300 células totales aquellas que presentaron en su citoplasma vacuolas parasitóforas conteniendo al menos 8 parásitos en su interior.

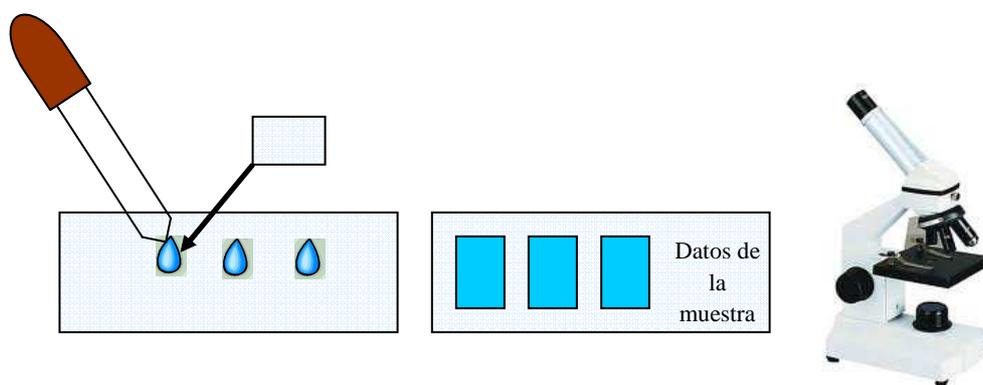


Fig. 9. Técnica de montaje de cultivos celulares.

Técnica que muestra el montaje de macrófagos invadidos y/o proliferados en PBS 1X-Glicerol (1:1), sobre un portaobjetos común.

Todas las concentraciones de Δ DHEA que se utilizaron en estos ensayos se encuentran expresadas en molaridad, por lo que resulta útil hacer la conversión de todas las concentraciones a g/mL, además señalar si estas se encuentran en el rango de concentraciones fisiológicas o farmacológicas para hacer un análisis comparativo (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones utilizadas en los ensayos

Se muestran las concentraciones que se utilizarán en los ensayos *in vitro* y *ex vivo*, con sus equivalencias en $\mu\text{g/L}$.

* concentraciones farmacológicas.

Concentración Δ DHEA	Equivalencia ($\mu\text{g/L}$)
10 μM	2.9044 mg/L*
1 μM	290.44 $\mu\text{g/L}$ *
100 nM	29.044 $\mu\text{g/L}$ *
10 nM	2.9044 $\mu\text{g/L}$
1 nM	0.2904 $\mu\text{g/L}$

VII.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante el programa ANOVA con una $p = 0.05$.

VIII. RESULTADOS

1. Capacidad parasiticida del agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) en taquizoítos extracelulares de la cepa RH de *T. gondii*.

Para analizar el efecto parasiticida del Δ DHEA sobre la forma de taquizoíto (tk) de *T. gondii*, se expusieron parásitos extracelulares por 30 min. y 2 h, a diferentes concentraciones del Δ DHEA (1, 10 y 100 nM; 1 y 10 μ M) (Fig. 10). Para validar el efecto del Δ DHEA, se utilizó el tratamiento convencional Sulfadiazina-Pirimetamina a diferentes dosis (20, 50, 100, 150 y 200 μ g) (Fig. 11).

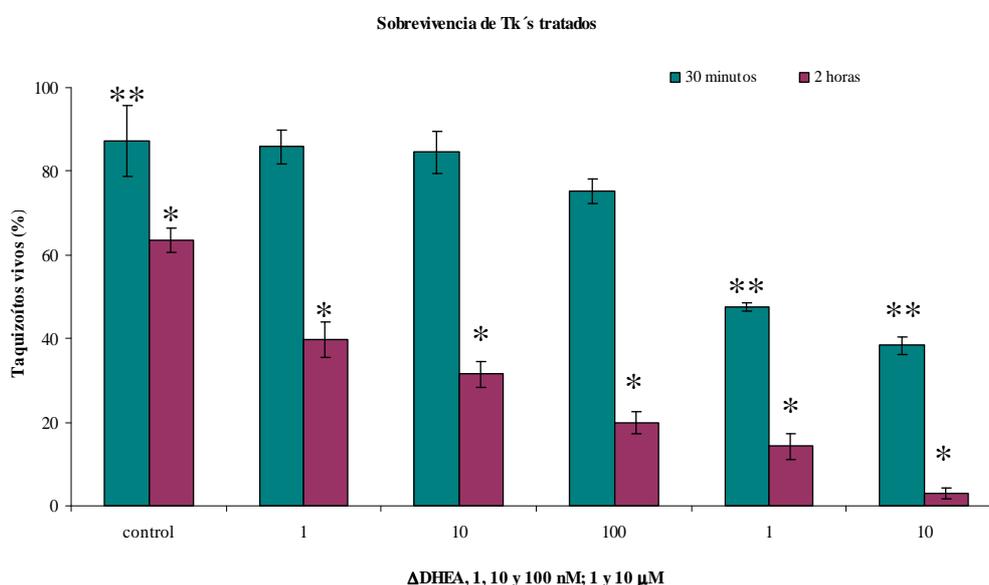


Fig. 10. Curva dosis-respuesta de Taquizoítos tratados con el Δ DHEA.

Porcentaje de sobrevivencia de taquizoítos extracelulares de la cepa RH expuestos por 30 minutos y 2 horas a diferentes concentraciones del Δ DHEA. Para cada barra se contaron 300 parásitos por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos).

De acuerdo a los datos obtenidos, observamos un claro efecto del agonista de la DHEA sobre los taquizoítos extracelulares (Fig. 10). A 30 min. de exposición el mayor efecto parasiticida se observa 1 y 10 μ M, donde la sobrevivencia se reduce casi en un 50% (Fig. 10-30 min.); cuando se exponen por 2 horas al Δ DHEA encontramos efecto sobre la viabilidad desde 1 nM con una disminución del 50% con respecto al control, la caída en la viabilidad llega incluso a ser cercana a cero a la mayor concentración utilizada (10 μ M; Fig. 10- 2h). El tratamiento con Sulfadiazina-Pirimetamina (S-P) induce un decremento en la viabilidad con

un comportamiento lineal, a mayor concentración de S-P menor sobrevivencia de los taquizoítos, independientemente del tiempo de incubación (Fig. 11).

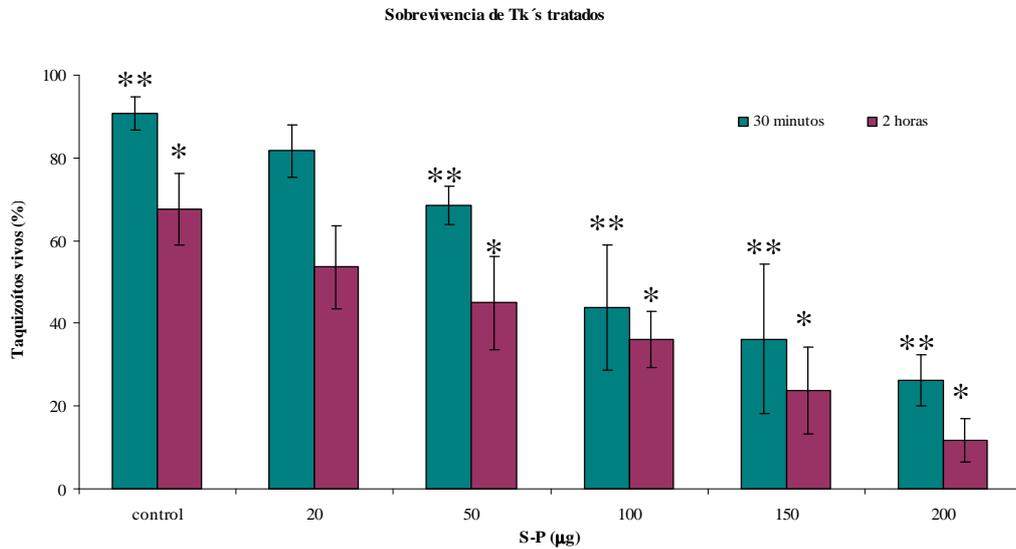


Fig. 11. Curva dosis-respuesta de Taquizoítos tratados con S-P.

Porcentaje de sobrevivencia de taquizoítos extracelulares de la cepa RH expuestos por 30 minutos y 2 horas a diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 300 parásitos por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos).

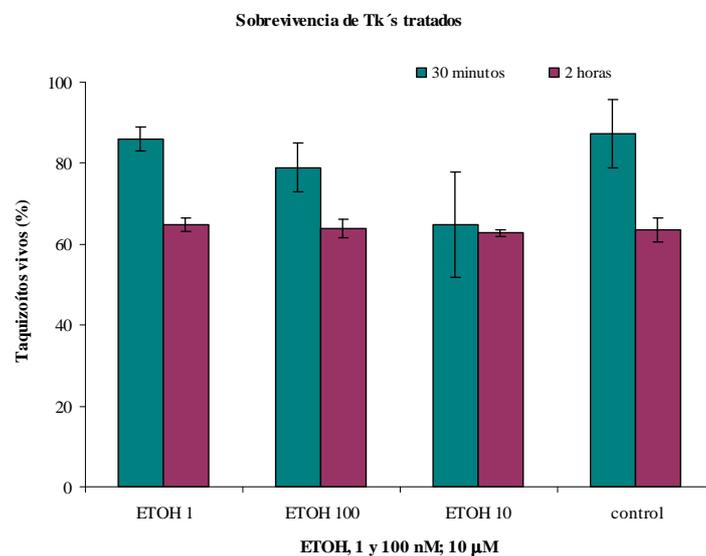


Fig. 12. Curva dosis-respuesta de Taquizoítos tratados con etanol.

Porcentaje de sobrevivencia de taquizoítos extracelulares de la cepa RH expuestos por 30 minutos y 2 horas a diferentes concentraciones de ETOH. Para cada barra se contaron 300 parásitos por triplicado en experimentos independientes.

Debido a que el agonista de la DHEA utiliza como solvente al etanol, utilizamos 3 concentraciones para descartar el efecto del mismo sobre la sobrevivencia de los taquizoítos,

como puede observarse en la (Fig. 12), el etanol no tiene efecto sobre la viabilidad de los taquizoítos, aún a la concentración más alta, independientemente del tiempo de exposición.

2. Capacidad de invasión de los taquizoítos tratados con el agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA), en macrófagos de peritoneo de ratón activados *ex vivo*.

Para determinar si el tratamiento con el Δ DHEA induce efectos sobre la capacidad de invasión y proliferación de los taquizoítos; los parásitos tratados fueron enfrentados a sus células hospederas. Debido a la capacidad de invasión que el parásito muestra hacia prácticamente cualquier célula nucleada, utilizamos cultivos primarios de macrófagos de peritoneo de ratón activados *ex vivo* (Fig. 13). Los taquizoítos purificados, se expusieron a las diferentes concentraciones del Δ DHEA, de la S-P y del EtOH (por 30 min. y 2 h) se adicionaron al cultivo celular; se permitió la invasión por dos horas, enseguida las monocapas celulares se lavaron para eliminar los parásitos extracelulares y se procesaron para microscopía óptica. La cuantificación se realizó contando el número de células que presentan en su citoplasma al menos una vacuola parasitófora de un total de 300 células por ensayo (Fig. 15)



Fig. 13. Cultivo de macrófagos peritoneales activados *ex vivo*.

Cultivo de macrófagos activados con 50 ng/mL de LPS, teñidos por hematoxilina-eosina. 100X.

Independientemente de la concentración del Δ DHEA utilizado, en el tiempo corto de exposición 30 min., los porcentajes de invasión fueron superiores al 80% en los cultivos de macrófagos que fueron activados *ex vivo*; mientras que el cultivo de macrófagos que no fue activado sólo presentó un 57% de invasión (Fig. 14). En el tiempo largo de exposición (2h), en el cultivo de macrófagos activados *in vitro* invadidos con parásitos no tratados muestran un

porcentaje de invasión similar al observado en 30 min. Mientras que en los macrófagos sin activar la invasión observada fue menor. Los taquizoítos expuestos al Δ DHEA mostraron una invasión similar independientemente de la concentración utilizada, aunque evidentemente menor que en los taquizoítos expuestos por 30 min. Similar a lo observado a 30 min., los taquizoítos expuestos a etanol no mostraron diferencias en los porcentajes de invasión de forma independiente a la concentración. A pesar de no mostrar diferencias en los porcentajes de invasión entre grupos, si se observaron diferencias con respecto a la invasión en respuesta

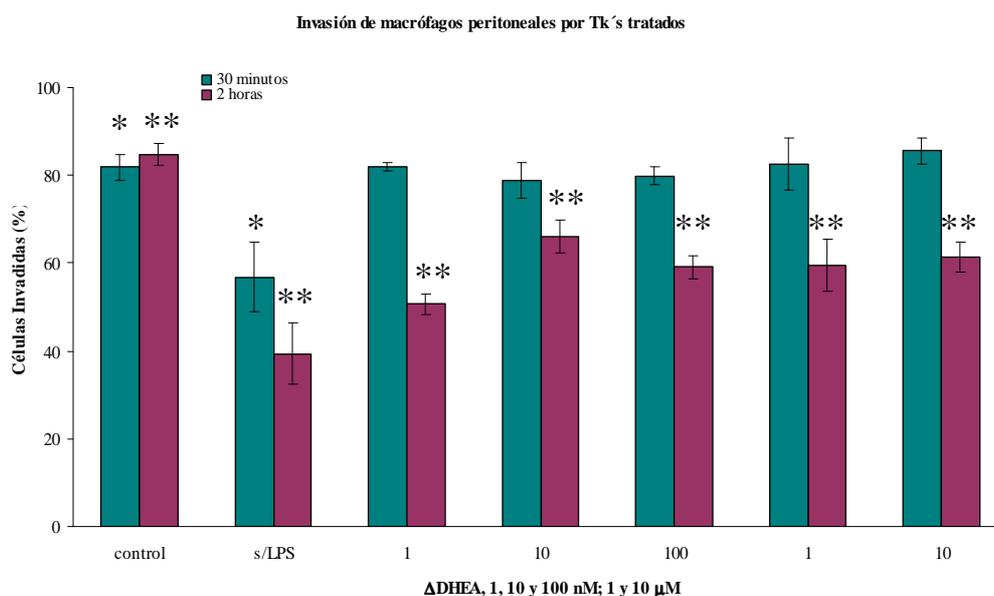


Fig. 14. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Δ DHEA.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron invadidos por uno o más tk's tratados por 30 minutos y 2 horas, a diferentes concentraciones de Δ DHEA. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos).

a la exposición, hay menor invasión en los taquizoítos expuestos por 2 h (Fig. 17).

Cuando los taquizoítos fueron tratados con los fármacos que se utilizan en el tratamiento convencional, se observaron porcentajes de invasión similares en todas las concentraciones utilizadas (20 - 200 μ g), independientemente del tiempo de exposición; de igual manera que los comparados con el control de taquizoítos sin tratamiento (Fig. 16). Los cultivos de macrófagos no activados, mostraron menores porcentajes de invasión (Fig. 16). El tratamiento de los taquizoítos con etanol no modifica los porcentajes de invasión en los cultivos de macrófagos (Fig. 15).

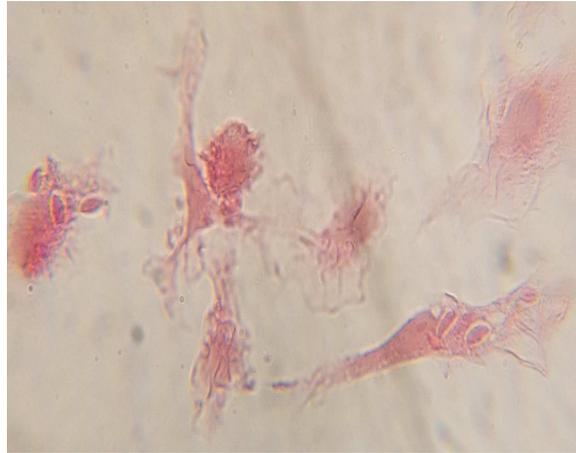


Fig. 15. Macrófagos peritoneales invadidos por taquizoítos de *T. gondii*.

Macrófagos peritoneales activados *ex vivo* invadidos por taquizoítos extracelulares de *T. gondii*. Cultivo de macrófagos donde se permitió el contacto taquizoítos-macrófago por dos horas, se puede observar solo dos macrófagos invadidos por uno o más parásitos. 100X.

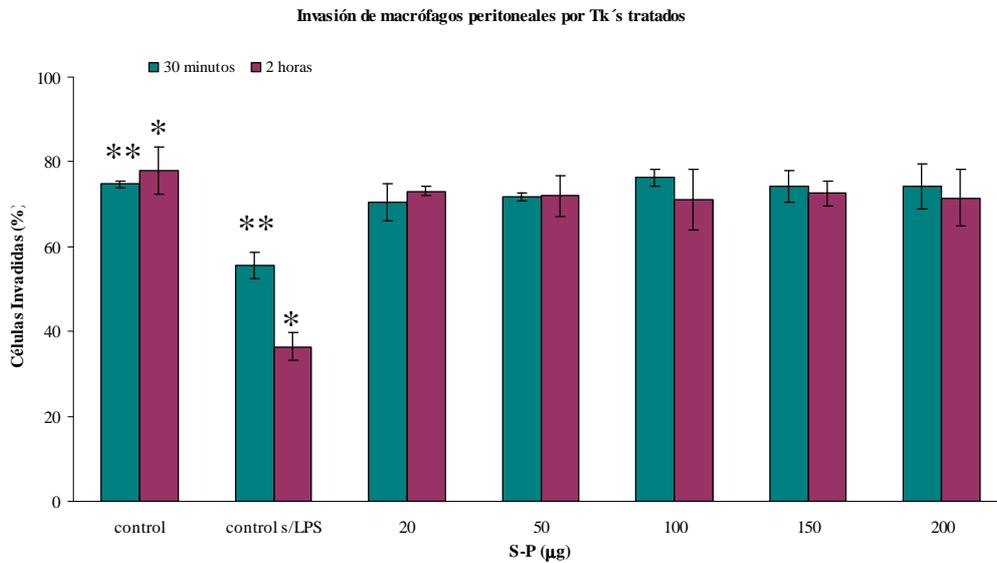


Fig. 16. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con S-P.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontrarán invadidos por uno o más tk's tratados por 30 minutos y 2 horas a diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos).

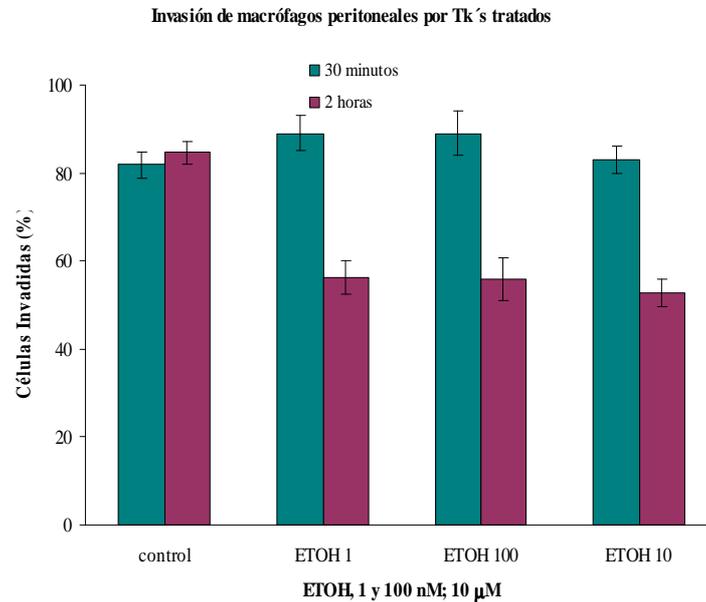


Fig. 17. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con ETOH.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron invadidos por uno o más tk's tratados por 30 minutos y 2 horas a diferentes concentraciones de ETOH. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes.

3. Capacidad de proliferación de los taquizoítos tratados con el agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA), en macrófagos de peritoneo de ratón activados *ex vivo*.

Para medir funcionalidad de los taquizoítos tratados, se realizaron ensayos de proliferación (Fig. 18) a tiempos de 24 h posterior al proceso de invasión. Para cuantificar los ensayos se

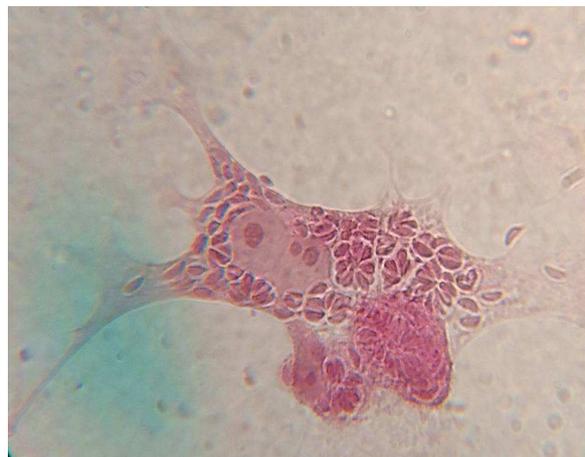


Fig. 18. Macrófagos peritoneales invadidos por taquizoítos de *T. gondii*.

Macrófagos peritoneales activados *ex vivo* invadidos por taquizoítos extracelulares de *T. gondii*. Cultivo de macrófagos en donde se permitió el contacto taquizoítos-macrófago por 24 horas para que los taquizoítos pudieran proliferar, se puede ver vacuolas parasitófora con una roseta de parásitos en su interior (más de 8 parásitos). 100X.

consideraron las células invadidas (que presentaron vacuolas al interior de la célula) y de éstas la que presentaron vacuolas con un número mayor a 8 parásitos en cada vacuola parasitófora.

En la gráfica 19 se presentan los datos obtenidos de la cuantificación de proliferación de los taquizoítos intracelulares y pudimos observar que a 30 min. de exposición con el agonista de DHEA se obtuvieron porcentajes menores de proliferación con respecto al control, mientras que a 2 h no hubo diferencias. En los cultivos de macrófagos no activados se observó a 30 min. un porcentaje similar a las condiciones de tratamiento, mientras que a 2 h el porcentaje fue mucho menor, lo anterior puede deberse al número de taquizoítos que logran entrar a su célula hospedera (Fig. 19). Los taquizoítos tratados con etanol no muestran diferencias con respecto a los parásitos tratados con el agonista (Fig. 20). En cuanto a los porcentajes de proliferación que muestran los taquizoítos tratados con S-P, observamos interesantes diferencias a partir de 100 μ g y hasta 200 μ g en ambos tiempos de tratamiento, con respecto al control sin tratar y al tratamiento con el agonista (ver 19. vs. Fig. 21).

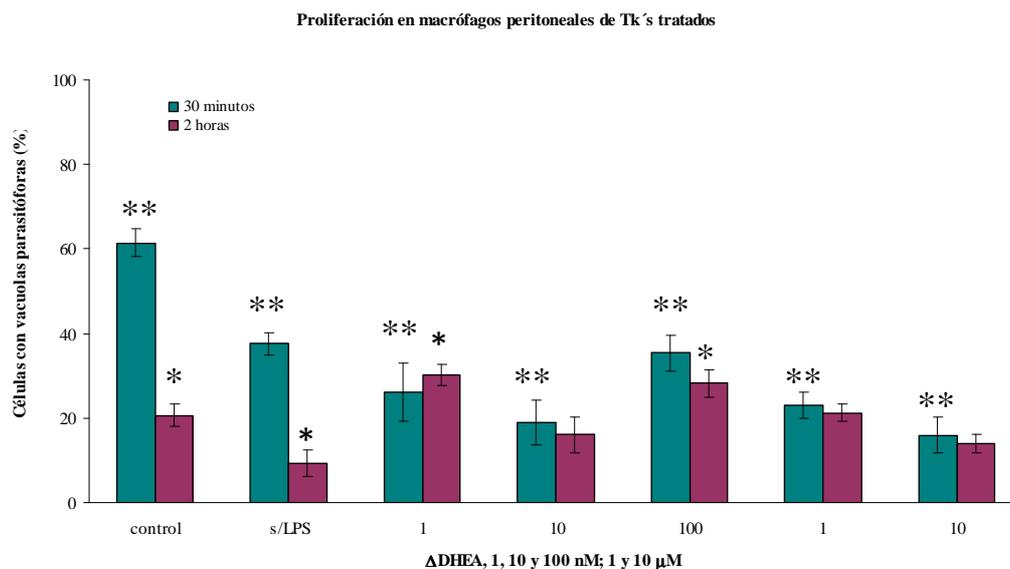


Fig. 19. Proliferación de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Δ DHEA.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontrarán con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por 30 minutos y 2 horas, con diferentes concentraciones del Δ DHEA. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos).

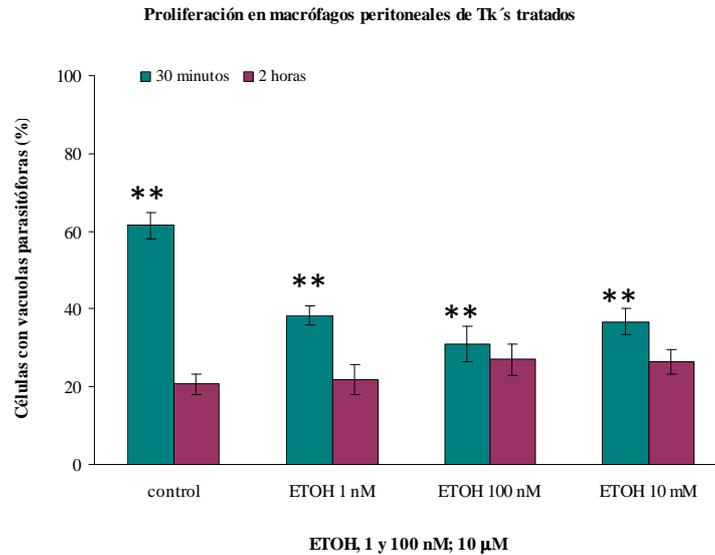


Fig. 20. Proliferación de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con ETOH.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron por 30 minutos y 2 horas, con diferentes concentraciones de ETOH. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos).

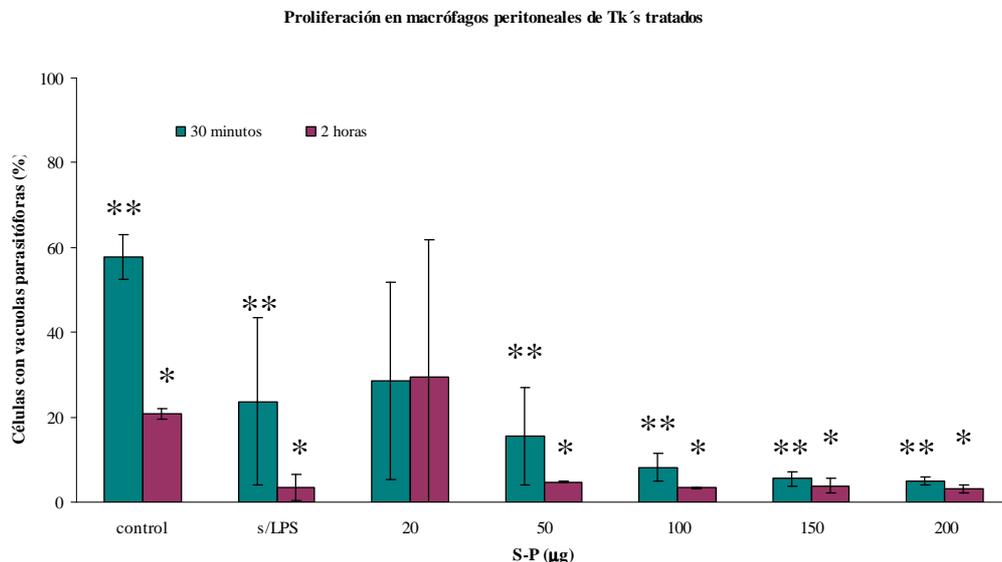


Fig. 21. Proliferación de macrófagos peritoneales por taquizoítos pretratados con S-P.

Porcentaje de macrófagos peritoneales en cultivo que se encontraron con una o más vacuolas parasitóforas en proceso de proliferación con al menos 8 parásitos por vacuola. Los taquizoítos con los que fueron infectados los cultivos de macrófagos peritoneales se incubaron con diferentes concentraciones de S-P. Para cada barra se contaron 300 células por triplicado en experimentos independientes (Diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos).

Resultados. Efecto parasiticida de un agonista de la Dehidroepiandrosterona (Δ DHEA) en el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*.

Tabla 4. Datos de mortalidad, invasión y proliferación

Resumen de los resultados expresados en porcentaje (%) de los diferentes ensayos realizados. Mortalidad de taquizoítos extracelulares expuestos a diferentes concentraciones del Δ DHEA y S-P. Invasión de macrófagos murinos activados *ex vivo*, a 2 y 24 horas por taquizoítos pretratados con los diferentes tratamientos. Proliferación de taquizoítos pretratados con Δ DHEA y S-P en macrófagos murinos activados *ex vivo*. Todos los ensayos se realizaron a 30 minutos y 2 horas de exposición a las diferentes concentraciones y tratamientos (* diferencias significativas comparando el control con respecto a cada uno de los tratamientos, † diferencias significativas comparando cada uno de los tratamientos con respecto al tiempo) (P = 0.05).

Concentración de Δ DHEA	Sobrevida 30 min.	Sobrevida 2 horas	Invasión (2h) 30 min.	Invasión (2h) 2 horas	Invasión (24h) 30 min.	Invasión (24h) 2 horas	Proliferación 30 min.	Proliferación 2 horas
ETOH 1 nM	85.90	64.82	89.04	56.25*	71.09	58.7	38.31*	21.97
ETOH 100 nM	78.97	63.82	88.94	55.92*	71.8	55.55	31.05*	27.05
ETOH 10 μ M	64.92	62.73	82.95	52.78*	70.95	51.96	36.74*	26.41
control s/LPS			56.75*	39.38*	62.58	45.69	37.56*	9.42
Control	87.39*	63.39*	81.78*	84.61*, †	85.97	64.7†	61.45*	20.7*
1 nM	85.88	39.67*	81.86†	50.68*	62.09†	53	26.31*	30.18
10 nM	84.54	31.52*	78.8	65.97*, †	70.72	49.66†	19.06*	16.1
100 nM	75.2	20*	79.78†	59.1*	65.03†	54.33	35.37*	28.22*
1 μ M	47.45*	14.32*	82.56†	59.44*, †	58.46†	45.33†	22.95*	21.32
10 μ M	38.27*	2.91*	85.52†	61.32*, †	55.4†	47.66†	15.97*	13.98
Concentración de S-P	Mortalidad 30 min.	Mortalidad 2 horas	Invasión (2h) 30 min.	Invasión (2h) 2 horas	Invasión (24h) 30 min.	Invasión (24h) 2 horas	Proliferación 30 min.	Proliferación 2 horas
control s/LPS			55.59*	36.47*	63.42	39.6	23.63*	3.33*
Control	9.39*	32.34*	74.74*, †	77.92*, †	86.16†	64.7†	57.76*	20.7*
20 μ g	18.33	46.43	70.44	73.11†	57.16	57.21†	28.53	29.6
50 μ g	31.51*	55.06*	71.79†	71.89†	50.07†	40.05†	15.39*	4.8*
100 μ g	56.1*	63.98*	76.38†	71.23†	45.41†	30.03†	8.18*	3.26*
150 μ g	63.76*	76.16*	74.32†	72.57†	43.8†	51.48†	5.44*	3.83*
200 μ g	73.83*	88.21*	74.23†	71.52†	46.6†	38.52†	4.98*	3.05

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A pesar de los avances en las diferentes áreas que convergen en la medicina, por más de cinco décadas se ha utilizado la misma combinación de fármacos para tratar la infección por *Toxoplasma*; sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad en este estudio, los fármacos utilizados generan efectos secundarios en el paciente tratado, otro inconveniente es que sólo afecta al taquizoíto del parásito cuando éste se encuentra en forma extracelular. Por lo anterior, se busca generar o re-utilizar compuestos con fines terapéuticos que afecten al parásito en forma libre y en forma intracelular, sin que generen algún efecto sobre el individuo infectado.

En la última década la DHEA se ha perfilado como probable compuesto parasiticida; sin embargo, la principal desventaja de ésta, son sus propiedades hormonales y la función que ejercen sobre los diferentes sistemas; por tal motivo como primer aproximación en el presente trabajo utilizamos exclusivamente sobre el taquizoíto extracelular un agonista que conserva la estructura de la DHEA pero que carece de las propiedades hormonales, el Δ DHEA. La importancia de conocer el efecto del Δ DHEA sobre el taquizoíto extracelular radica en las características del taquizoíto mismo; como se menciona es la forma móvil y es el responsable de realizar la diseminación tisular, en los individuos infectados, diferentes reportes indican que el parásito es capaz de migrar de forma activa y libre por el torrente sanguíneo y diseminar a través de los diferentes epitelios utilizando la vía paracelular, es decir, entre las células que lo conforman, por lo que se vuelve necesario saber si nuestro compuesto de prueba es capaz de afectar al parásito durante su tránsito en el organismo.

Nuestros resultados mostraron que dicho compuesto, Δ DHEA, tiene propiedades parasiticidas sobre el taquizoíto extracelular, encontrando que la concentración y el tiempo de exposición al mismo son determinantes para su acción. A tiempos cortos de exposición (30 min) el efecto es menor al 50% sobre la supervivencia del parásito aún a la mayor concentración utilizada, mientras que si la exposición se prolonga hasta por 2 horas logramos inducir una mortandad del 50% a concentraciones mínimas de 1 nM y de casi el 100% a 10 μ M. En el caso de la S-P también se logran porcentajes de mortandad cercanos al 100% con tiempos de exposición largos; sin embargo, un punto importante que resaltar es la diferencia que existe entre las concentraciones utilizadas, esto es, para lograr ver un efecto parasiticida por el tratamiento convencional (S-P) es necesario utilizar dosis altas. De hecho la dosis de 200 μ g utilizada corresponde a la dosis máxima que se le daría a un individuo adulto joven

mientras que la concentración del agonista utilizado correspondería a concentraciones menores a las concentraciones fisiológicas de la DHEA.

Hasta la fecha no existen reportes del efecto de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la sobrevivencia y/o mortandad de taquizoítos extracelulares de *Toxoplasma gondii*, pero existen reportes del efecto de la DHEA sobre otros parásitos protozoarios; por ejemplo en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* se reportó una mortalidad del 100% después de 72 horas de cultivo con DHEA a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o después de 24 horas con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a concentraciones más bajas (0.01, 0.1, 3, 6, 12 y 25) la viabilidad de los trofozoítos se vio afectada, sin que el autor especifique el porcentaje de mortandad (Carrero *et al*; 2006). También se ha reportado el efecto *in vitro* que tiene la DHEA sobre otro tipo de parásitos; como es el caso de *Taenia crassiceps* en donde se observó que en cisticercos en cultivo tratados con diferentes concentraciones de la hormona (1.7, 3.5 y 7 μM) afecta su motilidad y supervivencia, además de ser dependiente del tiempo (Vargas-Villavicencio, 2008). Existen evidencias del efecto que posee la DHEA como agente parasiticida en una amplia gama de parásitos, por lo que es pausable decir que la DHEA tendría efectos similares sobre *T. gondii*; sin embargo, a la fecha no hay reportes donde se evalué el efecto de la DHEA sobre el taquizoíto.

El agonista de la DHEA, el Epi-Br DHEA, se ha utilizado como parasiticida tanto en el protozoario *E. histolytica* y en *T. crassiceps*, obteniendo como resultado una reducción en la viabilidad, de la carga parasitaria y de los signos de la infección, con tiempos de exposición hasta por tres días (Carrero *et al*; 2010). Un aspecto importante a resaltar es el tiempo de exposición al que los parásitos *E. histolytica* y *T. crassiceps* fueron expuestos (1 – 10 días), tanto a la DHEA como al análogo Epi-Br DHEA. Si bien la morfología, distribución tisular y hospederos de *Toxoplasma* difieren de los parásitos mencionados anteriormente, resulta interesante remarcar el rango de las unidades de concentración del Δ DHEA al que fueron expuestos y la diferencia en los tiempos de exposición; lo anterior debido principalmente a que *Toxoplasma* es un parásito intracelular obligado y no es posible manejarlo en condiciones extracelulares por periodos prolongados. En contraste, con el protozoario *E. histolytica* (DHEA: 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se observó un 100% de mortalidad a las 72 y 24 horas de cultivo con respecto a las concentraciones utilizadas. Con *T. gondii* observamos el mismo efecto; 100% de mortalidad a 2.9 mg/L (2 h de exposición), lo cual evidencia el efecto parasiticida del Δ DHEA.

Hasta aquí los ensayos in vitro utilizando el Δ DHEA han mostrado que utilizando concentraciones mínimas y menores tiempos de exposición encontramos 100% de mortandad en taquizoítos extracelulares expuestos.

Toxoplasma tiene la capacidad de invadir y proliferar en virtualmente todas las células nucleadas del organismo, por tal motivo en este trabajo utilizamos cultivos de macrófagos extraídos de peritoneo de ratón, para determinar si la exposición en forma extracelular del taquizoíto al agonista afecta alguna de sus funciones, medidas exclusivamente a través de su capacidad de invasión y proliferación intracelular.

Al analizar el efecto de la S-P encontramos que independientemente del tiempo y la concentración utilizada no se modifican los porcentajes de macrófagos invadidos, cuando se utilizó el Δ DHEA observamos un efecto dependiente del tiempo de exposición aparentemente, ya que sólo los cultivos infectados con parásitos tratados por 2 h presentaron diferencias significativas independientemente de la concentración utilizada. Al comparar los porcentajes de invasión entre los taquizoítos tratados por 2h y los cultivos de macrófagos sin activación previa, pudimos observar que los porcentajes son similares (aunque si existe diferencias significativas entre ambos), lo cual podría indicar que el Δ DHEA afecta los mecanismos involucrados en la invasión activa, esto por una parte o dos, que debido a que la mayor parte de los taquizoítos esta muriendo o ya están muertos, son facilmente degradados por los macrófagos. Al evaluar la proliferación encontramos que la S-P tiene mayor efecto sobre los taquizoítos, sin embargo, también fue posible observar un efecto importante inducido por la exposición al agonista.

Es probable que al generar un tratamiento combinando los tres compuestos, Δ DHEA-S-P, se obtenga un efecto sinérgico. Lo anterior debido a que nuestros datos indican que ambos tratamientos actúan a diferentes niveles, uno sobre el mecanismo involucrado en la invasión y el otro sobre los mecanismos involucrados en la proliferación.

Para los ensayos de proliferación de taquizoítos pretratados con Δ DHEA (1, 10 y 100 nM; 1 y 10 μ M) y S-P (20, 50, 100, 150 y 200 μ g) a 30 minutos y 2 horas los cultivos infectados se dejaron incubando por 24 horas, para permitir que los taquizoítos que invadieron los macrófagos pudieran proliferar dentro de sus vacuolas parasitóforas. En dichos ensayos, también se realizó un conteo del número de macrófagos que estuvieran invadidos, esto para poder determinar los porcentajes de proliferación, ahora bien, después de 24 horas no todos los macrófagos que están invadidos presentan vacuolas parasitóforas con taquizoítos en

proceso de proliferación, por lo que es interesante hacer una comparación entre invasión a las 2 horas y 24 horas de incubación, después de infectados los cultivos con taquizoítos pretratados con las diferentes concentraciones, de ambos tratamientos a 30 minutos y 2 horas. A pesar de que los parásitos logran invadir o son ingeridos por los macrófagos, no todos se logran replicar, algunos de ellos permanecen en sus vacuolas parásitoforas; otros más son degradados por las células fagocíticas y otros logran proliferar exitosamente, por tal motivo resulta interesante comparar los valores de invasión a las 2 y 24 horas y a ambos tiempos de exposición (30 minutos y 2 horas).

Al comparar los porcentajes de invasión entre los taquizoítos tratados con los diferentes tratamientos (Δ DHEA y S-P) durante 30 min y 2 horas a los dos tiempos de incubación (2 y 24 h) se encontraron diferentes diferencias significativas, lo que podría sugerir que los taquizoítos tratados se ven afectados de tal forma que no todos los taquizoítos que invadieron a los macrófagos a las 2 horas de incubación, logran sobrevivir a las 24 horas de cultivo, lo que nos puede sugerir que los taquizoítos ingeridos por los macrófagos son degradados antes de las 24 horas no llegando a proliferar o sobrevivir dentro de su célula hospedera (ver anexo 4).

X. CONCLUSIONES

- El agonista de DHEA, Δ DHEA, tiene mejor efecto parasítica sobre el taquizoíto de *Toxoplasma gondii*, que el tratamiento convencional de S-P.
- Aparentemente la exposición del taquizoíto con el agonista de la DHEA afecta el proceso de invasión celular pero no el de proliferación celular.
- Es probable que existan dos mecanismos diferentes que se estén afectando por la exposición al Δ DHEA y a la S-P, debido a que el primero afecta la entrada del taquizoíto a su célula y el segundo afecta el proceso de proliferación.
- Las concentraciones de etanol utilizadas para disolver la hormona no tienen algún efecto sobre el taquizoíto de *Toxoplasma* en forma extracelular o en sus funciones biológicas (invasión y proliferación).

XI. PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto de la hormona Dehidroepiandrosterona (DHEA) *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* en una infección con *Toxoplasma gondii*.
- Aumentar la concentración del Δ DHEA para determinar la dosis letal del taquizoíto en infecciones agudas y crónicas.
- Estudiar el efecto del Δ DHEA sobre los procesos biológicos de *T. gondii* enfrentados a células no fagocíticas.
- Determinar el efecto del Δ DHEA en un modelo de infección *in vivo* como son los ratones de la cepa Balb-cAnN, tanto en machos como en hembras, bajo dos esquemas de tratamiento (curativo y preventivo).

XII. REFERENCIAS

- Black M. W. and J. C. Boothroyd. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiology and molecular biology reviews. 64:607–623.
- Caballero-Ortega H., F. J. Uribe-Salas, C. J. Conde-Glez, C. Cedillo-Pelaez, J. A. Vargas-Villavicencio, H. Luna-Pastén, I. Cañedo-Solares, L. B. Ortíz-Alegría y D. Correa. 2012. Seroprevalence and nacional distribution of human toxoplasmosis in Mexico: análisis of the 2000 and 2006 National Health Surveys. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 106:656-659.
- Carrero J. C., C. Cervantes, N. Moreno-Mendoza, E. Saavedra, J. Morales-Montor and J. P. Lactette. 2006. Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*. Microbes and Infection. 8:323-331.
- Carrero J. C., C. Cervantes-Rebolledo, J. A. Vargas-Villavicencio, R. Hernández-Bello, C. Dowding, J. Frincke, C. Reading and J. Morales-Montor. 2010. Parasiticidal effect of 16α -bromoepiandrosterone (EpiBr) in amoebiasis and cysticercosis. Microbes and Infection. 20:1-6.
- Costa da Silva R. and H. Langoni. 2009. *Toxoplasma gondii*: host – parasite interaction and behavior manipulation. Parasitology Research. 105:893 – 898.
- Dubey J. P. and C. P. Beattie 1988. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, FL. 1–220 pp.
- Dubey J. P., D. S. Lindsay and C. A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Devepment of Tissue Cysts. Clinical Microbiology Reviews. 11:267 – 299.
- Dubey J. P. 2008. The history of *Toxoplasma gondii* – The first 100 years. Journal of Eukaryotic Microbiology. 55:467–475.
- Fardella B. C. 2001. Hiperplasia suprarrenal congénita. Revista chilena de pediatría. 5(72):408-415.
- Ferguson D. J. P. 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 104: 133-148.
- Galván M. L. y R. F. Mondragón. 2001. Toxoplasmosis humana. Ediciones Cuéllar, Guadalajara, Jalisco, México.

- Hill D. and J. P. Dubey. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*. 8: 634–640.
- Hiroshi J., J. E. Heuser and L. D. Sibley. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science*. 108:2457-2464.
- López-Mato A., O. Boullosa, G. Illa, A. Vieitez. P. Willis y C. Marquez. 1999. Dehidroepiandrosterona. Aspectos Psiconeuroinmunoendocrinológicos. EuroHealthLatina. Online in: www.eurohealthlatina.com/es/pdf/Dehidroepiandrosterona.pdf
- Mendivil J. M. y V. M. Borges. 2009. La Dehidroepiandrosterona (DHEA), revisión de su eficacia en el manejo de la disminución de la libido y de otros síntomas del envejecimiento. *Actas Urológicas Españolas*. 33(4):390-401.
- Morales-Montor J., F. Mohamed, A. M. Ghaleb, S. Baig, C. Hallal-Calleros and R. T. Damian. 2001. *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *Journal Parasitology*. 87(5):1132-1139.
- Muñiz H. S. 2009. Modificación en la distribución de organelos y del citoesqueleto de la célula huésped inducido por el parásito *Toxoplasma gondii* durante la invasión y proliferación intracelular. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Departamento de Bioquímica.
- Muñiz H. S. y F. R. Mondragón 2009. *Toxoplasma gondii* un patógeno asesino re-emergente. *Revista de Educación Bioquímica*. 28: 52-58.
- Nichols B. A. and M. L. Chiappino. 1987. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Journal Protozoology*. 34:226-30.
- Nicoletti F., D. Conrad, A. Wang, R. Pieters, K. Mangano, A. V. Heeckeren, S. K. White, J. Frincke, C. L. Reading, D. L. Auci and D. Stickney. 2009. 16 α -Bromoepiandrosterone (HE2000) limits non-productive inflammation and stimulates immunity in lungs. *Clinical and Experimental Immunology*. 158:308-316.
- Nicolle C. and L. Manceaux. 1908. Sur une infection á corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'académie des Sciences*. 147:763-766.
- Nicolle C. and L. Manceaux. 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'académie des Sciences*. 148:369-372.

- Patrón A. S., M. Mondragón, S. González, J. R. Ambrosio, A. L. Guerrero and R. Mondragón. 2005. Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *International Journal for Parasitology* 35:883-894.
- Ravindran S., M. B. Lodoen, S. H. L. Verhelst, M. Bogyo and J. C. Boothroyd. 2009. 4-Bromophenacyl Bromide Specifically Inhibits Rhopty Secretion during *Toxoplasma* Invasion. *PLoS ONE*. 12:1-10.
- Rosso F., A. Agudelo, A. Isaza and J. G. Montoya. 2007. Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo. *Colombia Médica*, 38:316-337.
- Suárez-Hernández M., A. González-Fernández, B. Y. Gardón-Quirola, y R. Martínez-Sánchez. 2005. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. *Revista Biomédica*. 16:21-27.
- Tenter A. M., A. R. Heckeroth and L. M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30:1247-1258.
- Vargas-Villavicencio J. A., C. Larralde and J. Morales-Montor. 2008. Treatment with dehydroepiandrosterone *in vivo* and *in vitro* inhibits reproduction, growth and viability of *Taenia crassiceps* metacestodes. *International Journal for Parasitology*. 38:775-781.
- Vela-Amieva M., I. Cañedo-Solares, P. Gutiérrez-Castrellón, M. Pérez-Andrade, C. González-Contreras, J. Ortiz-Cortés, V. Ortega-Velázquez, M. de L. Galván-Ramírez, M. Ruíz-García, P. Saltigeral-Simentel, J. C. Ordaz-Favila, C. Sánchez and D. Correa. 2005. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 72:142-144.
- Velasco-Castrejón O, B. Salvatierra-Izaba, J. L. Valdespino, A. M. Sedano-Lara, S. Galindo-Virgen, C. Magos, A. Llausás, R. Tapia-Conyer, G. Gutiérrez, J. Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. *Secretaría de Salud*. 34:222 – 229.
- Zapata G. E. 2004. Efecto de la Dehidroepiandrosterona (DHEA), sobre la expresión de las proteínas que regulan en ciclo celular: p53, p21 y Rb en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC's). Tesis para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1. Índice de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2	Formas infectivas de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
3	Morfología del taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
4	Invasión Activa representada en un eritrocito	8
5	Representación esquemática del proceso de invasión pasiva	10
6	Seroprevalencia de la toxoplasmosis en México	11
7	Síntesis de la Dehidroepiandrosterona (DHEA)	18
8	Acondicionamiento de las placas para cultivo	24
9	Técnica de montaje de cultivos celulares	25
10	Curva dosis-respuesta de Taquizoítos pretratados con el Δ DHEA	27
11	Curva dosis-respuesta de Taquizoítos tratados con etanol	28
12	Curva dosis-respuesta de Taquizoítos tratados con S-P	28
13	Cultivo de macrófagos peritoneales activados <i>ex vivo</i>	29
14	Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Δ DHEA	30
15	Macrófagos peritoneales invadidos por taquizoítos de <i>T. gondii</i>	31
16	Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos pretratados con S-P	31
17	Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con ETOH	32
18	Macrófagos peritoneales invadidos por taquizoítos de <i>T. gondii</i>	32
19	Proliferación de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Δ DHEA	33
20	Proliferación de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con ETOH	34
21	Proliferación de macrófagos peritoneales por taquizoítos pretratados con S-P	34

ANEXO 2. Índice de Tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Fármacos comunmente utilizados contra la toxoplasmosis	13
2	Concentraciones normales de DHEA en humanos (López-Mato, <i>et al.</i> , 1999)	16
3	Concentraciones utilizadas en los ensayos	26
4	Datos de mortalidad, invasión y proliferación	34

ANEXO 3. Preparación de Reactivos y Soluciones

➤ PBS 1X

Aforar a 1 litro en agua milli-Q. pH 7.2-7.4

Cloruro de sodio (NaCl)	8 gr.
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 gr.
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	1.15 gr.
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.2 gr.

➤ Δ DHEA

El Δ DHEA tiene un peso molecular de 290.44 g y viene en presentación en polvo.

Se utilizó cinco concentraciones diferentes del Δ DHEA (1, 10 y 100 nM; 1 y 10 μ M). La solución de stock se preparó una concentración de 1 mM y se utilizó el etanol como solvente

➤ Tratamiento convencional Sulfadiazina-Pirimetamina

La S-P se adquirió de manera comercial en una presentación de tabletas a una concentración de 800 mg/tableta. Se preparó una solución stock en PBS a una concentración de 615.38 μ g/mL. Las concentraciones que se utilizaron fueron: 20, 50, 100, 150 y 200 μ g.

➤ Medio de cultivo DMEM complementado GIBCO (No de catalogo: 10569044)

Para preparar 50 mL de medio de cultivo DMEM al 8% de SFB y 1% de PES se requiere:

45.5 mL medio DMEM GIBCO (No de catalogo: 10569044)

4 mL Suero Fetal Bovino GIBCO (No de catalogo: 10091155)

0.5 mL Penicilina-Estreptomicina SIGMA (No de catalogo: P4333)

Se coloca todo en un tubo de 50 mL estéril y se guarda en refrigeración a 4°C hasta su uso.

➔ **Lipopolisacaridos (LPS) SIGMA (No de catalogo: L2630)**

Los Lipopolisacaridos se obtuvieron a una concentración de 2 mg/mL. Los cultivos de macrófagos se activan con LPS desde una concentración de 20 ng/mL, la solución stock (1 μ g/mL), así como el volumen y la concentración final requerida se llevan a cabo en medio suplementado.

➔ **Glucosa al 1% en PBS 1X**

Para preparar 50 mL:

0.5 g Glucosa (SIGMA, No de catalogo: G8769)

50 mL PBS 1X

Agitar en vortex rápidamente y filtrar con un filtro 0.2 mm.

Esta solución se prepara cuando se va a utilizar.

➔ **PBS 1X-Glicerol (1:1)**

Para preparar 20 mL:

10 mL PBS 1X

10 mL Glicerol SIGMA (No de catalogo: G5516)

Agitar en vortex y guardar a TA.

ANEXO 4. Gráficas de invasión de macrófagos invadidos con taquizoítos tratados por 30 min y 2 h con Δ DHEA y S-P a 2 y 24 horas de incubación

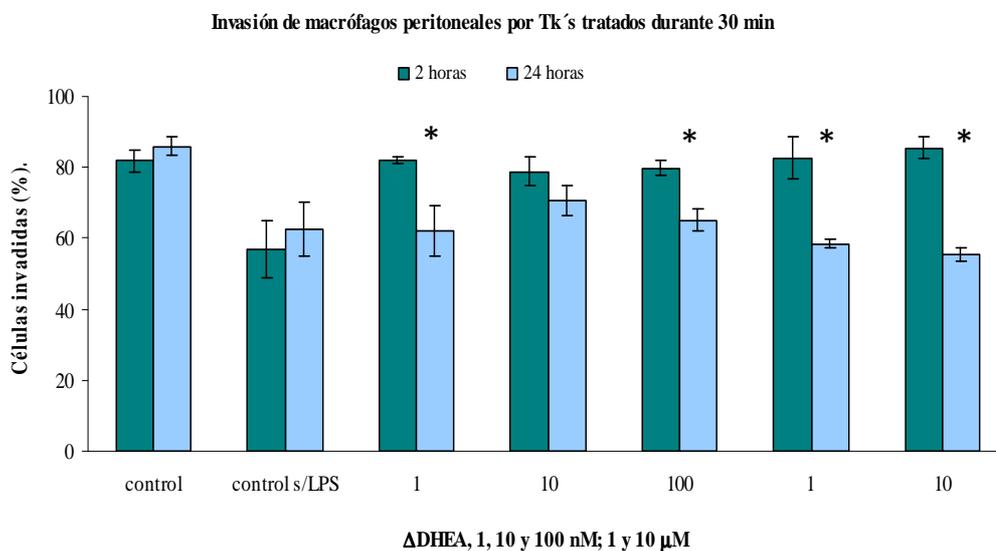


Fig. 19. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Δ DHEA. Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos incubados 2 y 24 horas, invadidos por taquizoítos tratados 30 minutos con Δ DHEA (diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de Δ DHEA).

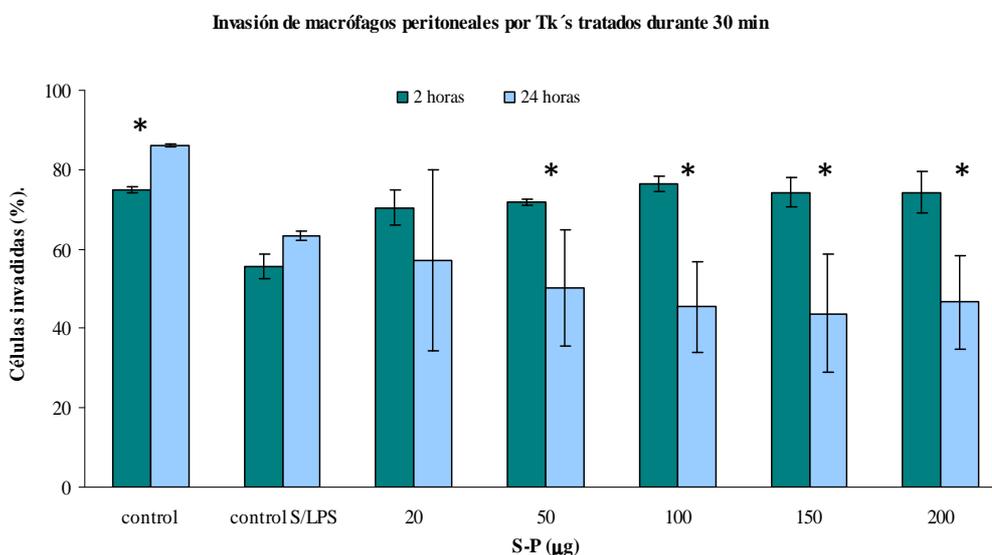


Fig. 20. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con S-P. Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos incubados 2 y 24 horas, invadidos por taquizoítos tratados 30 minutos con S-P (diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de S-P).

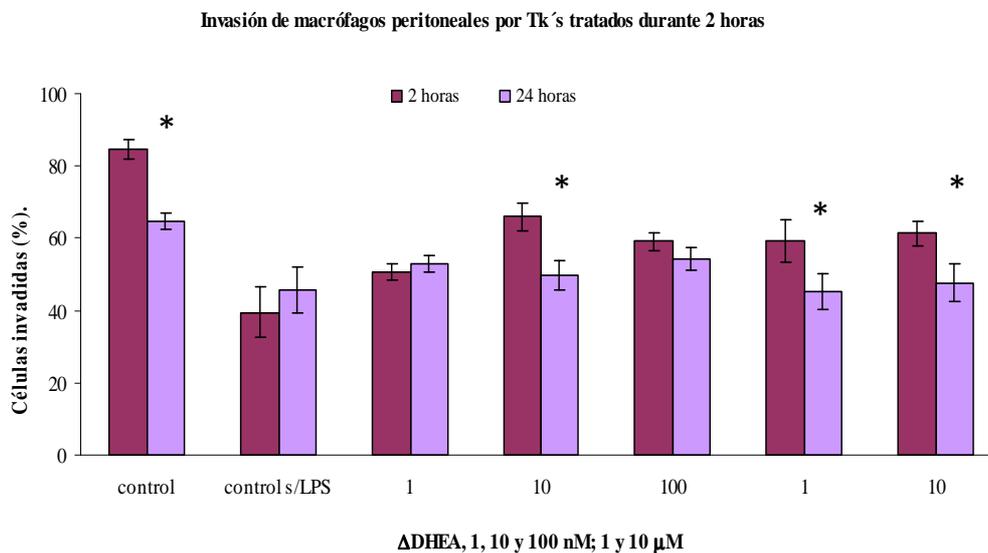


Fig. 21 Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con Δ DHEA. Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos incubados 2 y 24 horas, invadidos por taquizoítos tratados 2 horas con Δ DHEA (diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de Δ DHEA).

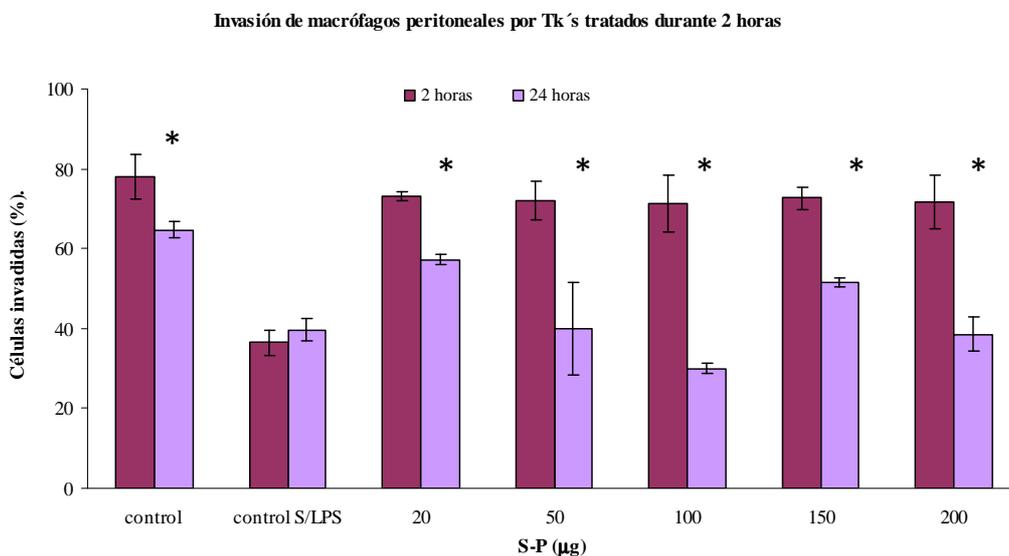


Fig. 22. Invasión de macrófagos peritoneales por taquizoítos tratados con S-P. Comparación en los porcentajes de invasión de macrófagos incubados 2 y 24 horas, invadidos por taquizoítos tratados 2 horas con S-P (diferencias significativas comparando los tiempos entre cada una de las concentraciones utilizadas de S-P).