



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO

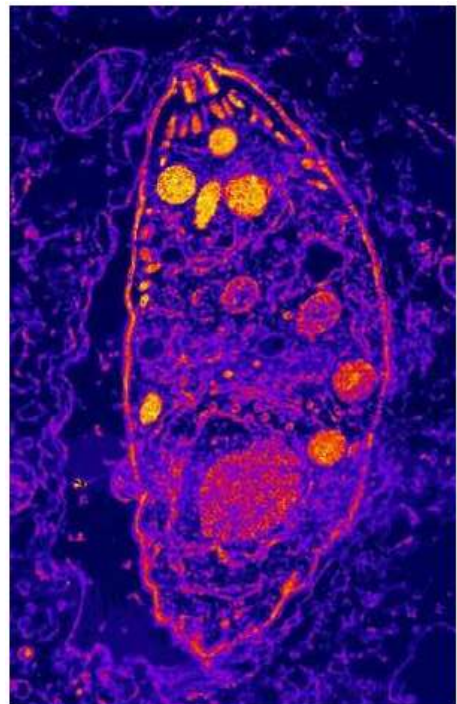
“Un parásito intracelular: *Toxoplasma gondii*”

Estela del Mar Berdión Camaño

05440819P

Tutor: Mercedes Martínez Grueiro

Convocatoria: Junio 2015



1. RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado de mamíferos y aves. Más de un tercio de la población mundial ha entrado en contacto con él, pero normalmente sólo se asocia a enfermedad en casos de transmisión vertical y en pacientes inmunocomprometidos. Durante la invasión, el parásito crea una vacuola parasitófora, un compartimento que permite la modulación de las funciones celulares, permitiendo su replicación y la infección del hospedador. Los orgánulos secretores de *Toxoplasma* (micronemas, roptrias y gránulos densos) son responsables de estos procesos, en los que intervienen antígenos de superficie (SAG) y proteínas liberadas por micronemas y roptrias (MIC, AMA y RON), que median el reconocimiento y la entrada, así como otras proteínas efectoras (ROP y GRA) que modifican, por ejemplo, la señalización de STAT o la inmunidad relacionada con GTPasas, determinando su virulencia. El fin de este trabajo es revisar, en la medida que su extensión lo permite, estos mecanismos de invasión.

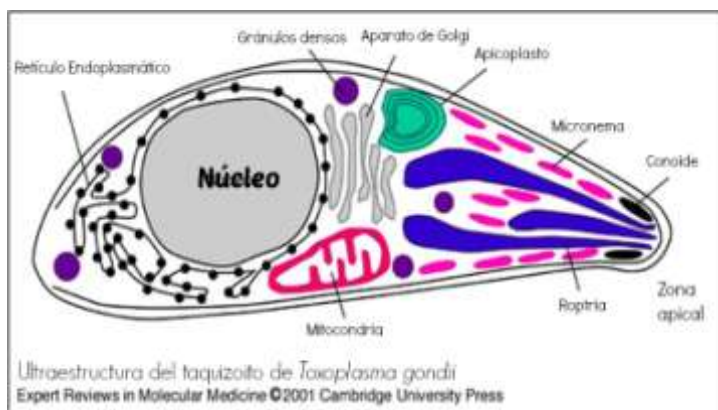
2. SUMMARY

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular mammalian and avian parasite. Over one third of the world population has come into contact with it but usually it is only associated to disease in vertical transmission and in immunocompromised patients. During the invasion, the parasite creates a parasitophorous vacuole, a compartment that enables modulation of cell functions, allowing replication and infection of the host. *Toxoplasma* secretory organelles (micronemes, rhoptries and dense granules) are responsible for these processes, involving surface antigens (SAG) and proteins released by micronemes and rhoptries (MIC, AMA and RON), which mediates recognition and entry. Other effector proteins (ROP and GRA) that modify, for example, STAT signaling or immunity related GTPases, determine their virulence. The purpose of this paper is to review these mechanisms of invasion.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Toxoplasma gondii es un organismo unicelular, eucariota, apicomplejo, que ha adoptado una existencia intracelular obligada. Infecta y se desarrolla en muchos tipos de células y en diversas especies animales (aves y mamíferos) incluido el hombre.

La importancia sanitaria de la



toxoplasmosis se da sobre todo en ciertos grupos de riesgo ya que la infección normalmente cursa de forma asintomática. Uno de los grupos de riesgo lo constituyen las personas inmunosuprimidas; en ellas, la primoinfección o la reactivación de una infección crónica, puede producir una encefalitis u otras afecciones. Otros casos importantes son las infecciones que se adquieren por transmisión vertical como consecuencia de la primoinfección en la madre; los niños pueden nacer con daños graves o desarrollar posteriormente coriorrenitis ¹. A esto cabe añadir que, desde hace algunos años, *T. gondii* se asocia a cambios en el comportamiento y a algunas alteraciones psiquiátricas como la esquizofrenia ^{2, 3, 4}; y también se ha señalado su posible potencial oncogénico ^{5, 6, 7, 8}.

3.1. Ciclo biológico

T. gondii es un parásito heteroxeno. Los félidos actúan como hospedadores definitivos (HD), puesto que en ellos tiene lugar la reproducción sexual, mientras que mamíferos y aves se comportan como hospedadores intermediarios (HI).

El HI se infecta por ingestión de los tejidos de otros HI, que posean quistes de bradizoitos, o por ingestión de ooquistes maduros (esporozoitos). Otras formas de infección humana son la transmisión vertical, trasplantes o transfusiones. Tras la ingestión de ooquistes maduros o tejidos infectados, por la acción de las enzimas digestivas, se liberan los zoitos que invaden la pared intestinal, accediendo a la lámina propia, donde se multiplican por endodiogenia (rápidamente) dando lugar a taquizoitos. Desde ahí se diseminan, por vía hemática y linfática accediendo a células inmunocompetentes que contribuirán a su dispersión. Se diseminan por todo el organismo invadiendo células de distintos órganos (hígado, bazo, etc.) donde se siguen multiplicando de la misma manera. Este proceso corresponde a la fase inicial de la infección o ciclo lítico.

Tras unos días, el parásito comenzará a multiplicarse, fundamentalmente en células del tejido nervioso y muscular, de forma lenta, también por endodiogenia, originando bradizoitos; se forman así los quistes tisulares, donde el parásito persiste protegido de la respuesta inmune del hospedador. Ocasionalmente algunos quistes se rompen y se producen nuevas invasiones, pero el hospedador inmunocompetente controla la infección. Se ha comprobado que en el ratón se forman nuevos quistes durante la fase crónica de la infección, y esta recurrente estimulación antigénica podría contribuir a la larga persistencia de los títulos de anticuerpos específicos, en los hospedadores ^{9, 10}. Si el sistema inmunitario decae, el parásito vuelve a comenzar la fase proliferativa, reactivándose la infección.

El paso del ciclo lítico a la formación de quistes tisulares viene determinada por características del parásito (virulencia) y por la respuesta inmune del hospedador. La respuesta

humoral es rápida y capaz de destruir los taquizoitos extracelulares. El control de la enfermedad parece depender de la producción de citoquinas apropiadas, incluyendo IL-12 e IFN γ , y de una adecuada respuesta celular. En el paciente inmunocompetente, la respuesta inmune es de tipo Th1 y depende de CD4 auxiliares. IFN γ e IL-2 activan macrófagos. IFN induce en los macrófagos la producción de TNF. La sinergia entre TNF e IFN γ en los macrófagos desencadena la explosión respiratoria con producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que provocan la muerte de los parásitos intracelulares. En el parásito, éstos y otros factores inducen la transformación de los taquizoitos en bradizoitos. La especie de HI también puede condicionar esta transformación o la persistencia de los quistes tisulares; por ejemplo, éstos raramente se encuentran en carne de vacuno o búfalo aunque los datos serológicos denotan porcentajes de infección del 92 y 20% respectivamente. Los quistes tisulares se encuentran con mayor frecuencia en tejidos de cerdo, oveja o cabra y menos en pollos, conejos, perros y caballos ¹¹.

Por otro lado, el gato es el HD y puede infectarse por la ingestión de ooquistes maduros o de quistes tisulares presentes en los tejidos de sus presas. Tras la ingesta de bradizoitos, algunos acceden a los enterocitos produciéndose el clásico ciclo coccidiano: varios ciclos de reproducción asexual, la reproducción sexual y la esporogonia; se forman ooquistes inmaduros que se expulsan con las heces durante unos días (hasta 2 semanas) y que completarán su desarrollo en el medio externo. A su vez, a nivel extraintestinal, en el HD ocurre lo mismo que en un HI cuando ingiere bradizoitos o esporozoitos. En el caso de ingestión de ooquistes (o taquizoitos), el desarrollo es primero extraintestinal, y se cree que algunos bradizoitos volverán al epitelio intestinal produciéndose el ciclo coccidiano ^{1, 12, 13, 14}.

3.2. Biología celular

Los apicomplejos son parásitos intracelulares obligados, capaces de moverse sobre un sustrato, de un modo muy peculiar, y que poseen estructuras especiales que les permiten acceder a las células del hospedador. Este mecanismo de invasión es un proceso activo, distinto de la fagocitosis y capaz de evitar la destrucción lisosomal ¹⁵.

El comportamiento básico de *T. gondii* y su interacción con células en cultivo se puede observar por microscopía óptica. Los taquizoitos tienen un movimiento de deslizamiento, en rotación helicoidal en sentido horario, sin deformación obvia del cuerpo del parásito, a pesar de que se ha observado la torsión de la membrana externa, a través de microscopía de barrido.

Esta inusual forma de motilidad -sustrato dependiente- es posible gracias al 'glideosoma', un complejo macromolecular que consiste en una serie de proteínas de adhesión que se liberan en la parte apical del parásito y se unen a receptores de la membrana celular; el zoito se impulsa y estas uniones son translocadas al polo posterior por la acción de un motor de actina-miosina, anclado en el complejo de

membrana interno (IMC) del parásito. Este complejo motor está formado por miosina A y actina que interaccionan con las proteínas de adhesión. Antes se creía que la interacción entre las adhesinas y los filamentos de actina ocurría vía aldolasa, enzima a la que actualmente no se le atribuye una función “mecánica” pero que será importante para proporcionar energía a través de su actividad glicolítica. Se han identificado otros componentes estructurales de este motor, las proteínas GAP (“gliding-associated protein”): GAP45, GAP50 y GAP40, que se cree que mantienen la cohesión e integridad de la película, especialmente vía GAP45, cuando el zoito se desplaza. Los componentes del glideosoma son esenciales para la supervivencia del parásito así como extremadamente conservadas en los apicomplejos, y se han propuesto como posibles dianas terapéuticas ^{1, 15, 16, 17}. La unión de este complejo al sustrato parece producirse mediante proteínas de la familia TRAP (“thrombospondin-related anonymous protein”) [Imagen 1].

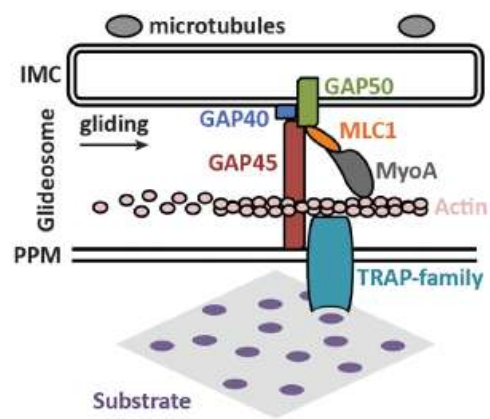


Imagen 1. Sehgal A, Bettiol S, Pypaert M, Wenk MR, Kaasch A, Blader IJ *et al.* Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic* 2005; 6:1125–41.

El “glideosoma” y las proteínas procedentes de los orgánulos apicales - micronemas, roptrias y gránulos densos - que se irán vaciando de modo secuencial, serán los responsables del proceso de invasión. Este proceso se desarrolla en cuatro etapas; el parásito entra en contacto con la célula (primer paso), la reconoce (segundo paso) y se dispone con el extremo apical dirigido hacia ella. A continuación, tercer paso, se formará el denominado “ensamblaje móvil”, un anillo de unión, entre el parásito (proteínas de micronemas y roptrias) y la membrana celular, que se irá deslizando sobre la superficie del zoito a medida que este se impulse hacia su interior formando así, por invaginación de la membrana, la vacuola parasitófora de naturaleza no fusigénica que lo albergará. El proceso de invasión culminará con una serie de modificaciones de la célula invadida, mediadas por proteínas de roptrias y gránulos densos, que la convertirán en un hábitat idóneo para el desarrollo del parásito y su multiplicación. Este compartimento carece de proteínas integrales de la membrana del hospedador; es remarcable la ausencia de proteínas SNARE (“soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor”) probablemente responsable de la resistencia de la vacuola a la fusión lisosomal y acidificación ¹⁵.

Tras varios procesos replicativos, el parásito sale de la célula en respuesta a la misma cascada de señalización usada para promover la invasión celular.

3.3. Epidemiología

T. gondii se encuentra en todos los continentes excepto en la Antártida y algunas islas en el Pacífico y a lo largo de la costa de Centro América. Los seres humanos, generalmente, se infectan

por consumo de carne con quistes de bradizoitos viables (las temperaturas superiores a 60°C o inferiores a 20°C pueden destruirlos) u ooquistes esporulados que contaminan el medio. La serología demuestra una amplia variación en la prevalencia de infección en los distintos lugares del mundo y está relacionado con los factores que predisponen a la infección como la altitud, el clima, las costumbres culinarias o el nivel socioeconómico. Los climas cálidos y secos tienen menor incidencia de toxoplasmosis que los templados y húmedos y las tasas decrecen con el aumento de altitud.

Aproximadamente el 25-30% de la población mundial está infectada por *Toxoplasma*. La prevalencia varía ampliamente entre los distintos países (10-80%) e incluso dentro del mismo país o entre comunidades de la misma región ¹⁸.

Tradicionalmente, se han enmarcado las poblaciones de *T. gondii* en tres grandes líneas clonales, por su mayor o menor virulencia en el modelo murino [Imagen 2].

- Tipo I (DL₁₀₀ ~1 parásito) es el más virulento y parece ser el más frecuente en la enfermedad congénita en humanos.
- Tipo II (DL₅₀ ~10³ parásitos) es la más común en el hombre.
- Tipo III (DL₅₀ ~ 10⁵ parásitos) es la más frecuente en animales.

La recombinación genética es posible debido a la etapa sexual del ciclo biológico, en el intestino del gato, y se puede demostrar en infecciones experimentales. Esto debe de ser relativamente infrecuente en la naturaleza, ya que requiere que el gato ingiera dos cepas del parásito, en el mismo intervalo de tiempo. Actualmente se reconocen 12 haplogrupos (incluyendo los tres tipos iniciales), y en algunas áreas, como Sudamérica, hay genotipos atípicos con polimorfismos únicos que no se pueden incluir en esta clasificación. En Europa y Norteamérica, el genotipo II es el predominante; en cambio, en Sudamérica, los genotipos atípicos son los más prevalentes, siendo el tipo II muy poco común. En África, los haplogrupos conocidos como *Africa 1-3* coexisten con los genotipos II y III. Los datos acerca de Asia son escasos, pero algunos estudios revelan una diversidad genética más limitada que en Sudamérica ¹⁹.

En relación con las cepas atípicas de *T. gondii*, estudios recientes ¹⁸ han revelado que:

- Se puede producir una reinfección con un genotipo atípico en una mujer previamente infectada por *Toxoplasma* y resultar en una transmisión congénita.
- La tasa de infección congénita se ve incrementada cuando las mujeres se infectan con una cepa atípica en comparación con las infectadas con el genotipo II.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre los procesos de invasión celular y las modificaciones inducidas por *T. gondii* en las células que lo albergan, particularmente durante la fase inicial de la infección.

5. METODOLOGÍA

Se ha realizado un proceso de documentación y revisión bibliográfica a través PubMed (motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Contacto e invasión

Para llevar a cabo la invasión celular, *T. gondii*, como los demás apicomplejos, debe entrar en contacto y reconocer las células del hospedador; en este caso, existen aparentemente múltiples posibles interacciones receptor-ligando entre el parásito y las células. Inicialmente, se produce una interacción de baja afinidad, mediada por las proteínas de superficie del zoito, de las cuales la mayoría son proteínas denominadas SAGs (“surface antigens”), antígenos de superficie anclados por glucosilfosfatidilinositol (GPI), SRSs (“SAG1-related sequences”) y SUSAs (“SAG-unrelated surface antigens”). Las proteínas SAGs parecen interactuar con glicosaminoglicanos sulfurados como heparina^{20, 21, 22}. El antígeno de superficie SAG1 ha demostrado ser un ligando crucial para promover la invasión; experimentos de neutralización han revelado que anticuerpos monoclonales antiSAG1 pueden bloquear parcialmente la invasión de los taquizoitos en cultivos celulares^{23, 24, 25}. Además, SAG1 soluble puede unirse directamente a la superficie celular. Los cambios conformacionales de SAG1 pueden influir en la adherencia de *Toxoplasma* a las células²⁴. La invasión de *T. gondii* depende de múltiples factores, entre ellos, otras SAG como SAG2 y SAG3, que se encuentran en la vecindad de SAG1²⁶.

Estudios de genética inversa apoyan el papel de SAGs en la adherencia del parásito a la superficie celular. La abundancia y distribución de SAGs en la superficie del parásito permite interacciones laterales de baja afinidad con la superficie celular. Se cree que este hecho permite al parásito la interacción inicial con la célula para la selección del lugar óptimo de invasión. Esta interacción inicial parece ser reversible, permitiendo la separación del parásito si no considera a esa célula en particular ideal para la invasión²⁷.

Por otro lado, SAG1 es el antígeno de superficie más importante; aunque sólo representa un 3-5% de las proteínas del parásito, la mayoría de anticuerpos son reactivos frente a SAG1

durante la infección ²⁸. SAG1 ha demostrado estimular la inmunidad humoral y celular, protegiendo frente a la toxoplasmosis ^{29, 30, 31}. Esto le hace tener excelentes características de antigenicidad e inmunogenicidad valiosas para diagnóstico e inmunización. Fragmentos de los genes que codifican estas proteínas (de *sag1*, *sag2* y *sag4*) se han utilizado para el diagnóstico molecular (PCR), especialmente en individuos inmunosuprimidos ³².

Tras el contacto y reconocimiento, una señal desconocida dispara el aumento de calcio en el citosol, que estimula la descarga de los micronemas y la extrusión del conoide; este proceso depende de proteínas-quinasas calcio dependientes (CDPK) ³³. Las proteínas de los micronemas MICs (“micronemal proteins”) contienen dominios de adhesión, de distintos tipos (tipo trombospondina, factor de crecimiento epidérmico, tipo lectinas, etc.); son proteínas solubles y transmembrana que se liberan y forman complejos sobre la superficie del zoito que se unen a receptores de las células, jugando un papel fundamental en la adhesión y el movimiento ³⁴. Según diversos estudios, MIC1, MIC2 y MIC3 son las más importantes ^{19, 35, 36, 37}. Algunas MICs (MIC2) se conectan al sistema actina-miosina vía aldolasa ³⁸. La mayor parte de estas adhesinas son eliminadas por proteasas romboides a medida que la invasión avanza (el zoito se va “desenganchando” y entrando).

En algún momento, un segundo disparo desconocido estimula la exocitosis de las roptrias. Se liberan primero las proteínas del cuello RON (“*rhoptry neck proteins*”). Las denominadas RON2, RON4, RON5 y RON8 se unen a AMA1 (“apical membrane antigen”) ^{39, 40}, una proteína que se localiza en los micronemas de los parásitos que se están desarrollando intracelularmente y en la superficie apical de los parásitos extracelulares, justo antes de la invasión; AMA 1 es fosforilada por la kinasa PKA (“cAMP-sensitive kinasa”) siendo éste un suceso crítico para la invasión ^{41, 42}.

AMA1 y las proteínas RON citadas forman el ensamblaje móvil, un complejo molecular que enlaza las membranas del zoito y la célula a invadir, y que irá desplazándose sobre la superficie del parásito a medida que éste se impulse hacia el interior. AMA1 es necesaria para organizar el complejo RON durante la invasión; los parásitos deficientes en este antígeno no pueden formar el anillo de ensamblaje ⁴³. El motor de actina-miosina, asociado a la película, generará la fuerza para la invasión ⁴⁴; si se bloquea, el proceso se interrumpe ⁴⁵. La proteína RON2 se asocia a AMA1 produciendo una reorganización estructural que permite la formación de una estructura íntima y extensa. Este complejo es lo suficientemente fuerte como para resistir la fuerza de propulsión a través del ensamblaje móvil y ha demostrado ser crucial para la invasión ^{19, 46}. Dos proteínas de las roptrias, Toxofilina y RON8, interactúan con el citoesqueleto de actina de la célula, facilitando la entrada ^{39, 47, 48}. A medida que penetra, el parásito va formando la vacuola parasitófora (VP) ⁴⁹. Estudios morfológicos y electrofisiológicos han demostrado que los

lípidos de la VP provienen de la membrana plasmática del hospedador y no de orgánulos como lisosomas, retículo endoplasmático o aparato de Golgi ⁵⁰. Además, *Toxoplasma* define activamente la composición proteica de la membrana de la VP (MVP); durante la entrada elimina las proteínas transmembrana que han intervenido en la formación del ensamblaje móvil ^{51, 52} y la MVP adquiere carácter no fusiogénico ⁵³.

6.2. Modificación de la célula invadida

A continuación, se “inyectan” las proteínas del bulbo de las roptrias, ROPs (“rhoptry bulb proteins”), en pequeñas vesículas que se fusionan con la naciente VP por la cara citosólica. Las proteínas de los gránulos densos, GRAs, se liberarán tras completar la invasión y algunas se insertarán en la MVP. ROPs y GRAs modificarán la VP y la célula que la alberga, convirtiéndola en un hábitat idóneo para el parásito.

Para sobrevivir y multiplicarse, *T. gondii* debe adquirir nutrientes del hospedador. Es auxótrofo para triptófano, arginina, poliaminas, purinas, colesterol, hierro y otros nutrientes esenciales ⁴⁹. El estado no fusiogénico de la MVP le impide utilizar el sistema endo y exocítico de la célula hospedadora y por ello creará poros en la MVP y una red túbulo-vesicular intravacuolar que permite la difusión bidireccional de pequeñas moléculas ⁵⁴. De este modo, metabolitos solubles, de 1300-1900 Da, como glucosa, aminoácidos, nucleótidos e iones, acceden a la VP por transporte pasivo. De la misma forma, probablemente, los productos de desecho del parásito pasan al citosol de la célula hospedadora. También habrá procesos de transporte activo.

El parásito modificará la disposición de algunos orgánulos celulares en su propio beneficio; la mitocondria y el retículo endoplasmático (RE) se situarán en las proximidades de la VP. ROP2, una proteína anclada a la MVP por un dominio transmembrana, participa en el reclutamiento de la mitocondria ⁵⁵. Una bajada selectiva de los niveles de mRNA de ROP2 resulta en un menor reclutamiento mitocondrial, una menor adquisición de esteroides y deficiencias en la biogénesis de las roptrias, la invasión, la división del parásito y la virulencia en ratón ⁵⁶. Por otro lado, se cree que GRA3 y GRA5 están implicadas en el reclutamiento del RE ⁵⁷.

La infección por *T. gondii* provoca la reorganización de los filamentos intermedios (IFs) y microtúbulos (MTs) de la célula hospedadora, alrededor de la VP ^{58, 59}, estabilizando la arquitectura celular, y permitiendo el movimiento y la relocalización de los orgánulos intracelulares. Los MTs inducen profundas invaginaciones de la MVP hacia el lumen de la vacuola. Los conductos formados transportan vesículas endocíticas conformando una estructura de doble membrana denominada H.O.S.T. (“Host Organelle Sequestering Tubulo-structures”) ^{49, 60}, a través de la cual algunos nutrientes pueden alcanzar el interior de la VP ^{49, 61}. Varias proteínas

GRA se asocian a esta estructura, y una de ellas, GRA7, parece jugar un papel fundamental en el transporte de lípidos ⁵⁹. El colesterol es crucial para la invasión y la replicación intracelular de *T. gondii*; el contenido en colesterol de la membrana se ha relacionado con los procesos de invasión (descarga de micronemas y roptrias) ⁶² y se ha comprobado que el crecimiento del parásito aumenta por adición de colesterol libre o LDL-colesterol al medio extracelular. Se cree que el parásito adquiere LDL a través de este sistema de alimentación (H.O.S.T.) ^{61, 63}.

La red intravacuolar de membranas (IVN), generada por las GRAs ⁶⁴, también se relaciona con la característica disposición en roseta de los parásitos tras su división ^{65, 66}.

En cuanto a las proteínas ROP, citadas anteriormente, algunos miembros de la subfamilia ROP2 (ROPK) serán muy importantes para condicionar la capacidad del parásito para vivir y replicarse, particularmente en células como macrófagos o monocitos, determinando la diferencia de virulencia entre las distintas cepas ⁶⁷ [Imagen 2]. ROP5, ROP16 y ROP18 tienen un alto nivel de polimorfismo y sus genes se expresan en mayor medida o se regulan de manera específica según la cepa ⁶⁸.

Para comprender la acción de ROP5, ROP16 y ROP18 es importante entender la influencia de los cambios mediados por *T. gondii* tras la infección y la respuesta del hospedador frente a patógenos intracelulares. Se trata de una situación muy compleja y los análisis de “micro-array” han mostrado que intervienen un gran número de genes que son regulados de forma diferente dependiendo de la cepa del parásito y del tipo de células del hospedador ^{69, 70}.

En el modelo murino, inicialmente, la invasión por *T. gondii* causa un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-12 (los niveles de IL-12 varían dependiendo de la cepa infectante) ⁷¹. La IL-12 es producida principalmente por células de la inmunidad innata, como macrófagos y células dendríticas, y está implicada en la inmunidad Th1. La IL-12 estimula la activación de STAT4 que resulta en la diferenciación de las células Th0 a Th1, que junto con las células NK producen grandes cantidades de IFN γ ⁷². El IFN γ activa a STAT1, culminando la expresión de una serie de proteínas efectoras como las GTPasas p47 ^{73, 74} que van a ayudar en la destrucción del parásito. Así, el eje STAT4-STAT1 es esencial para la defensa frente a patógenos intracelulares como *T. gondii*.

En una respuesta inmune normal, habría también una reacción antiinflamatoria para compensar la reacción proinflamatoria y prevenir el daño en el hospedador. STAT3 es activada por las células de la respuesta innata a través de la acción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, que, en ratones, es secretada principalmente por células T CD4⁺ ^{75, 76}. Mientras tanto las citoquinas IL-4 e IL-3 de la respuesta Th2 inducen la activación de STAT6 e inhiben la respuesta Th1. Juntos, los STATs son regulados por varias citoquinas y pueden funcionar de formas

opuestas para producir una respuesta inmune antiparasitaria equilibrada. Las vías de activación de STATs se regulan mediante un mecanismo de *feed-back* negativo compuesto por reguladores negativos o supresores como los SOCS (“Suppressors of Cytokine Signaling”) ^{77, 78}.

6.3. Factores de virulencia

6.3.1. ROP16 (GRA15)

ROP16 es una tirosin-kinasa que se localiza en el núcleo de la célula hospedadora, rápidamente, tras la invasión ^{69, 79}; su abundancia se relaciona con el número de parásitos y disminuye de manera tiempo-dependiente tras la invasión ⁴⁹. ROP16 imita la acción de las JAKs del hospedador y activa STATs (STAT3 y STAT6) ^{77, 79, 80, 81}. La activación inicial de STAT3 parece ser independiente de esta ROP ⁷⁷, sin embargo, el mantenimiento de su actividad sí parece requerirla. En cambio, STAT6 necesita de ROP16 para su activación ^{77, 79, 80}. Los parásitos de las cepas de tipo I y III, pero no los de la tipo II, provocan una activación sostenida de STATs que conduce a la supresión de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 e IL-12, que son la clave para la lucha contra *T. gondii* ^{82, 83}. Los parásitos tipo I carentes de ROP16 no pueden activar ninguna de estas STATs (41).

ROP16, aumenta los niveles de Arginasa-I (Arg-I), vía STAT6 ^{70, 77}. La arginasa hidroliza la L-arginina para producir urea y ornitina y priva a los macrófagos del sustrato preciso para la producción de ON, vía la oxido nítrico sintetasa, mecanismo esencial para la destrucción de patógenos intracelulares. Esta acción, por lo tanto, favorecerá al parásito. Por otra parte, *Toxoplasma* es auxotrófico respecto a la arginina y su ausencia limitará su capacidad de multiplicación; esto último también podría beneficiarle, al permitirle persistir más tiempo en células – macrófagos y células dendríticas- que juegan un papel muy importante en su diseminación inicial (“Caballos de Troya”). También es posible que la producción de ornitina, fuente de poliaminas, favorezca la proliferación del parásito.

La inducción de Arg-I es el resultado de la activación alternativa (M2) de los macrófagos vía STAT3/6; este proceso conduce a la producción de moléculas antiinflamatorias que inhiben la respuesta Th1 y disminuyen la capacidad de defensa del hospedador ⁸⁴. Análisis de “micro-array”, comparando parásitos de tipo II (deficiente en ROP16) y tipo III, confirman la polarización M2 en los últimos.

Por otro lado, la infección de macrófagos por cepas tipo II induce citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 o IL-12 ⁷⁰, sugiriendo una activación “clásica” o polarización M1 de los macrófagos. En estos casos también se estimula el ambiente proinflamatorio por señalización NF κ B mediada por GRA15 ⁸⁵; NF κ B promueve la transcripción de marcadores de

polarización M1 y aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias. En este caso, la polarización M2 es activamente bloqueada ⁷⁰.

ROP16 juega un papel importante no sólo en la polarización de macrófagos *in vitro* sino también en la inflamación intestinal *in vivo* ⁷⁰. Los ratones susceptibles infectados por vía oral con cepas tipo II sufren una grave ileitis que puede ser letal ⁸⁶. Contrariamente a esto, casi todos los ratones infectados con cepas tipo II que expresan ROP16 de tipo I o III sobreviven y muestran una inflamación intestinal reducida, con menor infiltración de granulocitos en la lámina propia ⁷⁰. La ileitis provocada por la toxoplasmosis puede ser tratada eliminando citoquinas efectoras como IFN γ , IL-23 e IL-22, sugiriendo el papel de estas citoquinas en la patología ^{86, 87}. Así, ROP16 limita la inflamación intestinal por *T. gondii*.

6.3.2. ROP18 (ROP5 y ROP17)

ROP18 es liberada durante la invasión y se localizará en la MVP ^{88, 89, 90, 91}. Tiene un grado considerable de homología a ROP2 ^{88, 89, 90, 92} pero es altamente polimórfica ^{90, 92} y el principal determinante de las diferencias de virulencia observadas entre las distintas cepas ⁶⁷.

En el modelo murino, ROP18 modifica las respuestas innata y adaptativa. ROP18 es una protein-quinasa capaz de fosforilar GTPasas pequeñas p47, relacionadas con la inmunidad, IRGs “immunity-related GTPases”, inducidas por IFN γ , que configuran el mecanismo de defensa intracelular, en macrófagos y células dendríticas, más importante frente a *Toxoplasma* (este sistema no se encuentra en las células humanas). Las IRGs se acumulan en la MVP y la desestabilizan, produciendo su ruptura y finalmente la muerte del parásito ^{93, 94, 95, 96, 97, 98}. ROP18 fosforila las IRGs e impide la ruptura de MVP ⁹⁹. ROP18 tiene una región rica en arginina y se ha podido comprobar que la disrupción de esta región previene el anclaje de ROP18 a la MVP; esto resulta en la acumulación de IRGs en la MVP y su consecuente destrucción ¹⁰⁰, indicando que ROP18 juega un papel esencial en la disfunción de IRGs y que éste depende de su correcta localización.

Las cepas de *T. gondii*, I, II y III, difieren en su susceptibilidad a la muerte mediada por IRGs ⁹⁴; ROP 18 bloquea este mecanismo en las poblaciones más virulentas (tipo I) mientras que sí es efectivo en las cepas menos virulentas (tipo III). En las de tipo II, ROP18 se expresa, pero las GTPasas de los macrófagos activados por IFN γ no son fosforiladas (sí se ha comprobado que la ROP18 del tipo II confiere virulencia a las cepas de tipo III). De esto cabe deducir que esta proteína actuará en concierto con otras moléculas efectoras ¹⁰¹.

Las proteínas ROP5 son pseudocinasas, por secuencia, estructura y función, que actúan como cofactores de ROP18 y son imprescindibles para inhibir el sistema IRG ¹⁰². Recientemente

se ha comprobado que ROP5 forma complejos con las kinasas ROP18 y ROP17 que fosforilan residuos treonina adyacentes y esenciales de las IRGs ^{103,104}.

Algunos estudios demuestran que ROP18 también inhibe el factor de transcripción ATF6 β , localizado en el RE, condicionando la respuesta inmune adaptativa. La degradación de este factor se traduce en una menor producción de IFN γ por células T CD8 y se ha relacionado con una posible presentación antigénica deficiente por parte de las células dendríticas y los macrófagos ^{105,106}.

7. CONCLUSIONES

Los orgánulos secretores de *Toxoplasma gondii* pueden verse como la versión eucariota de los distintos sistemas de secreción hallados en bacterias, que las ayudan en el proceso de invasión y modulan las funciones celulares del hospedador. En este trabajo se puede observar de forma global el conjunto de procesos moleculares utilizados por el parásito para este fin.

El reconocimiento, el contacto y la adhesión, con la célula, parecen estar mediados por proteínas SAG y MIC, de los micronemas. Las proteínas AMA1 y RON forman el ensamblaje móvil que permite la invasión del parásito, mediante su característico movimiento de deslizamiento (“gliding”), y la formación de la vacuola parasitófora que lo albergará. En este compartimento modulará las vías de señalización celulares y se multiplicará. ROP16 activa la vía STAT3/STAT6 produciendo la supresión de citoquinas proinflamatorias. En cambio, la activación del factor NF κ B mediada por GRA15 promueve un ambiente proinflamatorio. ROP18 junto con su cofactor ROP5 evita la acumulación de IRGs en la membrana de la vacuola parasitófora previniendo la destrucción de la misma. Así, el parásito consigue un equilibrio adecuado entre una respuesta inmune adecuada y la evasión de la misma para alcanzar la máxima diseminación en el organismo y transmisión entre hospedadores.

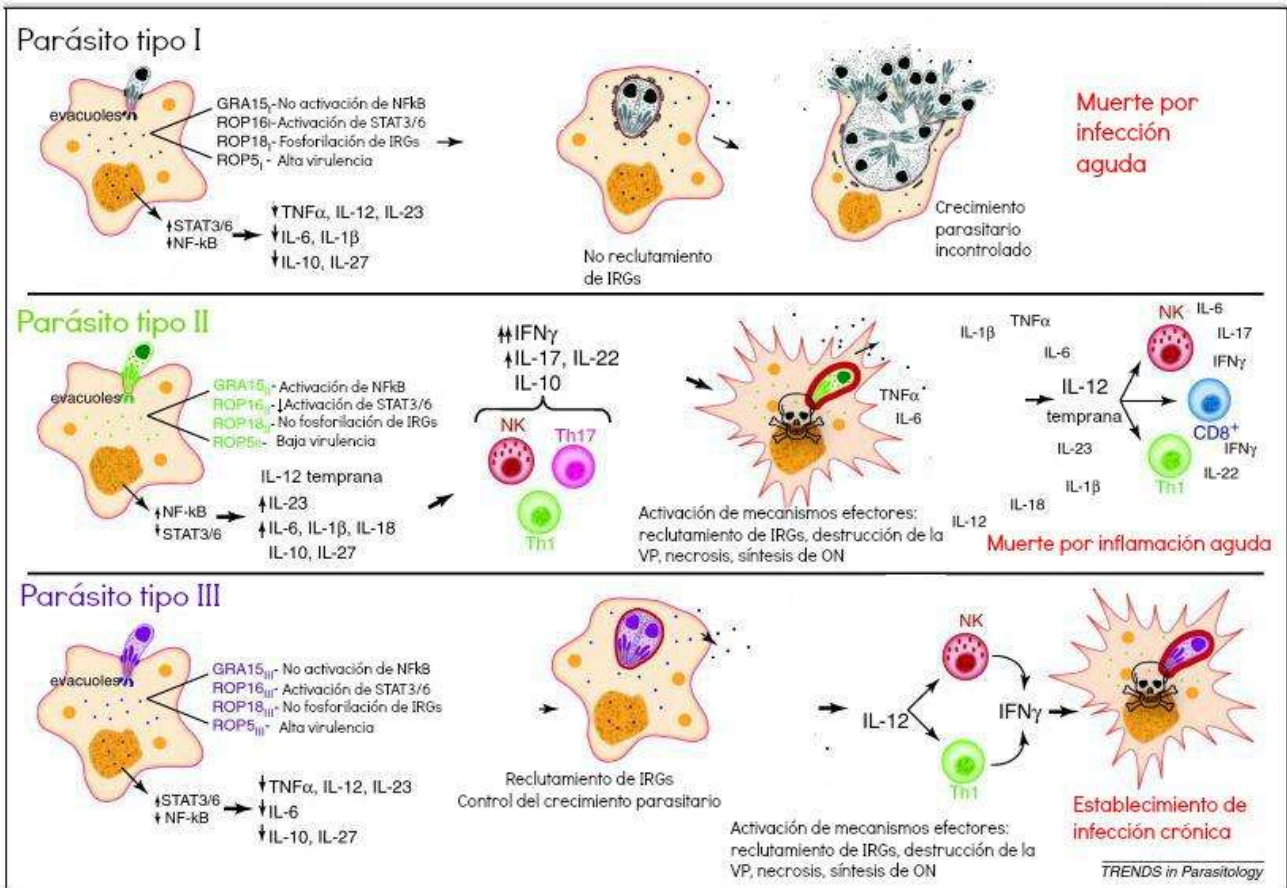


Imagen 2. Modificado de: Melo MB, Jensen KDC, Saeij JP. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* 2011, Vol 27, 11:487-495.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Schwartzman JD. **Toxoplasmosis**. En: Gillespie SH, Pearson RD, editores. Principles & Practice of Clinical Parasitology. Ed. Inglaterra: Wiley 2001. p. 113-138.
2. Yolken RH & Torrey EF. **Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence**. *Mol Psychiatry* 2008, 13:470-479.
3. Yolken RH, Dickerson FB & Torrey EF. **Toxoplasma and schizophrenia**. *Parasite Immunol* 2009, 31(11):706-15
4. Miman O, Mutlu E, Ozcan O, Atambay M, Karlidag R, Unal S. **Is there any role of Toxoplasma gondii in the etiology of obsessive-compulsive disorder?** *Psychiatry Research* 2010, 177: 263-265.
5. Ryan P, Hurley SF, Johnson AM, Salzberg M, Lee MW, North JB, McNeil JJ, McMichael AJ. **Tumours of the brain and presence of antibodies to Toxoplasma gondii**. *Int J Epidemiol* 1993, 22: 412-419.
6. Wrensch M, Bondy ML, Wiencke J, Yost M. **Environmental risk factors for primary malignant brain tumors: a review**. *J Neurooncol* 1993, 17: 47-64.
7. Thomas F, Lafferty KD, Brodeur J, Elguero E, Gauthier-Clerc M, Misse D. **Incidence of adult brain cancers is higher in countries where the protozoan parasite Toxoplasma gondii is common**. *Biol Lett* 2012, 8: 101-103.
8. Vittecoq M, Elguero E, Kevin D, Lafferty, Roche B, Brodeur J, Gauthier-Clerc M, Missé D, Thomas F. **Brain cancer mortality rates increase with Toxoplasma gondii seroprevalence in France**. *Infect Genet Evolut* 2012, 12: 496-49.
9. Montoya JG & Liesenfeld. **Toxoplasmosis**. *The Lancet*, Vol 363 June 2004
10. Weiss LM & Kim K. **Toxoplasma Gondii. The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods**. Academic Press 2013, 2nd Edition.
11. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. **Toxoplasma gondii: from animals to humans**. *Int J Parasitol* 2000, 30(12-13):1217-58.
12. Dubey JP. **History of the discovery of the life cycle of Toxoplasma gondii**. *Int J Parasitol* 2009, 39:877-882.
13. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. **Toxoplasma gondii: from animals to humans**. *Int J Parasitol* 2000, 30(12-13):1217-1258.
14. Martínez-Fernández AR, Fuentes Corripio I, Rodríguez Ferrer M y Domingo Fernández CJ. **Toxoplasmosis**. *Medicine* 1998, 7(81):3760-3766.
15. Keeley A & Soldati D. **The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa**. *Trends Cell Biol* 2004, Vol 14, n° 10.
16. Herm-Gotz A, Weiss S, Stratmann R, Fujita-Becker S, Ruff C, Meyhöfer E *et al.* **Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor**. *EMBO J* 2002, 21:2149-2158.
17. Bargieri D, Lagal V, Andenmatten N, Tardieux I, Meissner M, Ménard R. **Host cell invasion by Apicomplexan parasites: the junction conundrum**. *PLoS Pathog* 2014, e1004273.
18. Robert-Gangneux F. **It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis**. *J Infect* 2014, 68:S125-S133.
19. Sepúlveda-Arias JC, Gómez-Marín JE, Bobic B, Naranjo-Galvis CA, Djurkovic-Djakovic O. **Toxoplasmosis as a travel risk**. *Travel Med Infect Dis* 2014, 12:592-601.

20. Ortega-Barria E, Boothroyd JC: **A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involves in host cell infection.** *J Biol Chem* 1999, 274:1267-76.
21. Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK, Sibley LD: **Toxoplasma gondii uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment.** *Infect Immun* 2000, 68: 4005-11.
22. He XL, Grigg ME, Boothroyd JC, Garcia KC: **Structure of the immunodominant surface antigen from the Toxoplasma gondii SRS superfamily.** *Nat Struct Biol* 2002, 9:606-11.
23. Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH: **Antibodies to Toxoplasmas gondii major surface protein (SAG1-P30) inhibit infection of host cells and are produces in murine intestine after peroral infection.** *J Immunol* 1993, 150:3951-3964.
24. Mineo JR, Kasper LH: **Attachment of Toxoplasma gondii to host cell involves major surface protein, SAG-1(P30).** *Exp Parasitol* 1994, 79:11-20.
25. Grimwood J, Smith JE: **Toxoplasma gondii: The role of parasite and secreted proteins in host cell invasion.** *Int J Parasitol* 1996, 26:69-173.
26. Wang Y, Yin H: **Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of Toxoplasma gondii.** *ParasitVectors* 2014, 7:180
27. Carruthers V and Boothroyd JC. **Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion.** *Curr Opin Microbiol* 2007, 10:83–89.
28. Velge-Roussel F, Chardès T, Mévélec P, Brillard M, Hoebeke J, Bout D: **Epitopic analysis of the Toxoplasma gondii major surface antigen SAG1.** *Mol Biochem Parasit* 1994, 66:31-38.
29. Debard N, Buzoni-Gatel D, Bout D: **Intranasal immunization with SAG1 protein of Toxoplasma gondii in association with cholera toxin dramatically reduces depelopment of cerebral cyst after oral infection.** *Infect Inmun* 1996, 64:2158-2166.
30. Bulow R, Boothroyd JC: **Protection of mice from fatal Toxoplasma gondii infection by immunization with P30 antigen and liposomes.** *J Immunol* 1991, 147:3496-3500.
31. Khan IA, Ely KH, Kasper LH: **A purified parasite antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal Toxoplasma gondii infection in mice.** *J Immunol* 1991, 147:3501-3506.
32. Contini C, Cultrera R, Seraceni SD, Segala R, Romani E, Fainardi P, Cinque A, Lazzarin A & Delia S. **The role of stage specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated Toxoplasma gondii encephalitis in AIDS patients.** *J Med Microbiol* 2002, 51: 879–890.
33. Kieschnick H, Wakefield T, Narducci CA, Beckers C: **Toxoplasma gondii attachment to host cells is regulates by a Calmodulin-like domain protein kinase.** *J Biol Chem* 2001, 276:12369-77
34. Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. **Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii.** *Int J Parasitol* 2001, 31:1293–1302
35. Liles WC, Huang JE, van Burik JA, Bowden RA & Dale DC. **Granulocyte colony-stimulating factor administered in vivo augments neutrophil-mediated activity against opportunistic fungal pathogens.** *J Infect Dis* 1997, 175:1012-1015.
36. Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC & Curiel TJ. **Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis.** *J Immunol* 1998, 160-1824-1830.

37. Goebel S, Gross U & Luder CG. **Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression.** *J Cell Sci* 2001, 114:3495-3505.
38. Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini F, Jemmely N, Friedrich N, Ward GE and Soldati-Favre D. ***Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design.** *Mol Microbiol* 2010, Vol 77, 4: 912–929.
39. Straub K, Cheng S, Sohn C, Bradley P: **Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidian-restricted elements.** *Cell Microbiol* 2009, 11:590-603.
40. Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC: **Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles.** *PLoS Pathog* 2005, 1:e17.
41. Leykauf K, Treeck M, Gilson PR, Nebl T, Braulke T, Cowman AF *et al.* **Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite.** *PLoS Pathog* 2010, 6:e1000941.
42. Sharma P and Chitnis CE. **Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens.** *Curr Opin Microbiol* 2013, 16:432–437.
43. Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. **Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles.** *PLoS Pathog* 2005, 1:137-149.
44. Sheetz MP, Sable JE, Dobreinet HG. **Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006, 35:417-434.
45. Dobrowolski JM, Sibley LD. ***Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite.** *Cell* 1996, 84:933-9.
46. Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B, Morlon-Guyot J *et al.* **The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites.** *PLoS Pathog* 2011 10;7(2):e1001276.
47. Poupel O, Boleti H, Axisa S, Couture-Tosi E, Tardieux I. **Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments.** *Mol Biol Cell* 2000, 11:355-68.
48. Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Collier S, Coombs GH *et al.* **Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*.** *J Biol Chem* 2005, 280:34245-58.
49. Laliberté J, Carruthers VB. **Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*.** *Cell Mol Life Sci* 2008, 65:1900-1915.
50. Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward GE: ***Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:8413-8.
51. Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. **Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring.** *J Exp Med* 1999, 190:1783-92.
52. Charron AJ, Sibley LD. **Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*.** *Traffic* 2004, 5:855-67.
53. Mordue D, Hakansson S, Niesman IR, Sibley LD. ***Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that resists fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways.** *Exp Parasitol* 1999, 92:87-99.

54. Schwab JC, Beckers CJM, Joiner KA. **The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:509-513.
55. Sinai AP, Joiner KA. **The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane.** *J Cell Biol* 2001, 154:95-108.
56. Nakaar V, Ngo HM, Aaronson EP, Coppens I, Stedman TT, Joiner KA. **Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*.** *J Cell Sci* 2003, 116:2311-2320.
57. Ahn HJ, Kim S, Kim HE, Nam HW. **Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*.** *Korean J Parasitol* 2006, 44:303-312.
58. Halonen SK, Weidner E. **Overcoating of *Toxoplasma gondii* with host cell vimentin type intermediate filaments.** *J Eukaryot Microbiol* 1994, 41, 65-71.
59. Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC *et al.* ***Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space.** *Cell* 2006, 125:261-274.
60. Coppens I. **Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis.** *Cell Microbiol* 2006, 8:1-9.
61. Sehgal A, Bettiol S, Pypaert M, Wenk MR, Kaasch A, Blader IJ *et al.* **Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*.** *Traffic* 2005; 6:1125-41.
62. Coppens I, Joiner KA. **Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cells entry by modulating organelle discharge.** *Mol Biol Cell* 2003, 14:3804-3820.
63. Coppens I, Sinai AP, Joiner KA. ***Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition.** *J Cell Biol* 2000, 149:167-180.
64. Adjogble KDZ, Mercier C, Dibremetz JF, Hucke C, MacKenzie CR, Cesbron-Delauw MF *et al.* **GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes.** *Int J Parasitol* 2004, 34(11):1255-1264.
65. Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. **Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins.** *Mol Biol Cell* 2002, 13:2397-2409.
66. Magno RC, Lemgruber L, Vommaro RC, De Souza W, Attias M. **Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole.** *Microsc Res Tech* 2005, 67:45-52.
67. Kemp LE, Yamamoto M, Soldati-Favre D. **Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites.** *FEMS Microbiol Rev* 2012, 1-25.
68. Peixoto I, Chen F, Harb OS, Davis PH, Beiting DP, Brownback CS *et al.* **Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses.** *Cell Host Microbe* 2010, 208-218.
69. Saeij JP, Collier S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. ***Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue.** *Nature* 2007, 445:324-327.
70. Jensen KD, Wang Y, Wojno ED, Shastri AJ, Hu K, Cornel L *et al.* ***Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation.** *Cell Host Microbe* 2011, 9:472-483.
71. Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD. **Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype.** *J Immunol* 2004, 172:3686-3694.

72. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H *et al.* **Signaling and transcription in T helper development.** *Annu Rev Immunol* 2000, 18:451-494.
73. Leung S, Li X & Stark GR. **STATs find that hanging together can be stimulating.** *Science* 1996, 273:750-751.
74. Takaoka A & Yanai H. **Interferon signaling network in innate defence.** *Cell Microbiol* 2006, 8:907-922.
75. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M *et al.* **Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection.** *J Exp Med* 2007, 204:273-283.
76. Jankovic D, Kugler DG & Sher A. **IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for shelf regulation.** *Mucosal Immunol* 2010, 3:239-246.
77. Butcher BA, Fox BA, Rommereim LM, Kim SG, Maurer KJ, Yarovinsky F *et al.* **Toxoplasma gondii rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control.** *PLoS Pathog* 2011, 7:e1002236.
78. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H & Yoshimura A. **Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31:980-985.
79. Ong YC, Reese ML & Boothroyd. **Toxoplasma rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6.** *J Biol Chem* 2010, 285:28731-28740.
80. Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, Kayama H *et al.* **A single polymorphic amino acid on Toxoplasma gondii kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of STAT3.** *J Exp Med* 2009, 206:2747-2760.
81. Ong YC, Boyle JP, Boothroyd JC. **Strain-dependent host transcriptional responses to toxoplasma infection are largely conserved in mammalian and avian hosts.** *PLoS ONE* 2011, 6:e26369.
82. Hunter CA & Remington JS. **The role of IL-12 in toxoplasmosis.** *Res Immunol* 1995, 146:546-552.
83. Scharton-Kersten T, Denkers EY, Gazzinelli R & Sher A. **Role of IL12 in induction of cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii.** *Res Immunol* 1995, 146:539-545.
84. Martinez FO, Helming L & Gordon S. **Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.** *Annu Rev Immunol* 2009, 27:451-483.
85. Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KD & Saeij JP. **Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel Toxoplasma gondii dense granule protein.** *J Exp Med* 2011, 208:195-212.
86. Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS & Suzuki Y. **Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with Toxoplasma gondii.** *J Exp Med* 1996, 184:597-607.
87. Muñoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R *et al.* **Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17.** *J Exp Med* 2009, 206:3047-3059.
88. El Hajj H, Lebrun M, Fourmaux MN, Vial H, Dubremetz JF. **Inverted topology of the Toxoplasma gondii ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane.** *Cell Microbiol* 2007, 9:54-64.
89. El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. **ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of Toxoplasma gondii.** *PLoS Pathog* 2007, 3:e14.

90. Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K *et al.* **A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*.** *Science* 2006, 314:1776-1780.
91. Hakansson S, Charron AJ & Sibley LD. ***Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole.** *EMBO J* 2001, 20:3132-3144.
92. Saeij JP, Boyle JP, Coller S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET *et al.* **Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis.** *Science* 2006, 314:1780-1783.
93. Hunn JP, Koenen-Waisman S, Papic N, Schroeder N, Pawlowski N, Lange R *et al.* **Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*.** *EMBO J* 2008, 27:2495-2509.
94. Khaminets A, Hunn JP, Koenen-Waisman S, Zhao YO, Preukschat D, Coers J *et al.* **Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole.** *Cell Microbiol* 2010, 12:939-961.
95. Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Shell G, Reichmann G *et al.* **Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases.** *PLoS Pathog* 2005, 1:e24.
96. Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ *et al.* **Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages.** *J Exp Med* 2006, 203:2063-2071.
97. Zhao YO, Khaminets A, Hunn JP & Howard JC. **Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death.** *PLoS Pathog* 2009, 5:e1000288.
98. Zhao YO, Rohde C, Lilue JT, Koenen-Waisman S, Khaminets A, Hunn JP *et al.* ***Toxoplasma gondii* and the immunity-related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104:234-240.
99. Steinfeldt T, Koenen-Waisman S, Tong L, Pawlowski N, Lamkemeyer T, Sibley LD *et al.* **Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*.** *PLoS Biol* 2010, 8:e1000576.
100. Fentress SJ, Steinfeldt T, Howard JC & Sibley LD. **The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*.** *Cell Microbiol* 2012, 14:1921-1933.
101. Melo MB, Jensen KD & Saeij JP. ***Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response.** *Trends Parasitol* 2011, 27(11): 487-495.
102. Nieldman W, Gold DA, Rosowski EE, Sprockholt JK, Lim D, Farid Arenas A *et al.* **The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human. Interferon- γ response.** *PLoS Pathog* 2012, 8:e1002784
103. Zhao Y, Yap GS. ***Toxoplasma*'s arms race with the host interferon response: a ménage à trois of ROPs.** *Cell Host Microbe* 2014, 15(5):517-8.
104. Etheridge RD, Alaganan A, Tang K, Lou HJ, Turk BE, Sibley LD. **The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice.** *Cell Host Microbe* 2014, 15(5):537-50.
105. Yamamoto M, Ma JS, Mueller C, Kamiyama N, Saiga H, Kubo E *et al.* **AFT6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18.** *J Exp Med* 2011, 208:1533-1546.
106. Yamamoto M & Takeda K. **Inhibition of ATF6 β -dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18.** *Virulence* 2012, 3: 77-80.