



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia

Transmisión vertical de *Toxoplasma gondii*
en un modelo de ratonas BALB/c durante el
tercer tercio de gestación

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Médica Veterinaria Zootecnista

P R E S E N T A:

Mónica Ivonne Aguilar Orozco

A S E S O R E S:

Dr. José Antonio Vargas Villavicencio

M. en C. Claudia Patricia Rico Torres



MÉXICO, D. F

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Recordar que vas a morir es la mejor manera que conozco para evitar la trampa de pensar que tienes algo que perder.

Ya estás desnudo. No hay ninguna razón para no seguir

a tu corazón"

Steve Jobs

DEDICATORIA

A mis padres **Fidelina Orozco Álvarez** y **Alfredo Aguilar Bernal** por enseñarme el valor del trabajo y la dedicación. Sin su apoyo y cariño, este logro no sería lo mismo.

A mi hermano **Francisco Aguilar Orozco**, por ser mi guía y un gran ejemplo a seguir.

A mi tío **Germán Aguilar Bernal**, porque sé que desde donde está siempre me cuida y hoy estaría muy orgulloso de mi.

A **José Antonio Castillo Albineda** un hombre maravilloso, mi gran amor, cómplice y amigo.

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a **Dios**, por lo afortunada que soy de contar con el cariño de mi familia y amigos. Agradecer porque puedo compartir mi paso por esta vida con personas maravillosas, por guiar mis decisiones, porque siempre escucha mis plegarias, y me permite aprender de las situaciones desfavorables de la vida. Estoy convencida, de que incluso en esos momentos difíciles, Dios está conmigo cuidándome.

También quiero agradecer a un hombre ejemplar, trabajador y perseverante, mi padre **Alfredo Aguilar** porque nunca dejas de cuidarme y preocuparte por mí, por tu compañía en las buenas, las malas y las peores.

A mi madre **Fidelina Orozco** por cuidarme y quererme como solo tú puedes. Por tus consejos y tus "apapachos" en los momentos difíciles. Gracias a ambos por todo lo que han hecho por mí, y por los sacrificios que hicieron para que las cosas siempre fueran mejores, incluso a costa de su felicidad. Gracias por sus enseñanzas, cuidados y sobre todo gracias por estar conmigo siempre que los he necesitado.

A mi hermano **Francisco Aguilar**, gracias hermanito por todo lo que me has enseñado, por guiarme, por cuidarme todas las veces que te hacías cargo de mi como buen hermano mayor. Gracias por hacerme de desayunar cuando mis papás no estaban, y gracias por todas las alegrías que hemos compartido.

A ustedes, mi familia y mi pilar, quiero externarles mi más profundo agradecimiento y quiero decirles que este logro es de ustedes también, porque no habría podido concretar este gran sueño sin su apoyo. ¡Los amo!

A la **Dra. María Dolores Correa Beltrán**, gracias por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por sus enseñanzas, sus comentarios durante los seminarios para mejorar este trabajo de investigación, gracias por ser una mujer ejemplar que ha enriquecido mi formación personal y profesional.

A mis tutor el **Dr. José Antonio Vargas Villavicencio** gracias por tu apoyo para la realización de este trabajo, por tus consejos y comentarios para mejorar

esta tesis.

A mi tutora la **M. en C. Claudia Patricia Rico Torres (Claus)** muchísimas gracias por todo el apoyo que me brindaste, por el tiempo que invertiste en revisar la redacción y el contenido de mi trabajo, por tus enseñanzas de PCR en tiempo real, por ser una excelente tutora y una amiga. Gracias por escucharme y aconsejarme, y muchas gracias por animarme cuando el camino parecía difícil.

Quiero agradecer puntualmente a la **Dra. Correa y a mis tutores** el apoyo que me brindaron para asistir al Congreso Internacional de Parasitología enriqueciendo mi formación profesional.

A todos mis amigos y compañeros del LIE **Anita, Liz, Carlos, Alejandro, Irmity, Luis Fernando, Héctor, Rafita, Lulucita, Nacho, JL.** Gracias por los excelentes momentos que he compartido con ustedes, por su ayuda, apoyo, por sus consejos, todos y cada uno de ustedes ha influido de manera positiva en mi formación y de todos siempre he recibido lo mejor. De forma especial quiero agradecer a **Lizbeth Xicotencatl, Ana Laura Castañeda, Carlos Cedillo y Alejandro Besné** por su sincera amistad y todo el apoyo y consejos que siempre he recibido de ustedes, sus regaños y enseñanzas. Estoy segura de que todo lo que hacen, siempre es con la firme intención de hacer de mi una mejor persona.

A mis amigos de la FMVZ **Dianita, Lázaro, Vicky, Areli, León, Bere Aketzalli, Liliana, Ara, Julio, Rodri, Aidechi, Thalía, Julia, Isaac, Ninna, Claudia, Moni N.** Gracias por todo lo que hemos compartido, sus consejos, enseñanzas, créanme que siempre los llevo conmigo.

También quiero agradecer a mis amigos que nada tienen que ver con la MV pero aún así son parte importante en mi vida. **Gustavo, Eduardo, Melissa, Adrian, Dafne,** tal vez no nos veamos, pero siempre los recuerdo con mucho cariño.

A mis queridos changos del **IMOMUNDO** en su edición número **53.** **Susy, Mimi, Selene, Javi, Angy, Adrian, Bertha, Meli, Alfredo, Pablo, Chivis, Karla, Thania, Rodrigo, Perlita, Mitzi, Coni** , y obviamente también quiero agradecer a los seniors **Toñito, Nadia, Ana Gaby, Javier, Orlando** y a **Mónica Ramírez.** Muchísimas gracias por no soltarme y no dejar que me soltara de mi cuerda, sé

que soy "hiper ausente" con ustedes, pero quiero que sepan que de todos y cada uno de ustedes siempre me lleve la mejor de sus enseñanzas. A ustedes mi segunda familia ¡Los amo!

A **Toño Castillo**, gracias por tu amor, tus consejos, tu creatividad para hacerme reír, por motivarme, por ser mi amigo, por estar conmigo. Te amo y te adoro.

A todos los que han formado parte de mi vida y que han influido en mi formación profesional como la **Dra. Elizabeth del Castillo**, y los profesores con los que tuve el honor de cursar alguna asignatura, a mis alumnos porque siempre es un reto transmitir conocimientos y porque me motivan a ser la mejor versión de mi. También quiero agradecer a la **Dra. Fabiola Gómez** y al **Sr. Román** por su ayuda y apoyo en el laboratorio de prácticas.

A los miembros del jurado las Doctoras **Cristina, Yazmín, Marisol, María del Carmen y Anayantzín** por tomarse el tiempo para la revisión de este trabajo, y por sus comentarios para enriquecerlo.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que estuvieron y más aun a las que están conmigo, pues finalmente la suma de todas las vivencias compartidas dan como resultado la persona que soy hoy en día (aprovecho para disculparme si es que llegara a olvidar a alguno).

Muchas gracias a todas y cada una de las personas que colaboraron para llevar a cabo este logro, y gracias por ser parte de mi vida y de mi desarrollo personal, profesional y académico.

El presente trabajo de investigación fue realizado y financiado (Recursos Federales 2010 No. 065/2010) en el Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación, bajo la dirección del Dr. José Antonio Vargas Villavicencio y la M. en C. Claudia Patricia Rico Torres.

El uso del bioterio y los cuidados de los animales se desarrollaron en el Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría.

También, fue otorgada una beca de Ayudante de Investigador, CONACyT a Mónica Ivonne Aguilar Orozco por parte de la Dra. María Dolores Correa Beltrán (miembro del Sistema Nacional de Investigadores, nivel III).

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. Biología de <i>T. gondii</i>.....	2
1.1 Clasificación biológica y genética	4
2. Vías de transmisión.....	5
2.1 Transmisión horizontal	5
2.2 Transmisión vertical	6
2.3 Otras vías de transmisión	6
3. Epidemiología	6
4. Toxoplasmosis congénita	8
5. Patogenia	9
6. Métodos de diagnóstico.....	11
6.1 Pruebas indirectas	12
6.2 Pruebas directas	12
6.3 Aislamiento in vitro	13
6.4 Bioensayo in vivo	13
II. JUSTIFICACIÓN.....	15
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVO GENERAL	16
1. Objetivo Particular.....	16
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
1. Obtención de ratonas gestantes	17

2. Obtención de taquizoítos	17
3. Inoculación de ratonas gestantes	18
4. Eutanasia y recolección de muestras post-mortem	19
5. Estudios de biología molecular.....	19
5.1 Extracción de DNA.....	19
5.2 Cuantificación y pureza de DNA	20
5.3 Ensayos de Presencia/Ausencia de <i>T. gondii</i> por PCR en tiempo real	21
5.4 Determinación de carga parasitaria por PCR en Tiempo Real.....	22
6. Estudios histopatológicos	23
6.1 Inmunohistoquímica	24
VI. RESULTADOS.....	27
1. Biología Molecular.....	27
2. Hallazgos histopatológicos	29
2.1 Inmunohistoquímica	38
VII. DISCUSIÓN.....	43
VIII. ANEXO 1	47
1. Criterios para interpretar las técnicas de laboratorio.	47
1.1 Ensayo de Presencia/Ausencia por PCR en tiempo real	47
1.2 Ensayo de cuantificación por PCR en tiempo real	52
1.3 Criterios para evaluar los estudios histopatológicos	55
IX. REFERENCIAS	58

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Oligonucleótidos y sonda para el gen B1 de <i>T. gondii</i> .	21
Cuadro 2. Determinación de la carga parasitaria por PCR en tiempo real.	29
Cuadro 3. Criterios para determinar la presencia de DNA de <i>T. gondii</i> en una muestra problema con un ensayo de Presencia/Ausencia.	49
Cuadro 4. Categorización de las alteraciones observadas en los tejidos materno-fetales.	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .	3
Figura 2. Gráfica de la relación entre el momento de la infección durante la gestación y el porcentaje de transmisión/daño fetal.	8
Figura 3. Etapas de la invasión de <i>T. gondii</i> .	10
Figura 4. Relación entre la carga parasitaria en tejidos materno-fetales y la dosis de infección.	28
Figura 5. Replicación de <i>T. gondii</i> en tejidos maternos.	32
Figura 6. Replicación de <i>T. gondii</i> en placenta.	35
Figura 7. Presencia de <i>T. gondii</i> en tejidos fetales.	36
Figura 8. Relación entre el grado de daño y la dosis inoculada en los tejidos materno-fetales.	38
Figura 9. Inmunohistoquímica de placenta.	39

Figura 10.	Inmunohistoquímica de tejido fetal.	40
Figura 11.	Útero con reabsorción debido a replicación de <i>T. gondii</i> .	42
Figura 12.	Esquema del fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.	48
Figura 13.	Ejemplo de una gráfica de Presencia/Ausencia por PCR en tiempo real.	51
Figura 14.	Ejemplo de una curva estándar elaborada con el resultado de las Ct obtenidos de cada estándar contra el logaritmo de la concentración.	54
Figura 15.	Inmunohistoquímica de tejidos maternos.	57

RESUMEN

AGUILAR OROZCO MÓNICA IVONNE. Transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* en un modelo de ratonas BALB/c durante el tercer tercio de gestación. Dr. José Antonio Vargas Villavicencio y M. en C. Claudia Patricia Rico Torres.

La transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* se presenta generalmente cuando una mujer se infecta durante el embarazo. El tercio de la gestación en el que se infecta la madre, la carga parasitaria y la virulencia de la cepa, son factores que condicionaran la presentación de la infección vertical, así como su gravedad. En seres humanos se ha reportado que la frecuencia de la transmisión congénita es inversamente proporcional a la severidad de la misma. Actualmente no existen modelos de toxoplasmosis congénita que tengan por objetivo evaluar si existe relación entre el tercio de la gestación donde se da la infección y el grado de daño que produce *T. gondii* al invadir la placenta y el feto. Por esta razón es necesario desarrollar un modelo que simule las condiciones de la infección congénita en seres humanos. El objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de transmisión vertical de *T. gondii* en un modelo de ratonas BALB/c infectadas durante el tercer tercio de gestación. Así como, evaluar el grado de daño provocado por este parásito en los tejidos materno-fetales.

Se realizaron ensayos de presencia/ausencia, cuantificación absoluta por PCR en tiempo real y estudios histopatológicos. En los primeros se demostró la presencia del DNA del parásito en el 100% de los tejidos materno-fetales; y el 90% de los casos evaluados por inmunohistoquímica, fueron positivos.

I. INTRODUCCIÓN

1. Biología de *T. gondii*

Toxoplasma gondii es un protozooario parásito intracelular obligado perteneciente al phylum Apicomplexa, el cual se caracteriza por presentar un conjunto de organelos especializados en la invasión celular, llamado complejo apical. Se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y afecta a un gran número de vertebrados homeotermos (Montoya y Liesenfeld., 2004; Hill et al., 2005; Dubey., 2010).

El ciclo de vida de *T. gondii* (Figura 1) requiere de dos huéspedes para completar su desarrollo; un definitivo que puede ser cualquier miembro de la familia Felidae (felinos domésticos y silvestres), en el que ocurre la fase intestinal o sexual y un intermediario en el que se desarrolla la fase asexual o extraintestinal y puede ser cualquier mamífero, ave e incluso el ser humano (Tenter et al., 2000; Cedillo-Peláez., 2009; Dubey., 2010).

El ciclo de vida de este parásito comprende tres estadios principales:

- 1) el **taquizoíto**: forma de replicación rápida (4 a 6 horas), se presenta en la fase aguda de la infección y es responsable de invadir cualquier célula nucleada y tejidos como la placenta y el feto durante la transmisión vertical (Dardè, 2004)
- 2) el **bradizoíto**: forma crónica y de lenta multiplicación, es capaz de permanecer inactivo por largos periodos dentro de los **quistes tisulares**, los cuales están formados por cientos o miles de bradizoítos.

3) el **esporozoíto**: es la forma altamente infectante de este parásito, está confinado dentro de los **ooquistes**, los cuales son liberados al ambiente en las heces del huésped definitivo, y cuando el ooquiste madura da lugar a 8 esporozoítos.

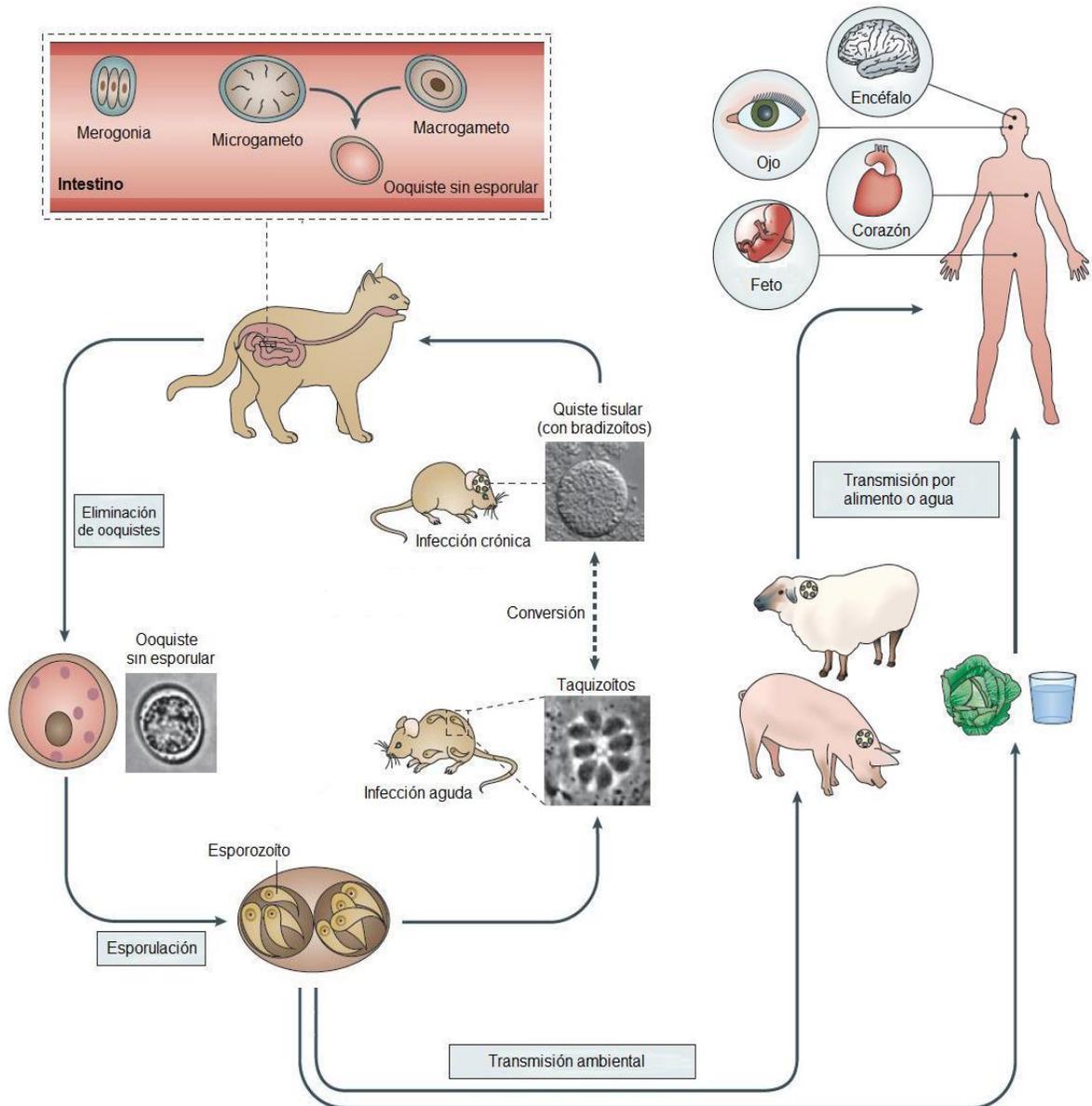


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Tomado con modificaciones de Hunter y Sibley., 2012.

1.1 Clasificación biológica y genética

Hasta hace unos años, la mayoría de los aislamientos de *T. gondii* provenían de seres humanos y animales de Europa y Norteamérica. Éstos fueron agrupados en tres tipos genéticos o linajes predominantes denominados I, II y III, de acuerdo a su capacidad de replicación y patogenicidad en ratones y cultivos celulares (Dardè, 2004). Las cepas tipo I son las más virulentas en ratones ($DL_{100}=1$), tienen altas tasas de multiplicación *in vitro*, una reducida interconversión de taquizoíto a bradizoíto y están asociadas a problemas clínicos graves en infecciones adquiridas y congénitas en seres humanos (Saeij et al., 2005; Su et al., 2006). El genotipo II es menos virulento en ratones, en comparación con las cepas tipo I; presenta un ritmo de multiplicación lento, alta interconversión de taquizoíto a bradizoíto y tienden a formar quistes tisulares. Las cepas tipo II son las cepas más comunes en Europa en casos de transmisión congénita, mientras que las tipo I se encuentran en menor proporción (Fuentes et al., 2001). El genotipo III es relativamente virulento en ratones ($DL_{50} \geq 10^3$ taquizoítos) y de fácil establecimiento en las infecciones crónicas (Dardè, 2004). La variabilidad genética entre estos tres linajes se consideraba relativamente baja, siendo $\leq 1\%$. Sin embargo, en estudios recientes y basados en nuevos marcadores polimórficos para la caracterización de genotipos a partir de aislamientos han revelado una mayor variabilidad genética en diferentes partes del mundo (Ajzenberg et al., 2002; Dardè, 2004; Saeij et al., 2005; Su et al., 2006; Dubey y Jones, 2008; Dubey et al., 2008).

Recientemente, con el estudio de cepas atípicas y recombinates, *T. gondii* ha sido clasificado en 15 haplogrupos a nivel mundial (Su et al., 2012). En nuestro

país, existen pocos reportes sobre los genotipos circulantes en animales y seres humanos. Estos estudios refieren los genotipos I y III, aunque también se han reportado genotipos atípicos y recombinantes. En casos de toxoplasmosis congénita, el genotipo II es el más frecuente en África, Asia y Europa, mientras que en América predominan los atípicos y el tipo I (Ajzenberg et al., 2002; Khan et al., 2006; Cedillo-Peláez et al., 2011; Rico-Torres et al., 2012; Rico-Torres et al., 2015).

2. Vías de transmisión

2.1 Transmisión horizontal

La dispersión de este protozoario se debe en gran medida a las diversas formas de contagio. La transmisión horizontal de *T. gondii* ocurre generalmente por la ingestión de carne parcialmente cocida de diversas especies animales, por ejemplo de cerdo y cordero, entre otras; o bien por el consumo de agua, frutas, verduras y hortalizas contaminadas con ooquistes. Asimismo, las personas que manipulan tierra o carne, y que presentan soluciones de continuidad en la piel, y que además trabajan sin equipos de protección, están expuestos indirectamente a una contaminación accidental (Tenter et al., 2000).

En el caso de los huéspedes intermediarios herbívoros (ovejas, cabras y bovinos) pueden contagiarse por la ingestión de forrajes, agua o tierra contaminados con ooquistes; para el caso de los carnívoros, la infección se lleva a cabo por el consumo de carne con quistes tisulares, y de agua contaminada con

ooquistes (Montoya y Liesenfeld., 2004).

2.2 Transmisión vertical

Ocurre cuando una hembra adquiere la infección antes o durante la gestación y los fetos son infectados de forma transplacentaria. (Ambroise-Thomas y Petersen, 2000; Tenter et al., 2000). En seres humanos, la transmisión congénita se presenta generalmente cuando una mujer se infecta durante el embarazo; sin embargo, también puede ocurrir en mujeres infectadas crónicamente y en aquellas que presentan una reactivación de la infección (Remington et al., 2006; Elbez-Rubinstein et al., 2009).

2.3 Otras vías de transmisión

Los pacientes que reciben un trasplante de diferentes órganos (corazón, pulmón, riñón e hígado) pueden infectarse por la presencia de quistes tisulares provenientes de los donadores infectados. Así mismo los pacientes que reciben una transfusión sanguínea también pueden contagiarse debido a la presencia de taquizoítos en leucocitos circulantes, causando una infección aguda. (Dupouy et al., 1993; Tenter et al., 2000).

3. Epidemiología

La toxoplasmosis es una enfermedad prevalente en la mayoría de las zonas del mundo y se considera que más de un tercio de la población mundial se encuentra crónicamente infectada. El contacto con este parásito depende de

factores climáticos, hábitos alimenticios, edad, educación y nivel socioeconómico (Tenter et al., 2000). La prevalencia en humanos depende de la localización geográfica, oscilando entre el 15 y el 85% de la población mundial adulta. En Estados Unidos y el Reino Unido se estima una prevalencia en humanos del 16 al 40%, mientras que en Centro y Sudamérica, así como el resto de Europa, la prevalencia alcanza el 50 al 80% (Tenter et al., 2000; Ajzenberg et al., 2004).

En México varios autores han reportado valores de prevalencia que van del 16 al 56%. En la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 1987, se encontró que el 50% de los individuos estudiados reportaron altos niveles de anticuerpos contra el parásito, con variaciones regionales del 17% para Baja California Sur hasta 67.5% para Tabasco (Velasco-Castrejón et al., 1991).

En Mérida, se han llevado a cabo pruebas para estimar la seroprevalencia en muestras sanguíneas de mujeres con antecedentes de aborto espontáneo, revelándose que el 58% de las mujeres tienen anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* (Vado-Solis et al., 2013).

En otro estudio realizado en el centro del país, el 30% de mujeres gestantes fueron seropositivas a anticuerpos IgM específicos anti-*T. gondii* (Cañedo-Solares et al., 2009). Por otro lado, se sabe que la prevalencia de infección por *T. gondii* en mujeres gestantes en Durango es baja (6.1%) comparada con la reportada en otras regiones del país (Alvarado-Esquivel et al., 2006). Sin embargo, solo en el centro del país, se ha reportado una prevalencia de toxoplasmosis congénita del 0.2% (CI_{95%} 0.07-1.2%), encontrándose los genotipos I y atípicos en cuatro casos de transmisión vertical (Correa et al., 2001; Vela-Amieva et al., 2005; Rico-Torres

et al, 2012).

4. Toxoplasmosis congénita

La frecuencia y gravedad de la infección congénita depende del tercio de la gestación en que ocurre la primo-infección. Si ocurre durante el primer tercio del embarazo, la frecuencia de transmisión al embrión en desarrollo es baja (2 al 15 %), pero si se presenta, generalmente provoca aborto.

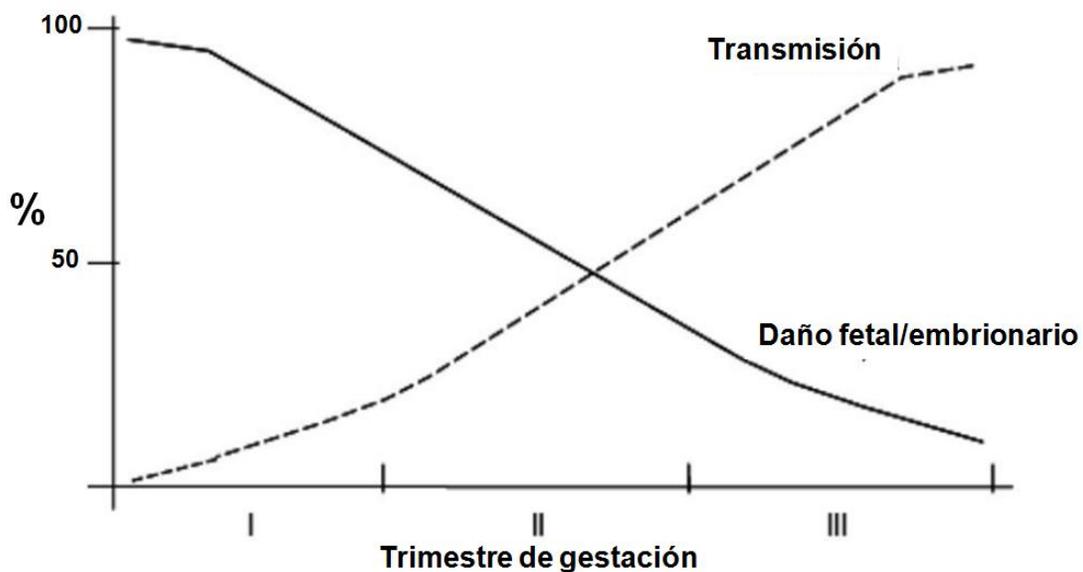


Figura 2. Gráfica de la relación entre el momento de la infección durante la gestación y el porcentaje de transmisión/daño fetal. Tomado de Correa et al, 2009.

Si la infección tiene lugar en el segundo trimestre, la tasa de transmisión vertical aumenta y los fetos infectados suelen nacer prematuramente o con problemas clínicos severos, incluyendo cuadros neurológicos con secuelas graves (meningoencefalitis granulomatosa con hipertensión intracraneana, hidrocefalia secundaria a endimitis y ventriculitis), así como calcificaciones cerebrales

difusas (Remington et al., 2006; Elbez-Rubinstein et al., 2009).

En el tercer trimestre de la gestación, la tasa de transmisión aumenta hasta el 80%, pero la mayoría de los bebés nacen asintomáticos y a término. Aunque posteriormente, pueden presentar secuelas neurológicas, oftalmológicas o auditivas en un tiempo que va desde 3 meses hasta los 20 años (Dunn et al., 1999; Dubey, 2010).

5. Patogenia

Está fuertemente vinculada a la invasión, multiplicación intracelular, y a una serie de eventos que preceden a estos dos fenómenos, como son: la lisis celular y la necrosis tisular (Galván-Ramírez y Mondragón-Flores, 2001).

El taquizoíto puede invadir cualquier célula nucleada, adhiriéndose a la membrana celular, proceso que depende del complejo apical y del contenido de diversos organelos secretores, los cuales favorecen el contacto, anclaje, penetración y formación de la vacuola parasitófora (VP). Una vez que se logra un ambiente adecuado para la invasión, *T. gondii* libera de forma secuencial el contenido de otros organelos para mediar su entrada a la célula, induciendo cambios en la superficie y penetrando a través de una unión membranosa móvil. Posteriormente, secreta proteínas de otros organelos para generar la vacuola parasitófora y para la captación de nutrientes de la célula parasitada. Después de entrar, el taquizoíto mantiene su forma arqueada, o puede adquirir forma ovoide quedando delimitado en la VP con la formación de un sistema membranoso tubulovesicular interno, que le confiere estabilidad y protección contra los

mecanismos de defensa del hospedero, por ejemplo, evita la acción de las enzimas contenidas en los lisosomas, lo que favorece su multiplicación activa sin peligro de ser destruido. Dentro de la célula afectada el taquizoíto se multiplica asexualmente en varias ocasiones (endodiogenia). Los protozoarios raramente se dividen simultáneamente, por lo que la progenie se dispone aleatoriamente sin algún arreglo en particular. Sin embargo, en ocasiones se dividen en forma sincronizada en forma de rosetas, como es el caso de este parásito (Sibley, 2003; Carruthers, 2006; Laliberte y Carruthers, 2008; Kim y Weis, 2008).

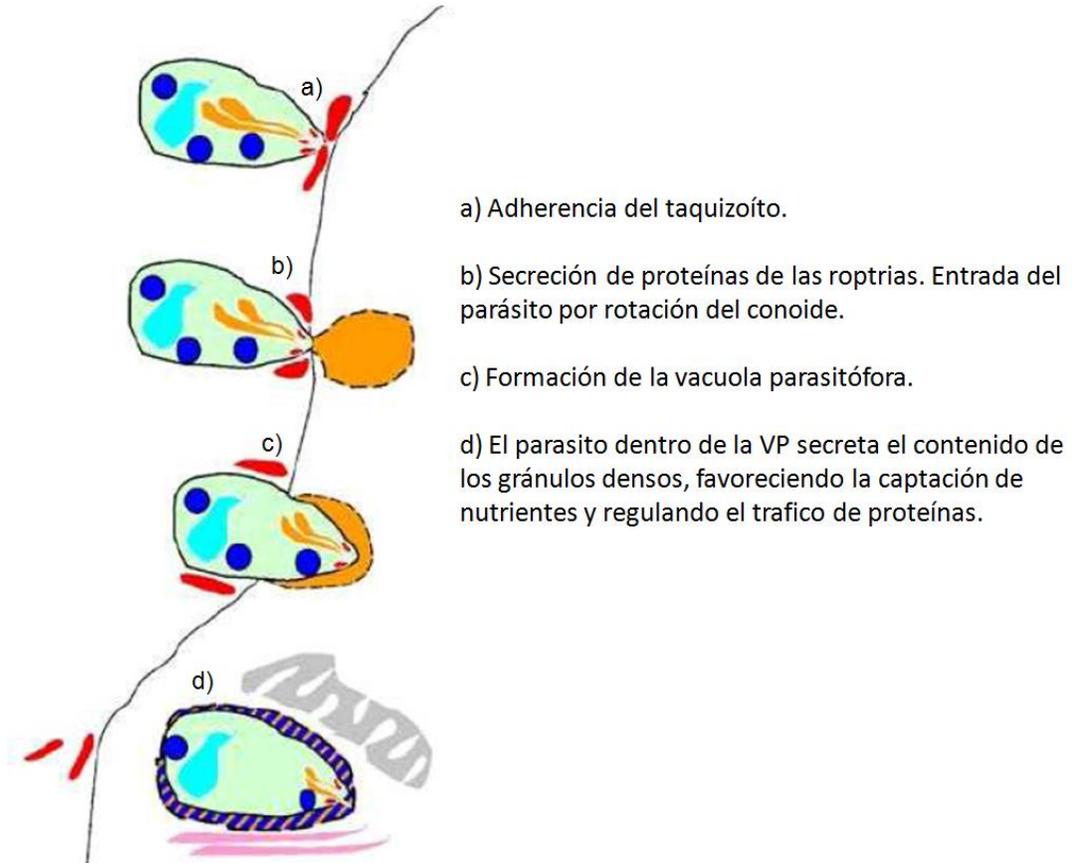


Figura 3. Etapas de la invasión de *T. gondii*. Tomado y modificado de Kim, 2004.

Cualquiera que sea la fase infectante del parásito (ooquiste ó quiste tisular), al

alcanzar la luz intestinal, los bradizoítos y los esporozoítos penetran las células epiteliales multiplicándose dentro de las primeras 24 horas post-infección, generando múltiples taquizoítos, los cuales posteriormente se diseminan a través de vasos linfáticos hasta llegar a nódulos linfoides mesentéricos. Posteriormente, al diseminarse por vía sanguínea, alcanzan otros órganos y se multiplican en cualquier célula susceptible del huésped. El cuadro clínico es determinado por la extensión del daño en los tejidos afectados. Las lesiones necróticas son causadas por la carga parasitaria de los taquizoítos, acompañadas de una respuesta inflamatoria. El huésped puede morir por un cuadro de toxoplasmosis aguda debido a las lesiones necróticas del intestino y nódulos linfáticos mesentéricos, aunado a lesiones en otros tejidos. En seres humanos, la severidad y la presentación clínica de la enfermedad dependen de factores propios del huésped, como el estado de salud, el estado inmunológico, el fondo genético y también por factores del parásito, como el estadio, la virulencia de la cepa y la dosis infectiva.

En personas inmunocompetentes la toxoplasmosis suele ser asintomática sin causar enfermedad clínica, siendo poco frecuentes los casos severos. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, transplantados y en neonatos infectados congénitamente puede causar incluso la muerte (Cedillo-Peláez, 2009; Hill et al., 2005).

6. Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la toxoplasmosis se basa en una amplia variedad de pruebas y técnicas de laboratorio. En general, estas pruebas se complementan

para tener un diagnóstico integral y confiable. Existen dos tipos de pruebas: las indirectas y las directas. Las primeras, se basan en la detección de anticuerpos específicos en el suero y las segundas, tienen por objeto demostrar la presencia del agente etiológico en modelos *in vivo* e *in vitro*. Actualmente, mediante técnicas de biología molecular es posible detectar el DNA del agente etiológico en diferentes muestras biológicas para apoyar el diagnóstico. (Ambroise-Thomas y Petersen, 2000; Galván-Ramírez y Mondragón-Flores, 2001).

6.1 Pruebas indirectas

En los últimos años, han surgido nuevas herramientas de diagnóstico que permiten la identificación de las diferentes clases de anticuerpos específicos de *Toxoplasma gondii*, por ejemplo, los anticuerpos IgA, IgE, IgM e IgG y sus subclases. Actualmente, el ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) y el Western-blot son las técnicas indirectas más utilizadas en el diagnóstico de esta parasitosis. Por otro lado, existen otras técnicas como Sabin-Feldman (DT), inmunofluorescencia indirecta (IFAT), aglutinación modificada (MAT), hemoaglutinación indirecta (IHA), aglutinación en látex (LA) que han sido implementadas en diferentes estudios (Mcleod et al., 1991; Díaz-Díaz et al., 2013).

6.2 Pruebas directas

Estas pruebas se emplean para poner de manifiesto a los diferentes estadios del parásito ó su DNA a partir de muestras biológicas, ya sea por medio

de tinciones con colorantes (Wright, azul tripano, hematoxilina-eosina) e inmunohistoquímica, con los bioensayos *in vivo* e *in vitro* y con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ambroise-Thomas y Petersen 2000; Díaz-Díaz et al., 2013).

6.3 Aislamiento *in vitro*

Este procedimiento se realiza utilizando diferentes líneas celulares (Vero, fibroblastos, etc). La tinción de estos cultivos es muy útil, ya que permiten poner al parásito de manifiesto (Derouin et al., 1987; Hitt y Filice, 1992). La sensibilidad de esta prueba es comparable con la inoculación en ratones, con la ventaja de que se pueden obtener resultados en un menor lapso de tiempo (6 a 8 días, dependiendo del tipo celular), en comparación con el aislamiento *in-vivo* (Fricker-Hidalgo et al., 1998).

Algunos reportes han demostrado que los cultivos celulares pueden ser aplicados para un aislamiento rápido a partir de sangre, líquido amniótico y otros tejidos infectados, sirviendo como una prueba de apoyo para el diagnóstico serológico (Ambroise-Thomas y Petersen 2000; Galván-Ramírez y Mondragón-Flores, 2001).

6.4 Bioensayo *in vivo*

El ratón es el animal más utilizado para este ensayo, ya que puede ser fácilmente inoculado por vía intraperitoneal u oral con taquizoítos o quistes de *T. gondii* provenientes de diferentes muestras biológicas (Jensen et al., 1998;

Derouin y Garin, 1991). Un aislamiento positivo requiere de la demostración de los anticuerpos anti-*T. gondii* en el suero/plasma del animal ó de la detección de quistes en los tejidos del ratón infectado (Johnson, 1994; Dubey, 1996). Esta técnica tiene la desventaja de que los resultados a menudo se demoran, dependiendo de la cepa del ratón que se trate, los parásitos pueden ser identificados de 30 a 60 días después de la inoculación y se manejan parásitos vivos lo que conlleva a posibles riesgos de infección accidental para el personal que los manipula (Suzuki et al., 1995; Dubey, 1996).

Recientemente, diferentes modelos animales (hámster, cobayo, rata y ratón) han sido utilizados para el estudio de la toxoplasmosis congénita (Cowen y Wolf, 1950; Dubey y Shen, 1996; Freyre et al, 2006a; Freyre et al, 2006b; Freyre et al, 2009).

II. Justificación

En el laboratorio de Inmunología experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP), se decidió trabajar con el ratón con base a una revisión sistemática (Vargas-Villavicencio, datos no publicados) ya que posee características similares a las del ser humano durante la gestación:

- Tipo de placenta (hemomonocorial)
- Resistencia a la infección
- Presenta transmisión vertical
- Respuesta inmunológica

Un modelo de infección congénita a nivel laboratorio nos permitirá estudiar los diferentes aspectos biológicos y clínicos de la transmisión vertical de este parásito durante las diferentes etapas de la gestación. Actualmente, en el laboratorio se ha estudiado la transmisión vertical de *T. gondii* durante el segundo período de la gestación en ratonas BALB/c, observándose que a partir de la dosis de 5×10^6 taquizoítos, la frecuencia de transmisión y daño fetal es mayor al 50%, lo cual corresponde a lo observado en la toxoplasmosis congénita en seres humanos (Vargas-Villavicencio, datos no publicados; Dunn et al., 1999). Actualmente, se están evaluando los mismos parámetros en el primer tercio de la gestación, por ende, es necesario evaluar el tercer período de la gestación para demostrar si la frecuencia de transmisión y el grado de daño fetal son semejantes a los reportados en la toxoplasmosis congénita.

III. Hipótesis

El porcentaje de transmisión vertical de *Toxoplasma gondii*, en ratonas BALB/c infectadas durante el tercer tercio de gestación será mayor al 80%, mientras que el grado de daño causado a los órganos materno-fetales será de leve a moderado.

IV. Objetivo General

Determinar el porcentaje de transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* en un modelo de ratonas BALB/c infectadas durante el tercer tercio de gestación.

1. Objetivo Particular

Evaluar el grado de daño provocado por la invasión y replicación de *T. gondii* en los tejidos materno-fetales.

V. Material y Métodos

1. Obtención de ratonas gestantes

El estudio se llevó a cabo en el bioterio del INP, bajo las condiciones establecidas por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) y por el Comité de bioética del INP. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 8 a 10 semanas de edad. Las hembras fueron pesadas, antes de ser confinadas con los machos. Posteriormente, se alojaron dos hembras y un macho por caja y permanecieron bajo las siguientes condiciones: periodo de luz-obscuridad invertido, temperatura controlada de 25 °C, agua y alimento *ad libitum*, durante un periodo de 48 horas. Durante ese tiempo, se revisaron a las hembras cada 8 horas en busca del tapón vaginal, la presencia del mismo, fue considerado como el inicio de la gestación.

Transcurrido el periodo de 48 horas, las ratonas que tuvieron tapón vaginal fueron pesadas y los machos fueron retirados de las cajas. El registro del peso de las hembras se realizó una vez por día y durante los 15 días subsecuentes.

Mediante la presencia del tapón vaginal y el aumento de peso se verificó el número de ratonas gestantes con base en lo referido por Freyre et al., (2009) y aquellas ratonas que no estuvieron gestantes, fueron eliminadas del estudio.

2. Obtención de taquizoítos

Los taquizoítos utilizados en el estudio, se obtuvieron a partir de la infección de un ratón C57BL inoculado por vía intraperitoneal con 3 millones de taquizoítos

de la cepa ME49 (cepa de referencia, genotipo II) suspendidos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01M, pH 7.2).

Transcurridos cuatro días, se llevó a cabo la cosecha de los parásitos, haciendo un lavado peritoneal al ratón con PBS estéril, colectando 25 millones de parásitos aproximadamente.

Posteriormente, se tomó una porción de la suspensión de taquizoítos, a la cual se le agregó azul de tripano para calcular la pureza y viabilidad. Se tomó una gota y se colocó en la cámara de Neubauer (Marienfeld) para observarla en el microscopio óptico y determinar la cantidad de parásitos viables (taquizoítos no teñidos). El resto de la muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón formado se colocó en PBS estéril, para posteriormente utilizarlo en la infección de las hembras, y en la elaboración de la curva estándar de PCR en tiempo real (determinación de la carga parasitaria).

3. Inoculación de ratonas gestantes

Al inicio del tercer tercio de la gestación (día 15), las hembras fueron organizadas en cinco grupos de tres animales. Cada grupo fue inoculado por la vena coccígea con diferentes dosis de taquizoítos (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 millones) de la cepa ME49 (tipo II), suspendidos en 300 μ L de PBS. A partir de este momento, las ratonas fueron monitoreadas tres veces al día para evitar que los fetos se perdieran por canibalismo, en el supuesto de que las hembras abortarán o se adelantará la fecha probable de parto.

4. Eutanasia y recolección de muestras post-mortem

Al día 3 posterior a la infección (día 18 de la gestación), a todas las ratonas se les practicó la eutanasia por dislocación cervical según la NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente, se llevó a cabo la exposición de los órganos de la cavidad abdominal y de cada ratona se extrajo el hígado, bazo y útero, recolectándose secciones representativas de los órganos y preservándose para las diferentes técnicas de laboratorio.

Una sección de los órganos fue recolectada y procesada para la parte de biología molecular (purificación de DNA, detección y cuantificación por PCR en tiempo real) y otra parte, fue utilizada para el análisis de histopatología (HP); en el caso del útero, de forma aleatoria uno de los cuernos se preservó para HP y el restante para las técnicas moleculares.

5. Estudios de biología molecular

Se colectó una porción de bazo de cada ratona gestante, el feto y su correspondiente placenta por separado. Se pesaron aproximadamente 20 mg de cada tejido y se colocaron en microtubos de 1.5 mL, para su posterior procesamiento.

5.1 Extracción de DNA

Cada tejido fue homogenizado con la ayuda de un embolo estéril de una jeringa de insulina. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1.5 mL de una

solución comercial de lisis celular (Puregen Cell Lysis Solution, Qiagen) y la suspensión fue incubada a 65 °C durante 1 hora en un termoblock digital (Accu Block, Labnet), transcurrido ese tiempo se les adicionaron 10 µL de solución de Proteinasa K (20 mg/mL, Sigma) y se incubó a 55 °C durante toda la noche. Al día siguiente, el tejido lisado fue transferido un tubo de fondo cónico de 15 mL y se le adicionaron 500 µL de solución de precipitación de proteínas (Puregen Protein Precipitation Solution, Qiagen). En seguida, se agitó en un vórtex (Velp Scientifica) y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15 mL con 2 mL de isopropanol absoluto (Sigma). Posteriormente, se mezcló manualmente y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, se decantó el isopropanol y se agregaron 2 mL de etanol (Sigma) al 70%, se agitó en un vórtex y se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla del DNA, invirtiendo el tubo sobre papel absorbente para permitir la evaporación del etanol. La pastilla de DNA se hidrató con 100 µL de solución de hidratación comercial (Puregen DNA Hydration Solution, Qiagen). El DNA hidratado fue transferido a microtubos de 1.5 mL y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

5.2 Cuantificación y pureza de DNA

La concentración y pureza del DNA se determinó mediante la espectrofotometría convencional a una longitud de onda de 260, 280 y 230 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). Posteriormente, se diluyó cada muestra de DNA para obtener una concentración de 50ng/µL.

5.3 Ensayos de Presencia/Ausencia de *T. gondii* por PCR en tiempo real

Se emplearon un par de oligonucleótidos y una sonda TaqMan (Applied Biosystems) para la amplificación específica de un fragmento de 62 pb del gen B1 de *T. gondii* para realizar un ensayo cualitativo de Presencia/Ausencia (Kompalic-Cristo et al., 2007; Cuadro 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L, conteniendo la mezcla universal de reacción 2X TaqMan, 1 μ M de ambos oligonucleótidos, 0.25 μ M de la sonda marcada y 125 ng de la muestra de DNA. Las muestras se probaron por triplicado y en cada reacción se incluyó un control interno (Exogenous Internal Positive Control, IPC) y un control negativo (mezcla de reactivos sin muestra de DNA). La amplificación se realizó en un equipo StepOne de 48 pozos (Applied Biosystems). Como control positivo de la amplificación de DNA se utilizó DNA de las cepas RH y ME49 de *T. gondii*, respectivamente.

Cuadro 1. Oligonucleótidos y sonda para el gen B1 de *T. gondii*

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Posición	Tm
Sentido GENE_B1_TG-TX2F	5'CTAGTATCGTGCGGCAATGTG 3'	531–551	64°C
Antisentido GENE_B1_TG-TX2R	5'GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT 3'	571–592	64°C
Sonda GENE_B1_TG-TX2M1	5'(6-FAM)-CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-GB) 3'	552–567	54°C

5.4 Determinación de carga parasitaria por PCR en Tiempo Real

Se realizó una curva estándar para cada uno de los tejidos en estudio (bazo, placenta y feto). Cada curva se construyó utilizando de 5 a 20 mg de tejidos de ratonas BALB/c serológicamente negativas a *T. gondii*. Posteriormente, se les adicionaron diferentes diluciones seriadas de taquizoítos (desde 5×10^6 hasta 5 parásitos) de la cepa ME49. Se realizó la extracción de DNA, de la misma manera que se describió anteriormente mediante el kit comercial (Gentra Puregene Tissue Kit, Qiagen). El DNA fue cuantificado y diluido para obtener una concentración de 50 ng/ μ L. Se emplearon los mismos oligonucleótidos y sonda TaqMan que fueron utilizados en el ensayo de Presencia/Ausencia. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L, conteniendo la mezcla universal de reacción 2X TaqMan, 1 μ M de ambos oligonucleótidos, 0.25 μ M de la sonda marcada y 125 ng de cada punto de la curva estándar y de cada muestra problema. Las muestras se probaron por triplicado y en cada reacción se incluyó un control negativo (mezcla de reactivos sin muestra de DNA). La amplificación se llevó a cabo en 40 ciclos a las siguientes temperaturas: 95 °C durante 15 s, y 60 °C durante 1 minuto, utilizando un equipo Step One de 48 pozos (Applied Biosystems). Los datos de fluorescencia se recopilaron al final del proceso de PCR por el software StepOne 2.2 que nos proporcionó el coeficiente de regresión lineal (R^2) y la eficiencia de amplificación (Eff% $\pm 10\%$). El valor de Ct (ciclo umbral), de cada muestra problema se interpoló en cada curva estándar para conocer el número de taquizoítos/mg de tejido.

6. Estudios histopatológicos

De los tejidos recolectados para esta técnica, se fijaron por inmersión en formalina amortiguada al 10% (pH 7.2) por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, de los tejidos maternos: hígado y bazo se cortaron secciones longitudinales de 0.3 a 0.5 cm de grosor y fueron colocadas en casetes de plástico para su posterior inclusión en parafina; en el caso del útero y los fetos, se cortaron tanto secciones longitudinales como transversales, incluyendo la placenta. Las muestras se remitieron al Departamento de Anatomopatología del INP, para su procesamiento por histopatología convencional con base en lo descrito por Heffes y Mullick (1995), procesándose en un deshidratador de tejidos automático (Histoquinete, Leica). Los tejidos fueron deshidratados con soluciones de etanol a concentraciones ascendentes del 80, 95 y 100%, alcohol absoluto-xileno (relación 1:1). Posteriormente, fueron depositados en dos cambios de xilol y uno final en parafina.

Después de la primera exposición con la parafina, los tejidos fueron retirados del casete y se incluyeron en un molde metálico y se embebieron en parafina líquida, dejando solidificar a temperatura ambiente ó a 4 °C durante 15 a 40 minutos. Una vez procesados los tejidos y solidificada la parafina, se cortaron secciones con un micrótopo estándar (Microm Carl Zeiss HM35), de 5 a 7 µm de grosor. Los cortes se extendieron en el baño de flotación y se recuperaron montándose en portaobjetos convencionales y el laminillas electrocargadas. Posteriormente, las laminillas fueron colocadas en la platina a una temperatura de 37 a 40 °C para retirar los restos de parafina. Finalmente, los cortes fueron

teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), para su posterior revisión por microscopia óptica convencional y los cortes recuperados en laminillas electrocargadas fueron procesadas para inmunohistoquímica.

6.1 Inmunohistoquímica

Para la identificación específica y morfológica de *T. gondii* en los tejidos, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica con base en lo referido por Heffes y Mullick, (1995); Ramos-Vara, (2005) y Cedillo-Peláez, (2009) con ligeras modificaciones. Como testigos positivos se emplearon secciones de hígado de ratonas BALB/c infectadas con *T. gondii*, en las cuales ya se había identificado la presencia de taquizoítos con la misma técnica. Como testigo negativo se sustituyó el primer anticuerpo por PBS-T20.

De cada tejido a evaluar por histopatología, se realizó otro corte de 5 a 7 µm de grosor con un micrótomo estándar, recuperándose en laminillas electrocargadas (Kling-On HIER Slides, Biocare Medical). Posteriormente, se lavaron en dos ocasiones con xilol para retirar la parafina, los residuos de xilol se eliminaron con alcohol absoluto y los tejidos fueron rehidratados con una serie de lavados en etanol con concentraciones descendentes (90, 80 y 70%) y agua destilada. Se inhibió la acción de la peroxidasa endógena (de los tejidos) con peróxido de hidrógeno al 70% diluido en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Los residuos de peróxido de hidrógeno se retiraron lavando los tejidos con agua destilada. Se realizó otro lavado con PBS-T20 al 5%, se bloqueó la avidina y biotina endógenas (Avidin-Biotin solution, Invitrogen) y se incubaron los cortes en

una cámara húmeda a 37 °C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, las laminillas se lavaron con PBS-T20 durante 5 minutos y pasado este tiempo, para cada sección de tejido se aplicó una solución de bloqueo inespecífica (Blocking solution, Invitrogen) y se incubó a 37 °C durante 15 minutos; las laminillas se decantaron para remover el exceso de solución bloqueadora y a cada corte se le añadió como anticuerpo primario, suero de un gato positivo a infección por *T. gondii*, diluido 1:200 con PBS y se incubó en una cámara húmeda a 37 °C durante 45 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizó otro lavado con PBS-T20 al 5%, y se colocó como anticuerpo secundario anti-IgG de gato producido en cabra acoplado a peroxidasa de rábano (Goat Anti-Cat IgG Fc (HRP) ab112801, Abcam) diluido 1:200 en PBS-T20, se incubó a 37 °C en una cámara húmeda durante 45 minutos. Posteriormente, se realizó un último lavado con PBS-T20 al 5%.

Para determinar la presencia o ausencia del antígeno en los tejidos, a cada corte se le agregó solución comercial de revelado (Betazoid DAB Chromogen Kit, Biocare Medical). Tras agregar la solución reveladora, se observó la reacción del colorante por microscopia óptica hasta que el cambio en la coloración fue evidente (1-2 minutos aproximadamente), y en ese instante fue detenida la reacción, sumergiendo la laminilla en agua destilada. Los cortes se contrastaron con hematoxilina de Meyer y se lavaron con agua destilada cubriéndose con cubreobjetos convencionales y resina (EcoMount, Biocare Medical).

La interpretación de los resultados para los estudios moleculares se realizó con los datos obtenidos por el software del equipo Step One, y los estudios histopatológicos se interpretaron asignando un valor a las alteraciones

seleccionadas previamente con base en la literatura, para determinar el grado de daño en los tejidos. (Anexo 1. Criterios para la interpretación de técnicas de laboratorio).

VI. RESULTADOS

1. Biología Molecular

En los ensayos de presencia/ausencia, se demostró la presencia del DNA del parásito en todos los tejidos materno-fetales (bazo, placenta, fetos y reabsorciones), teniendo entonces una frecuencia de transmisión vertical del 100% en todas las dosis de infección analizadas (Cuadro 2). Posteriormente, la misma muestra de DNA fue utilizada para la determinación de la carga parasitaria, siguiendo los criterios establecidos para la cuantificación absoluta (ver Anexo 1). Se encontró que la mayor carga parasitaria se alojó en los bazos de las ratonas gestantes, seguida de las placentas, las reabsorciones y finalmente los fetos (Figura 4).

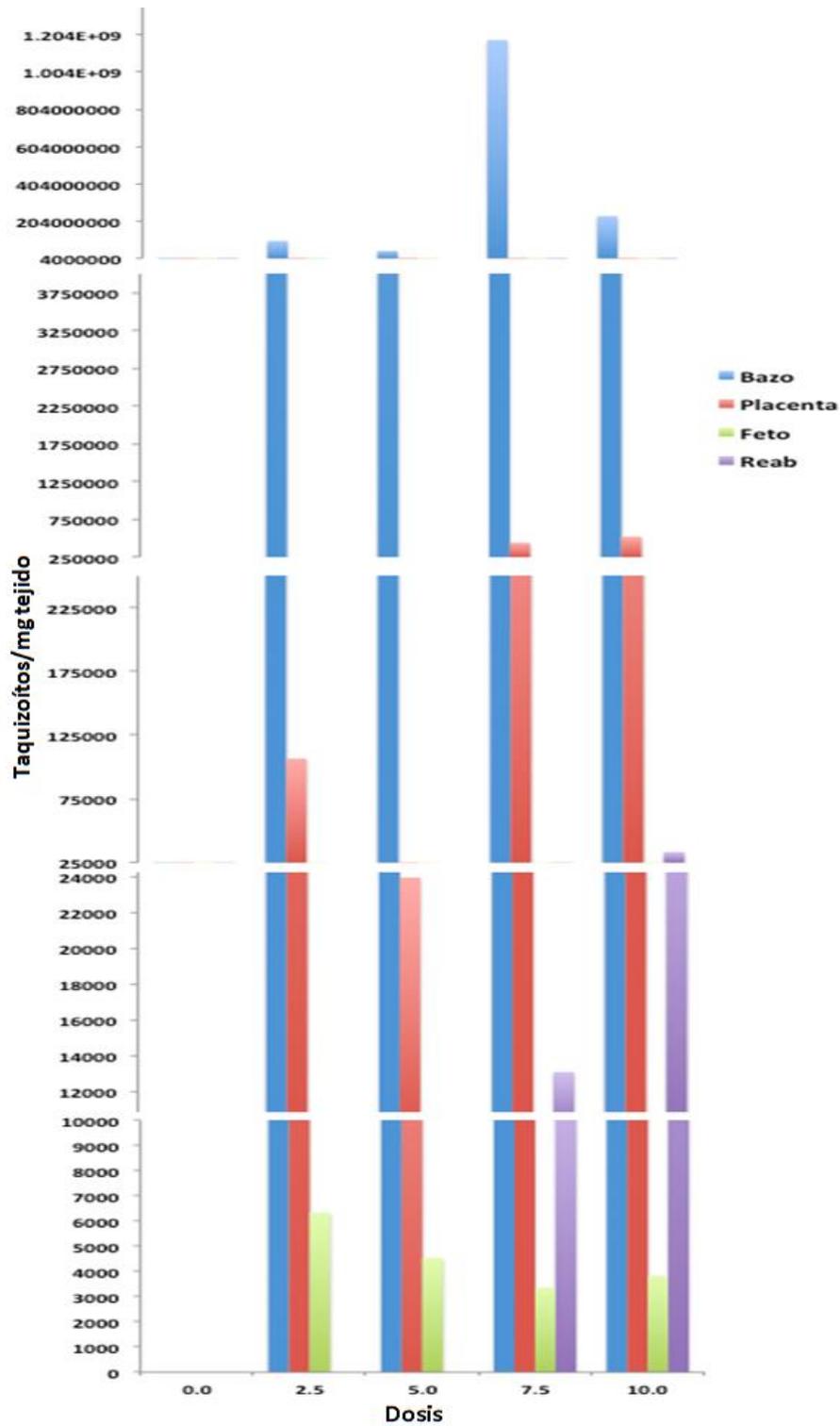


Figura 4. Relación entre la carga parasitaria en tejidos materno-fetales y la dosis de infección.

Cuadro 2. Determinación de la carga parasitaria por PCR en Tiempo Real

Dosis (millones de taquizoítos)	Ratona	Taquizoítos/mg tejido					% transmisión	
		Bazo	Placenta	Feto	Reab 1	Reab 2		Reab 3
0	1		0	0	0			
	2		0	0	0			0/3 (0%)
	3		0	0	0			
2.5	1	167,213,857	28,084	36,2812*				
	2	96,481,579	123,279	12,616				4/4 (100%)
	3		70,303	2,257				
5	1	629,147	126,243	4,143				
	2	863,470	12,569	1,937				4/4 (100%)
	3	127,160,554	967	3,225				
7.5	1	3,371,462,045	187,764	8,005	2,318	813	588	fetos 6/6 (100%)
	2	131,196,573	1,101	1,134				
	3	26,432,412	698,420	1,346	48,681			reabsorciones 4/4 (100%)
10	1	230,101,512	542,890	707				fetos 3/3 (100%)
	2	57,963,212	601,309	4,687				reabsorción 1/1 (100%)
	3		618,518	4,209	33,076			

* Producto abortado 48 horas después de la infección.

** Producto con muerte fetal.

2. Hallazgos histopatológicos

Siguiendo los criterios establecidos (ver Anexo 1), se revisaron secciones representativas de bazo de las diferentes ratonas de los grupos estudiados (Figura 5). Se observó en general, la pérdida de la población linfoide en grado y distribución variable, siendo leve en las dosis menores y de moderadas a severas en los grupos inoculados con las mayores dosis. Los centros germinales presentaron disgregación tisular con focos de necrosis e infiltrado de neutrófilos,

en diferente grado y distribución. Así mismo, se observaron focos de necrosis (peri e intralesionales). En algunas secciones de tejido, se observaron estructuras de forma redondeada y arqueada, libres y en conjunto (racimos o rosetas), compatibles con taquizoítos de *T. gondii*, tanto libres como agrupados. Los bazos de las ratonas infectadas con las dosis de 7.5 y 10 millones de parásitos, presentaron alteraciones en un 60 al 80% del parénquima. La severidad del grado de alteraciones en estos tejidos fue mayor, mostrando congestión, múltiples focos de necrosis y de infiltrado neutrofílico.

En las secciones de hígado, se apreciaron cambios similares en todos los grupos. Observándose focos de necrosis y de infiltrado linfocitario en grado y extensión variable. Así mismo, en los tejidos de las ratonas inoculadas con las dosis más bajas de 2.5 y 5 millones, los focos de necrosis podían o no estar acompañados de estructuras redondeadas y arqueadas compatibles con los taquizoítos de este parásito.

En contraste con los órganos de las ratonas inoculadas con las mayores dosis (7.5 y 10 millones de parásitos) que mostraron zonas de necrosis multifocal, con infiltrado linfocitario en mayor grado de severidad y extensión, abarcando más del 60% del parénquima hepático. De igual manera, más del 60% de los focos necróticos de estos últimos grupos presentaron estructuras de morfología compatible con taquizoítos a la periferia. En la totalidad de las secciones de hígado evaluadas, se lograron observar estructuras sugerentes a taquizoítos libres, en la luz de sinusoides hepáticos y vasos sanguíneos de mayor calibre, dentro de hepatocitos e intralesionales. Así mismo, se observaron parásitos dentro

de la vacuola parasitófora y agrupados en rosetas o racimos.

El grado y la severidad de las alteraciones observadas en los órganos maternos, ligadas a la presencia de estructuras parasitarias o sugerentes de las mismas, fueron los criterios utilizados para confirmar la infección materna. Según estos criterios, el 100% de las ratonas gestantes fueron infectadas, y los parásitos no solo fueron capaces de invadir los diferentes tejidos maternos, sino que incluso se replicaron, provocando lesiones características de infección por *T. gondii*.

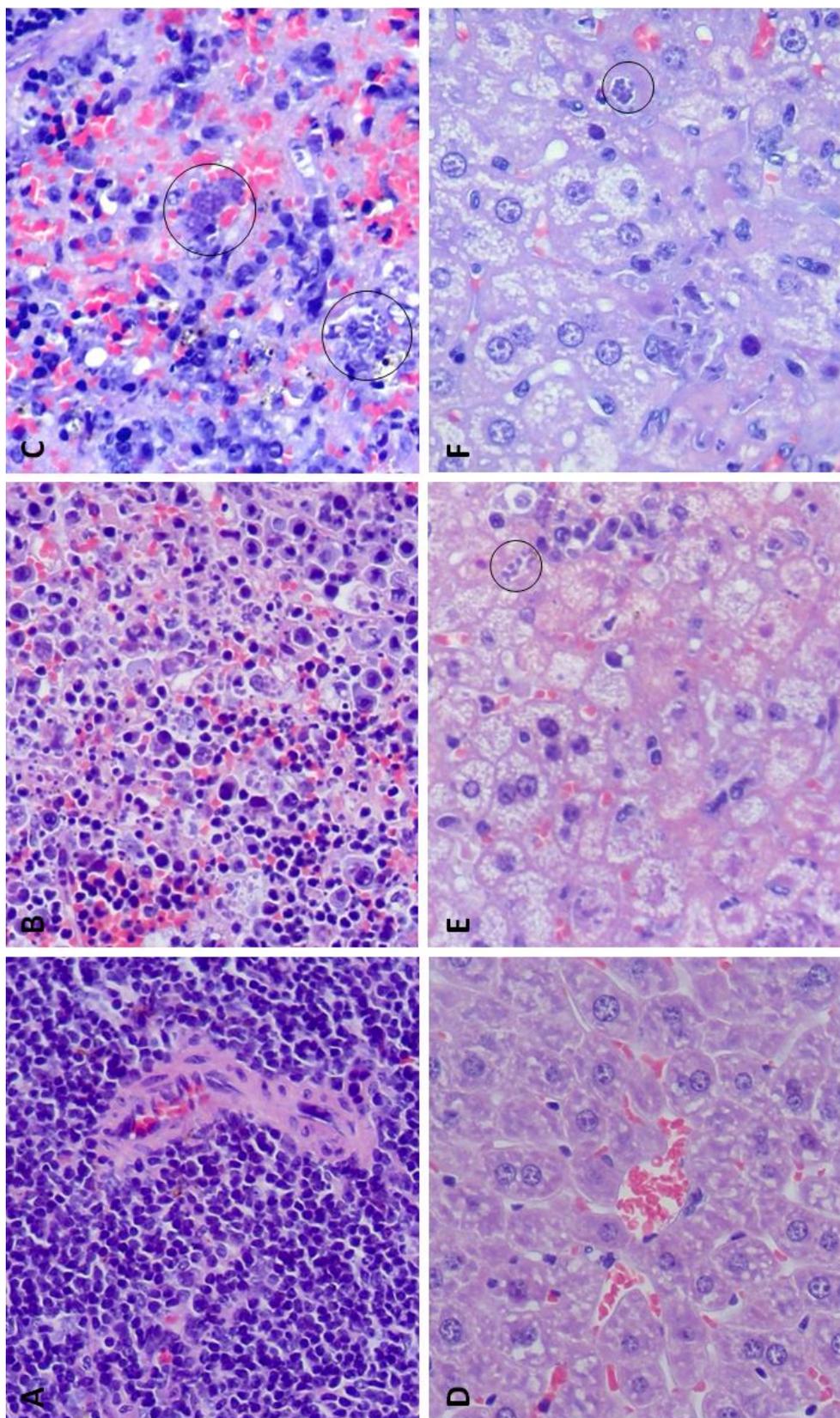


Figura 5. Replicación de *T. gondii* en tejidos maternos. Microfotografías de cortes de tejidos esplénicos (A-C) y hepáticos (D-F), procedentes de ratonas gestantes BALB/c, inoculadas con 0 (A, D), 2.5 (B, E), y 10 (C, F) millones de taquizoítos. Se observa la diferencia entre los tejidos del control y las demás dosis. B) Se muestra la disminución de la población linfocítica. C) Se observa mayor severidad de necrosis y pérdida franca de la población linfocítica, así mismo se aprecian parásitos agrupados y en replicación (círculo). E) se observan estructuras compatibles con taquizoítos de *T. gondii* en replicación (círculo). F) Estructuras parasitarias en replicación agrupadas en racimo (círculo). H & E 40x

En el caso de los órganos materno-fetales, se revisaron secciones representativas de placenta; se observaron alteraciones de grado y distribución variable. En comparación con las placentas de las ratonas pertenecientes al grupo control, los tejidos de las ratonas inoculadas con las dosis menores (2.5 y 5 millones de parásitos), presentaron alteraciones ligeras principalmente, y ocasionalmente moderadas, mostrando cambios que van desde la disgregación de tejidos a focos leves de congestión. Sin embargo, en los tejidos placentarios de las ratonas inoculadas con las dosis mayores (7.5 a 10 millones de taquizoítos), los focos de congestión y las áreas de necrosis fueron de mayor extensión (zonales) y gravedad (moderados a severos). En la totalidad de las secciones de tejidos placentarios evaluados se observaron estructuras de talla y morfología compatible con los taquizoítos de *T. gondii*, agrupados en rosetas y racimos dentro de una vacuola parasitófora o libres entre los diferentes tipos de células placentarias.

Por otra parte, se revisaron los cortes de feto, encontrándose alteraciones sutiles entre los tejidos de algunos de los productos de los diferentes grupos estudiados. En los fetos de los grupos control, se observó que los tejidos tuvieran una conformación celular densa y compacta (sin espacios intercelulares). Sin embargo, esta característica se perdió a medida que las dosis de parásitos aumentaron, lo que dio como resultado que el corazón, hígado, pulmones y bazo se observaran disgregados y con menor densidad celular. Así mismo, en los fetos provenientes de hembras inoculadas con las dosis más bajas (2.5 y 5 millones) presentaron alteraciones ligeras como disgregación celular y pérdida de la arquitectura tisular (células aumentadas de tamaño), en comparación con los fetos

de las hembras inoculadas con las dosis más altas (7.5 y 10 millones), donde los fetos se observaron menos desarrollados y sus órganos presentaron una menor densidad celular. Así mismo, uno de los fetos de la dosis más alta (10 millones) presentó signos severos de degeneración tisular.

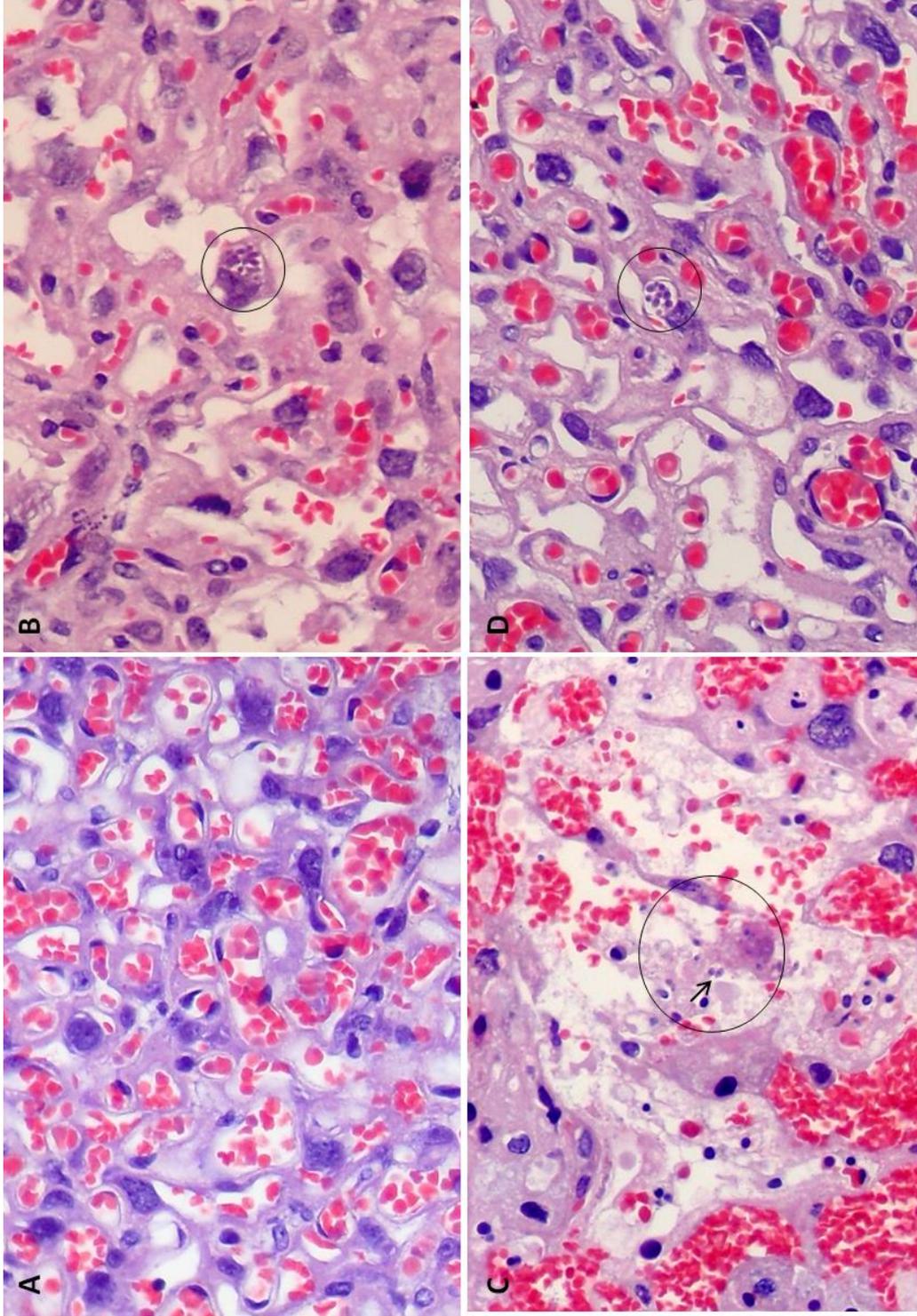


Figura 6. Replicación de *T. gondii* en placenta. Microfotografías de placentas provenientes de ratonas inoculadas con 0 (A), 2.5 (B), 5.0 y 7.5 (C) millones de tachizoitos. B) y D) Se observan estructuras parasitarias agrupadas en racimo (círculo). C) Se observa la pérdida de la arquitectura tisular y en la periferia de esta lesión se muestran dos estructuras compatibles con los tachizoitos de *T. gondii* (círculo), y zonas de congestión severa. Tinción de H & E 40x.

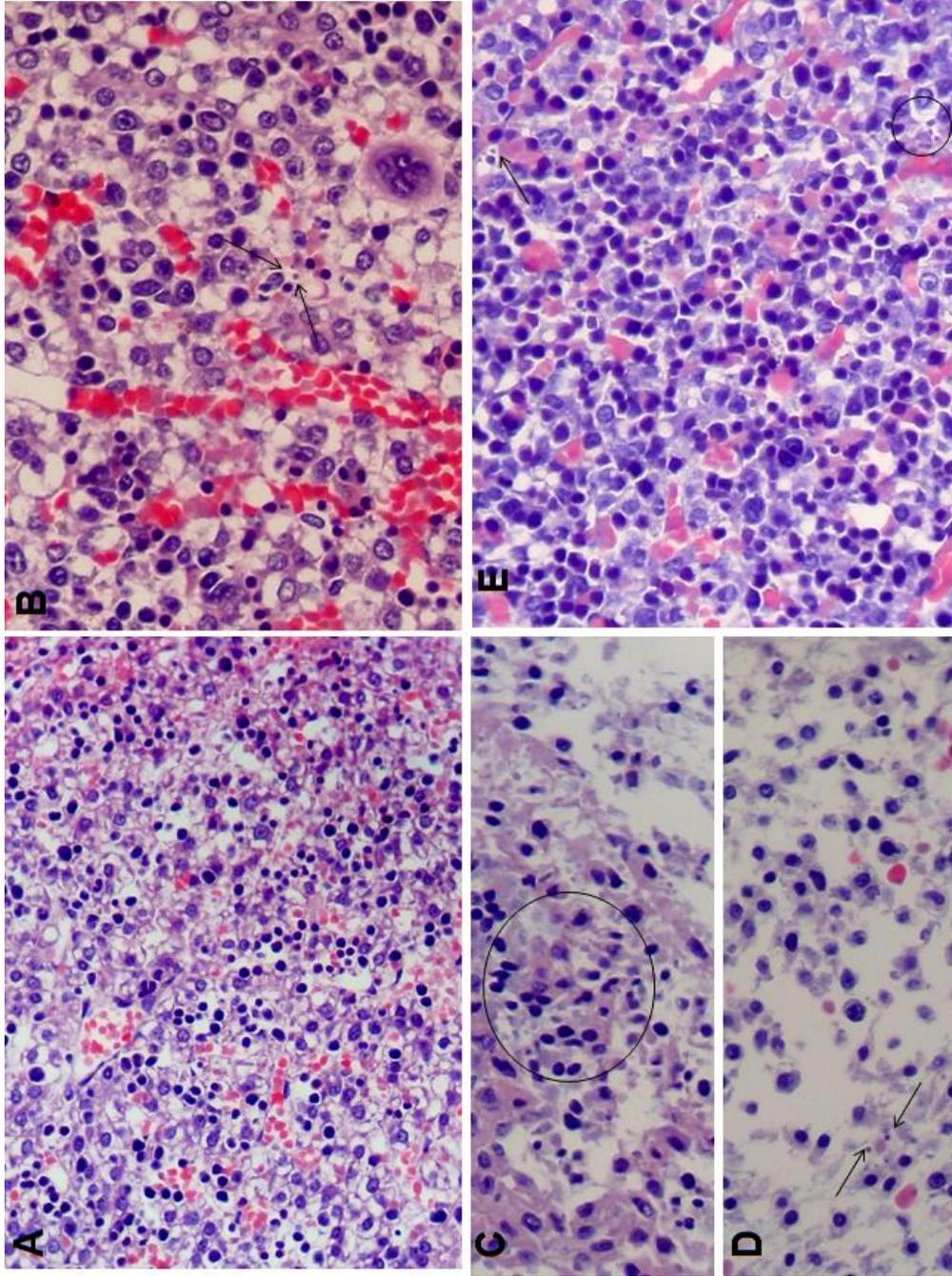


Figura 7. Presencia de *T. gondii* en tejidos fetales. Microfotografías de secciones de tejido hepático fetal, proveniente de hembras infectadas con 0 (A), 2.5 (B), 5 (D) y 10 (E) millones de parásitos. B) Estructuras sugerentes a taquizoítos de (Punta de flechas), así como pérdida de la densidad celular. C) Miocardio de feto (5 millones de taquizoítos) se observa desorganización en las fibras musculares y pobre densidad celular. D) Pérdida de la arquitectura tisular y pobre densidad celular. Tinción de H &E 40x.

Tomando en cuenta los criterios de interpretación para los estudios histopatológicos, se construyó una gráfica de la relación entre el grado de daño en los órganos materno-fetales y la dosis inoculada, donde se muestra que, el grado de daño observado en los bazos fue similar independientemente de la dosis inoculada, siendo el bazo, el órgano con mayor daño. De la misma manera, ocurre con los tejidos hepáticos, donde se demuestra que desde las dosis bajas hay células inflamatorias, necrosis y parásitos en grado parecido a las dosis más altas.

En cuanto a las placentas, el grado de daño fue incrementándose conforme la dosis aumento, sin embargo, el incremento fue ligero, y en las hembras inoculadas con la dosis de 5 millones se observó una disminución del daño en comparación con las otras dosis. Por otro lado, la cantidad de parásitos observados en los cortes de placenta fue similar entre la menor y mayor dosis. En cuanto a los fetos, la cantidad de células inflamatorias y la severidad de la necrosis fueron parecidas entre individuos inoculados con la misma dosis, mientras que la cantidad de parásitos observados fue mayor conforme la dosis aumentaba. (Figura 8).

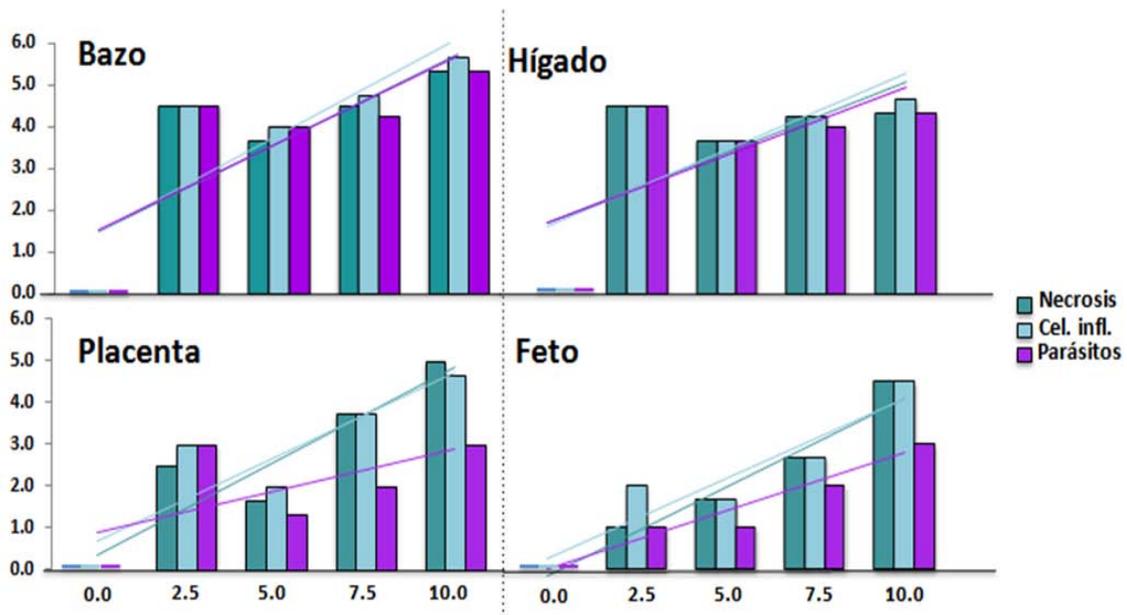


Figura 8. Relación entre el grado de daño y la dosis inoculada en los tejidos materno-fetales.

2.1 Inmunohistoquímica

Se evaluaron 12 casos (órganos maternos y unidades feto-placentarias) por inmunohistoquímica, de los cuales 11 fueron inmunopositivos. (Anexo 1. Criterios para la interpretación de pruebas de laboratorio). Los órganos fetales donde se observaron estructuras parasitarias inmunopositivas fueron corazón, pulmones, hígado, bazo, páncreas e intestino; confirmando así, que el daño causado en los órganos maternos, placenta y feto se debe a la presencia de los taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, así mismo las estructuras parasitarias se observaron en forma libre en el parénquima hepático y esplénico, así como en la luz de los vasos sanguíneos. En ninguno de los casos se observaron taquizoítos en replicación.

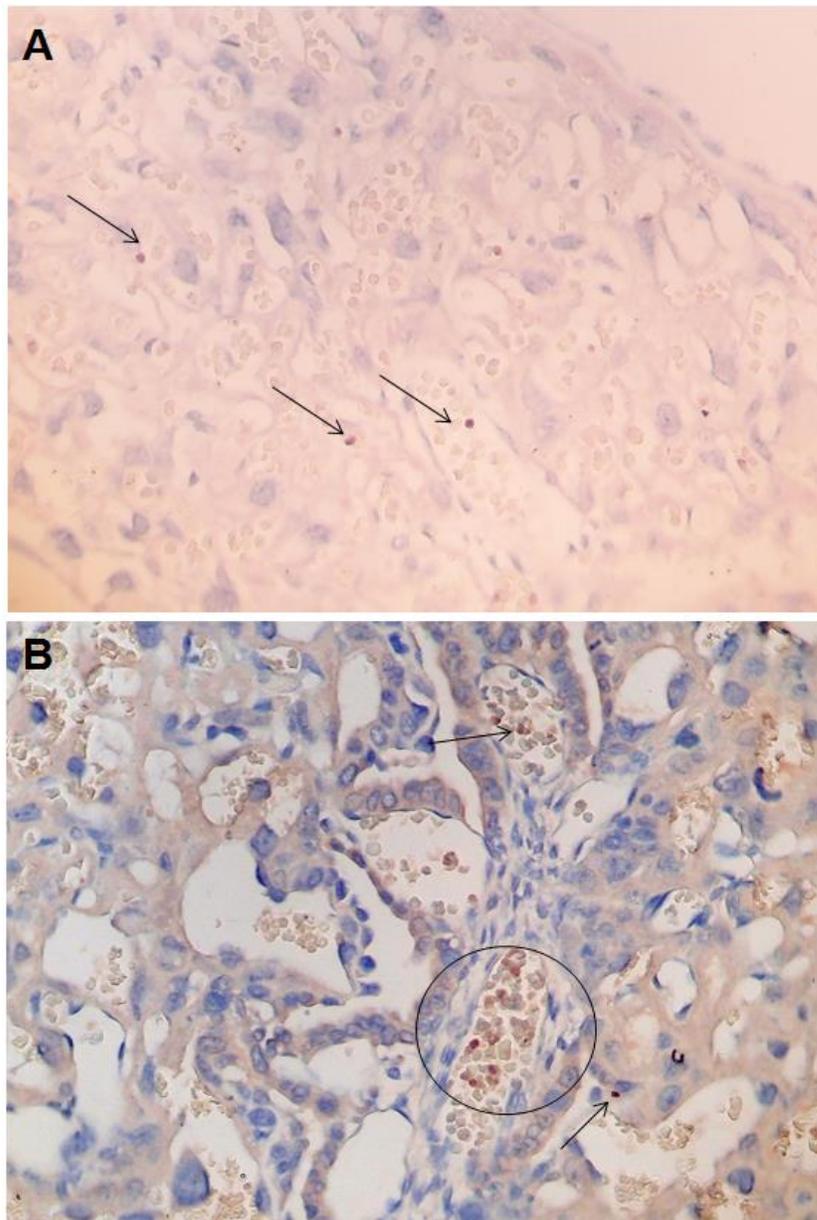


Figura 9. Inmunohistoquímica de placenta. Microfotografía de inmunohistoquímica para *T. gondii*, de secciones de placentas provenientes de hembras infectadas con 5 (A) y 10 (B) millones de tachizoítos. A) Se observan múltiples estructuras inmunopositivas entre los trofoblastos del laberinto (punta de flecha). B) Estructuras inmunopositivas en canales vasculares (círculo y punta de flechas). 40x

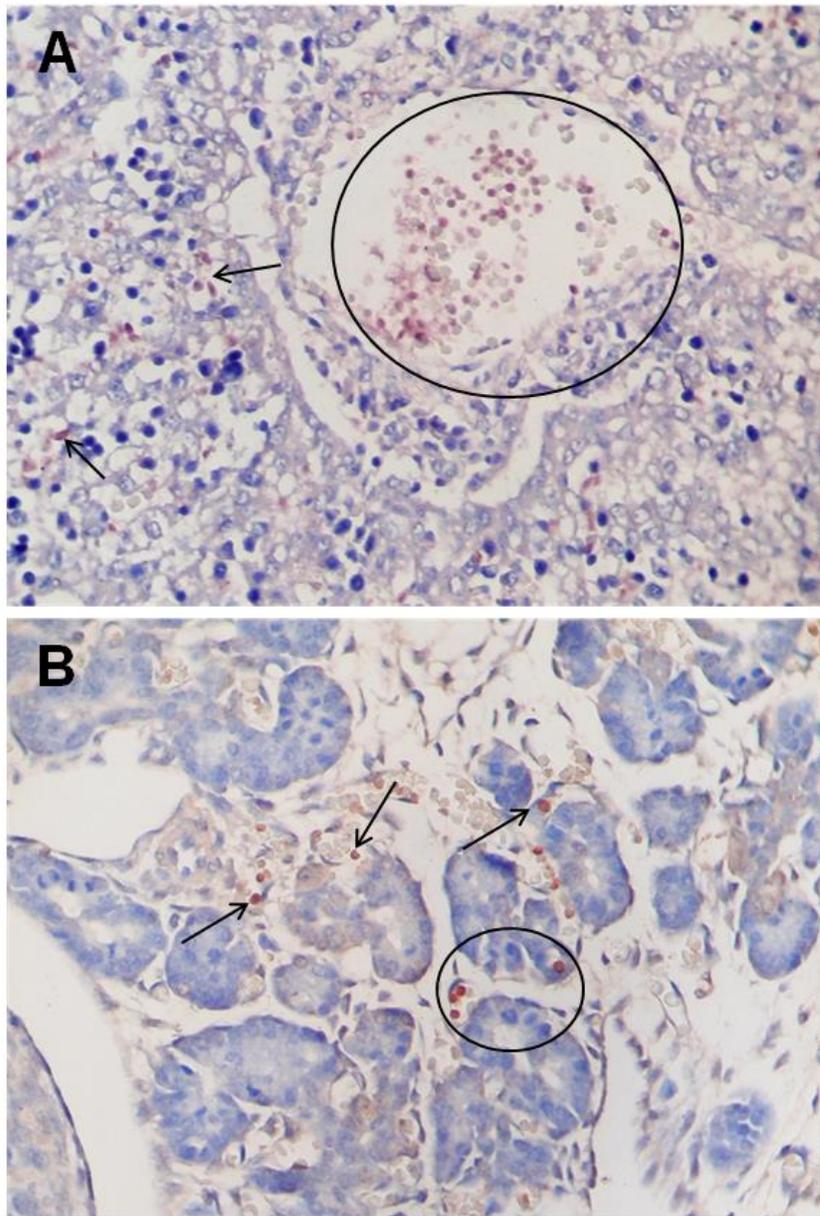


Figura 10. Inmunohistoquímica de tejido fetal. Microfotografía de inmunohistoquímica para *T. gondii* de secciones de hígado (A) y páncreas (B) de fetos inoculados con 5.0 y 7.5 millones de taquizoítos respectivamente. A) Se observan múltiples estructuras inmunopositivas entre las células hepáticas y en la luz de un vaso sanguíneo (punta de flechas y círculo). B) Se muestran algunas estructuras parasitarias inmunopositivas dentro y entre los islotes pancreáticos (flechas y círculo). 40x

Así mismo, se encontraron dos hembras que tuvieron reabsorciones asociadas a *T. gondii*. Los cuernos uterinos no parecían gestantes en la evaluación post-mortem, sin embargo no conservaban el aspecto de un útero sin gestación, por esta razón se decidió evaluar secciones de ambos cuernos uterinos por histopatología. Encontrándose estructuras compatibles con *T. gondii* en la mucosa y submucosa del útero.

La presencia del parásito se confirmó por inmunohistoquímica, dando como resultado, que las estructuras parasitarias encontradas en mucosa, submucosa y el tejido en reabsorción tuvieran marcaje inmunopositivo (Figura 11).

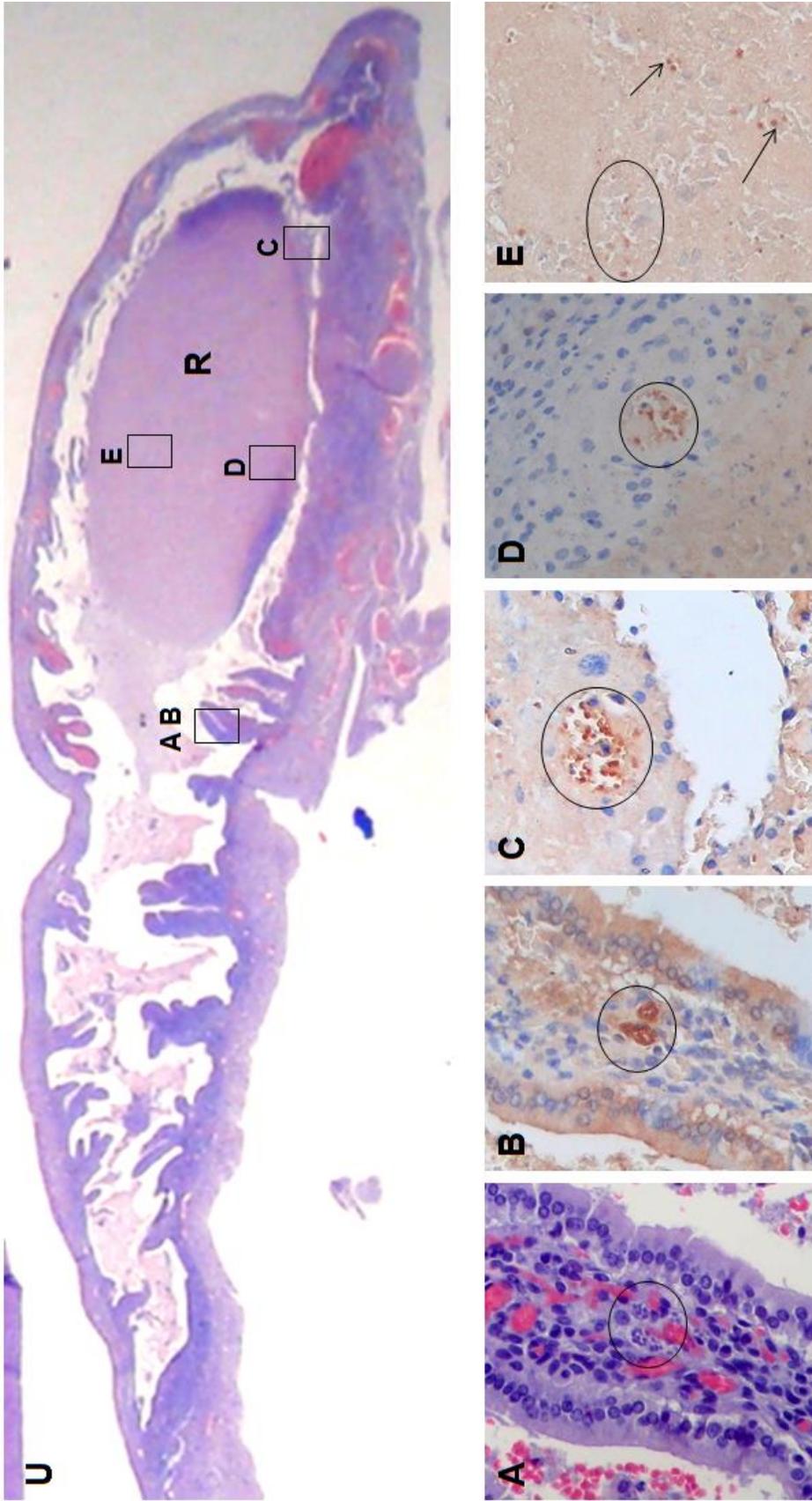


Figura 11. Útero con reabsorción debido a replicación de *T. gondii*. Microfotografías de secciones del cuerno uterino (U 80x). A) Mucosa y submucosa teñidas con H&E B) Inmunohistoquímica positiva de la misma sección. En ambas figuras, se muestran taquizoitos de *T. gondii* en replicación y agrupados (círculos). C) Taquizoitos agrupados en la periferia del tejido en reabsorción (R) y en el centro (E). Figuras B-E imágenes provenientes de inmunohistoquímicas para *T. gondii*, 40x. En U, se muestran las zonas (cuadros) de donde fueron tomadas las microfotografías.

VII. DISCUSIÓN

Hasta el momento, no hay modelos animales de la toxoplasmosis congénita que estudien la relación entre la transmisión y el daño fetal durante los diferentes tercios de la gestación. La mayoría de los estudios, se avocan a reproducir la transmisión vertical en algún tercio en particular, o reproducen la infección en los tres tercios de gestación sin considerar el daño fetal, ya que tienen como objetivo evaluar otros aspectos como, por ejemplo: si existe protección a la infección congénita cuando la madre es infectada antes y/o durante la gestación. O bien, para probar la eficacia de fármacos que pudieran servir como agentes terapéuticos para evitar la transmisión vertical de *T. gondii* (Fux et al., 2000).

Teniendo en cuenta, que en el Laboratorio de Inmunología Experimental, se ha estandarizado un modelo de toxoplasmosis congénita en ratonas BALB/c infectadas con diferentes dosis de parásitos de la cepa ME49 durante los dos primeros tercios de la gestación (Vargas-Villavicencio, datos no publicados). El propósito de este trabajo fue evaluar el porcentaje de transmisión vertical y el grado de daño fetal en ratonas de la cepa BALB/c infectadas por *Toxoplasma gondii*, durante el tercer tercio de gestación.

La toxoplasmosis congénita puede causar daño fetal no sólo en los seres humanos, sino también otras especies animales como en ovejas, cabras, cerdos, conejos, así como otros animales domésticos. Además también es considerada como una enfermedad de importancia económica significativa para la industria ganadera, ya que en el Reino Unido se ha estimado que 1.2 hasta 2.2% de los 16

millones de ovejas que sufren de aborto se debe a infección por *T. gondii* (Bennett et al., 1999). Por lo tanto, la toxoplasmosis congénita no es sólo un problema de salud pública grave en los seres humanos, sino que también tiene implicaciones en el área de producción y salud animal (Gandahusada, 1991).

En este estudio, se encontró que el parásito se transmitió al 100% de los fetos estudiados por PCR, lo cual sobrepasa lo esperado, ya que en los seres humanos se presenta del 60 al 90% de transmisión (Dunn et al., 1999). Por otro lado, el grado de daño fue mayor en los bazo de las madres y los fetos fueron los menos alterados, lo cual guarda una estrecha relación con las dosis inoculadas, ya que los órganos mayormente afectados fueron aquellos que tuvieron las mayores cargas parasitarias, con la excepción de una hembra que fue inoculada con 5 millones de taquizoítos y cuya determinación de carga parasitaria resultó ser menor incluso a la de hembras infectadas con la dosis más baja (2.5 millones). Este hallazgo fue confirmado por histopatología, pues esta hembra no solo fue la que presento menor daño, sino que también fue el único caso donde no se pudo comprobar la presencia de taquizoítos de *T. gondii*, en las secciones de placenta y feto mediante inmunohistoquímica. Esto pudo deberse posiblemente a inconsistencias en el manejo (inoculación, viabilidad, etc).

Estos resultados son novedosos ya que actualmente, hay pocos estudios que reportan las cargas parasitarias durante la infección congénita (He et al., 1997; Rico-Torres et al., 2012). Otro hallazgo interesante, fue la correlación positiva entre la cantidad de taquizoítos inoculados y el grado de daño encontrado en tejidos fetales por H y E. En la literatura, se ha descrito que además del genotipo del

parásito, la vía de inoculación y la inmunología del huésped, el número de parásitos con la que se infecta un individuo influyen en la presentación del cuadro clínico (Dubey, 2010). Datos que coinciden con este estudio, fue el hallazgo de un feto abortado a las 48 horas posterior a la infección; el cual presentó una mayor carga parasitaria en comparación con su placenta. Sin embargo, en la mayoría de los fetos se cuantificaron menos parásitos que en sus respectivas placentas, ya que la placenta es una barrera biológica eficiente para prevenir la transmisión del parásito al feto (Pezerico, 2009; Barragan, 2003).

En los órganos fetales a pesar de que se observaron taquizoítos, en ninguno de los fetos se encontraron parásitos en replicación, esto sugiere que la invasión al feto fue reciente.

Por otro lado, el grado de daño fue mayor en el grupo inoculado con la dosis más alta comparado con los otros grupos, sin embargo, en este modelo no se evaluó si las lesiones observadas comprometían el desarrollo normal de los fetos al nacimiento y posterior a este, puesto que se les aplicó la eutanasia a los 18 días de la gestación. De acuerdo con los datos aportados por Wang et al., (2010) se sugiere que, en la infección durante el tercer tercio de la gestación, los fetos presentan menos alteraciones en comparación con aquellos fetos infectados durante las primeras etapas de la gestación. De igual manera Dunn et al (1999) reporta que los hijos de mujeres que se infectan durante el último tercio del embarazo, presentan cuadros clínicos de menor gravedad e incluso son asintomáticos al nacimiento.

Los resultados de este trabajo, no sólo proporcionan datos útiles para una

mejor comprensión de los efectos provocados en los fetos que se infectan durante el último tercio de la gestación, sino también para entender mejor la transmisión vertical en otros huéspedes (mamíferos incluyendo seres humanos). Así mismo, la información generada en este estudio servirá para comparar los datos obtenidos en los dos tercios previamente estudiados (datos sin publicar) y comprender de mejor manera la dinámica de transmisión durante toda la gestación en este modelo animal, lo que permitirá conocer otros aspectos importantes de la infección congénita en humanos y otras especies animales.

Esta información adquiere relevancia desde el punto de vista clínico, para la toma de decisiones en el seguimiento terapéutico que se le brindará a mujeres que adquieren la infección en cualquier trimestre de la gestación.

En conclusión, en este trabajo se demostró que la transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* en el último tercio de gestación de ratonas BALB/c, es mayor al 80% de acuerdo con los datos obtenidos por inmunohistoquímica y PCR en tiempo real.

Como perspectivas se determinará si existe relación entre los abortos y las reabsorciones con respecto a una respuesta inmune materna exacerbada o la infección fetal.

VIII. ANEXO 1

1 Criterios para interpretar las técnicas de laboratorio.

1.1 Ensayo de Presencia/Ausencia por PCR en tiempo real

La necesidad de tener un método rápido, específico y sensible que demuestre la presencia directa del parásito, para el diagnóstico y tratamiento temprano, ha sido motivo del desarrollo de técnicas moleculares, las cuales han permitido el estudio de la amplificación del genoma de *T. gondii*. (Jhonson, 1986) la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que tiene como objetivo la síntesis in vitro de secuencias específicas de DNA, basada en la replicación del DNA de los organismos por la DNA polimerasa.

Existen tres pasos principales en la PCR, los cuales son repetidos en 30 a 40 ciclos, dependiendo de las características de la secuencia o gene que se vaya a amplificar (Sambrook et al., 2001; Rico-Torres, 2005).

- a) Desnaturalización del DNA doble cadena.
- b) Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.
- c) Extensión por actuación (acción) de la DNA polimerasa (Figura 12).

La gran demanda de un método confiable, reproducible, sensible y altamente específico, para la cuantificación de DNA/RNA, marco el surgimiento de los ensayos de PCR en tiempo real, los cuales han conseguido una amplia aceptación debido a su rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y riesgo reducido de contaminación, ya que la generación del amplicón se puede observar

conforme la amplificación progresa. La detección de la reacción se lleva a cabo mediante la medición de fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación y detectada por el sistema óptico de detección. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado.

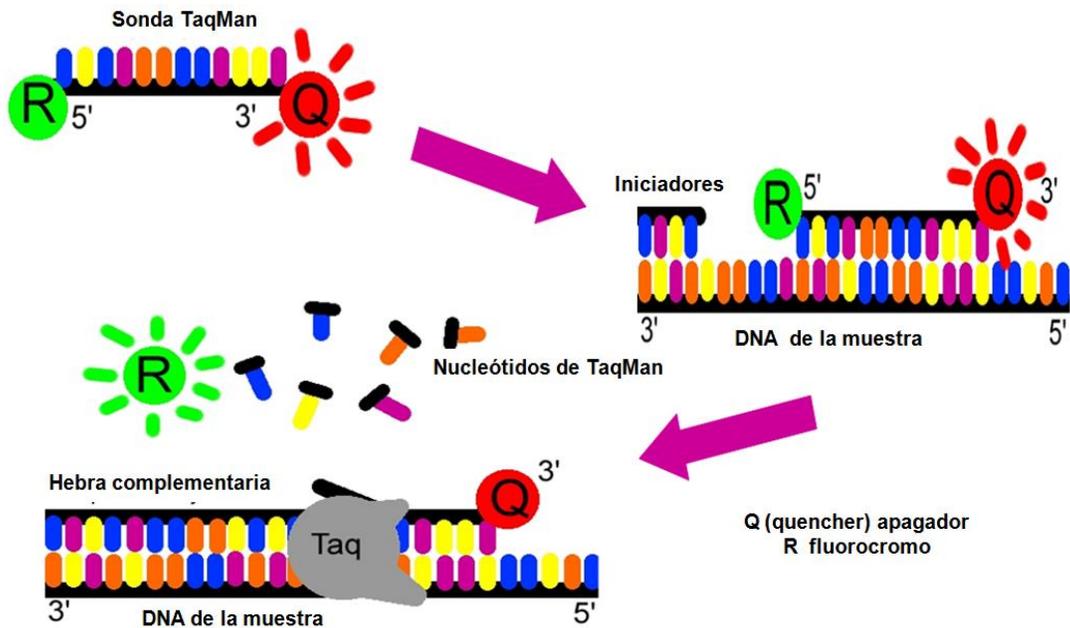


Figura 12. Esquema del fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Tomado y modificado de Getting Started Guide. Applied Biosystems StepOne.

Mediante este método podemos realizar ensayos cualitativos y cuantitativos. Dentro de los ensayos cualitativos, tenemos el ensayo de **Presencia/Ausencia**, cuyo objetivo es determinar si el DNA de un patógeno se encuentra presente o ausente en una muestra problema. Para llevar este ensayo, se requiere tener en cuenta los siguientes conceptos:

- **IPC:** Control Interno de Amplificación, monitorea la reacción de PCR, detectando la presencia de inhibidores en cada muestra de DNA, si no

amplifica durante la reacción.

- **Umbral de detección del IPC:** este valor es calculado por el software StepOne 2.2 del equipo, a partir de la intensidad de fluorescencia del control negativo bloqueador del IPC, el cual contiene un inhibidor de amplificación del IPC.
- **Umbral de detección del gen *B1* de *T. gondii*:** Se calcula a partir de la intensidad de fluorescencia registrada a partir del control negativo de IPC, el cual no contiene el inhibidor de amplificación del IPC.

Para el análisis de los datos, se consideran los registros de intensidad de fluorescencia tanto del IPC y como del gen *B1* de *T. gondii* de cada muestra (Figura 12).

Cuadro 3. Criterios para determinar la presencia de DNA de *T. gondii* en una muestra problema con un ensayo de Presencia/Ausencia.

		<i>Toxoplasma gondii</i>	
		+	-
IPC	+	Positivo	Negativo
	-	Positivo	Dudoso

- **Presencia:** la señal de amplificación de *T. gondii* se sitúa por arriba de su umbral de detección y la muestra se considera **positiva** (independientemente de la intensidad de la señal del IPC, debido a la competencia de reactivos).
- **Ausencia:** la señal de amplificación de *T. gondii* está por debajo de su umbral y si la intensidad del IPC se encuentra por encima de su umbral, el DNA del

parásito se encuentra ausente, por lo tanto, la muestra se considera negativa.

- **Dudoso:** la señal de amplificación de *T. gondii*, y del IPC se encuentran por debajo de los umbrales de detección correspondientes.

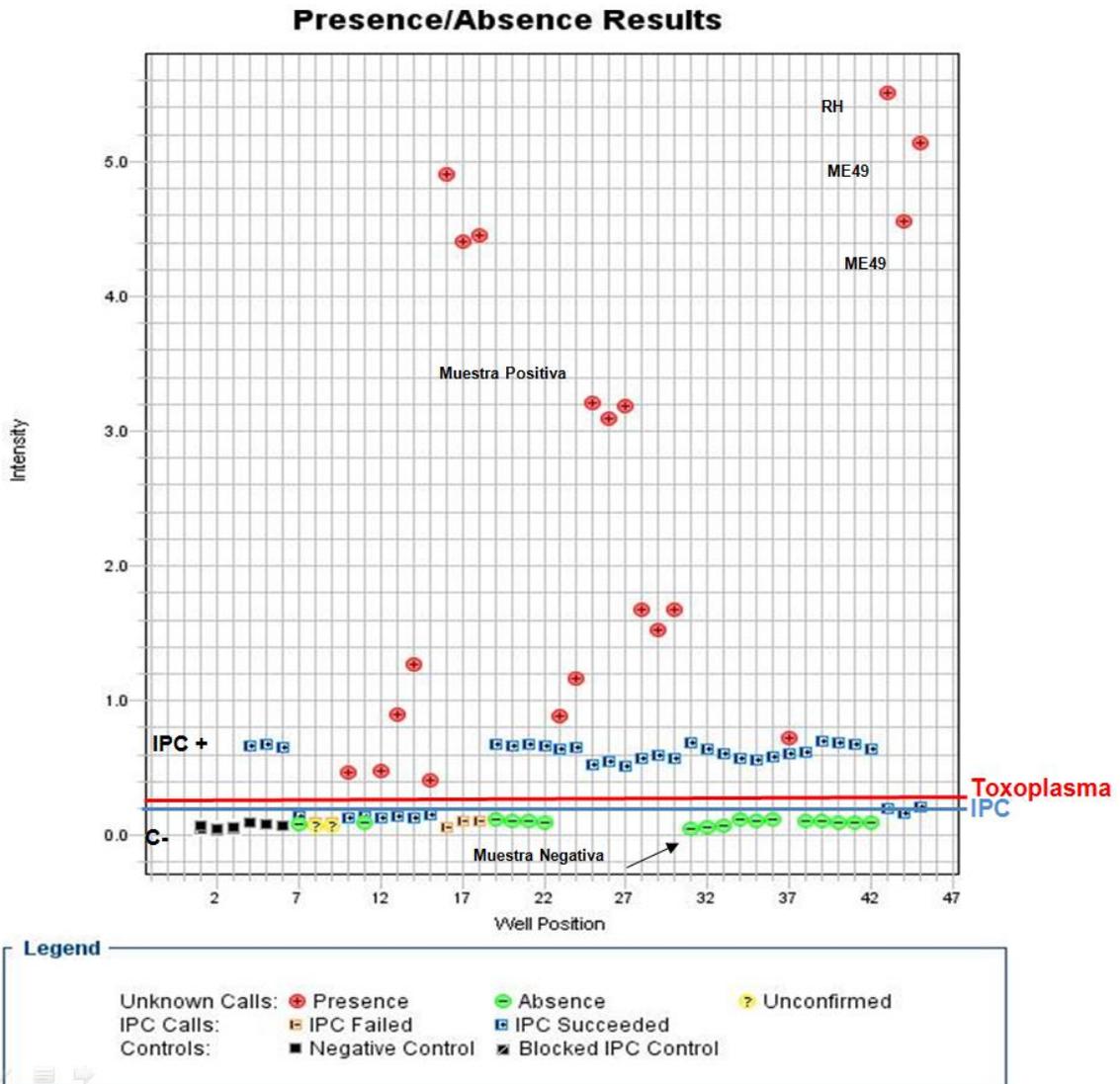


Figura 13. Ejemplo de una gráfica de Presencia/Ausencia por PCR en tiempo real. Línea azul: umbral de detección del IPC; Línea roja: umbral de detección de *Toxoplasma gondii*; C-: Control negativo inhibidor del IPC; IPC +: Control negativo del IPC sin el inhibidor de la amplificación; Muestra positiva: la presencia del DNA de *T. gondii* y la amplificación del IPC se encuentran por encima de los umbrales de detección; Muestra negativa: el DNA *T. gondii* se encuentra ausente y la amplificación del IPC se encuentra por encima del umbral de detección; Cepas RH y ME49: DNA's de cepas referencia de *T. gondii*.

1.2 Ensayo de cuantificación por PCR en tiempo real

Dentro de las aplicaciones cuantitativas están la cuantificación absoluta y la relativa. El modelo de cuantificación absoluta, permite determinar el número exacto de moléculas de DNA presentes en una muestra determinada a partir de una curva estándar, utilizando una serie de estándares de concentraciones conocidas.

Para realizar una interpretación de los valores proporcionados por el software del equipo, es necesario tener presentes los siguientes conceptos:

- I. **Pendiente y valores de eficiencia de amplificación de la pendiente:** la eficiencia de la amplificación es calculada usando la relación lineal de la curva estándar. La pendiente cercana al valor de -3.3, indica una eficiencia de amplificación del 100% (Eff%).
- II. **Factores que afectan la eficiencia de la amplificación:**
 - Cantidades del rango estándar: para tener una eficiencia precisa, se utiliza un rango dinámico de 5 a 6 logaritmos (10^0 a 10^6).
 - Número de replicas de cada punto de la curva estándar: se deben realizar dos o más replicas que disminuyan los errores de pipeteo.
 - Inhibidores de PCR: pueden reducir la eficiencia de la reacción de amplificación.
- III. **Valores R^2 (Coeficientes de correlación):** un valor de 1.0 indica una perfecta relación entre la regresión lineal y cada Ct de la curva estándar.
- IV. **Valor de Ct:** es el número de ciclos de la PCR en el cual el nivel de fluorescencia alcanza el umbral de detección de cada muestra problema. El

valor Ct ideal, debe ser > 8 y < 35 ; un valor menor a 8 indica que hay demasiado DNA blanco en la reacción; un valor mayor a 35 indica que hay poco DNA, por lo que valores mayores a 35 suelen tener desviaciones estándar elevadas.

La curva estándar (Figura 13) se construye a partir de valores de Ct obtenidos de cada estándar de la curva y graficados contra el logaritmo de la concentración correspondiente. Sobre esta curva se interpola directamente el valor de Ct de cada muestra problema para obtener su concentración, expresada en escala logarítmica, el valor del antilogaritmo nos proporciona el valor exacto en las unidades de medición de los estándares empleados para construir la curva. Se diseñaron diferentes curvas estandar, con los tejidos a evaluar (bazo, feto y placenta), y una cantidad conocida de parásitos de *T. gondii*. Las unidad de determinación de la carga parasitaria fue: numero de taquizoítos /mg de tejido.

Standard Curve

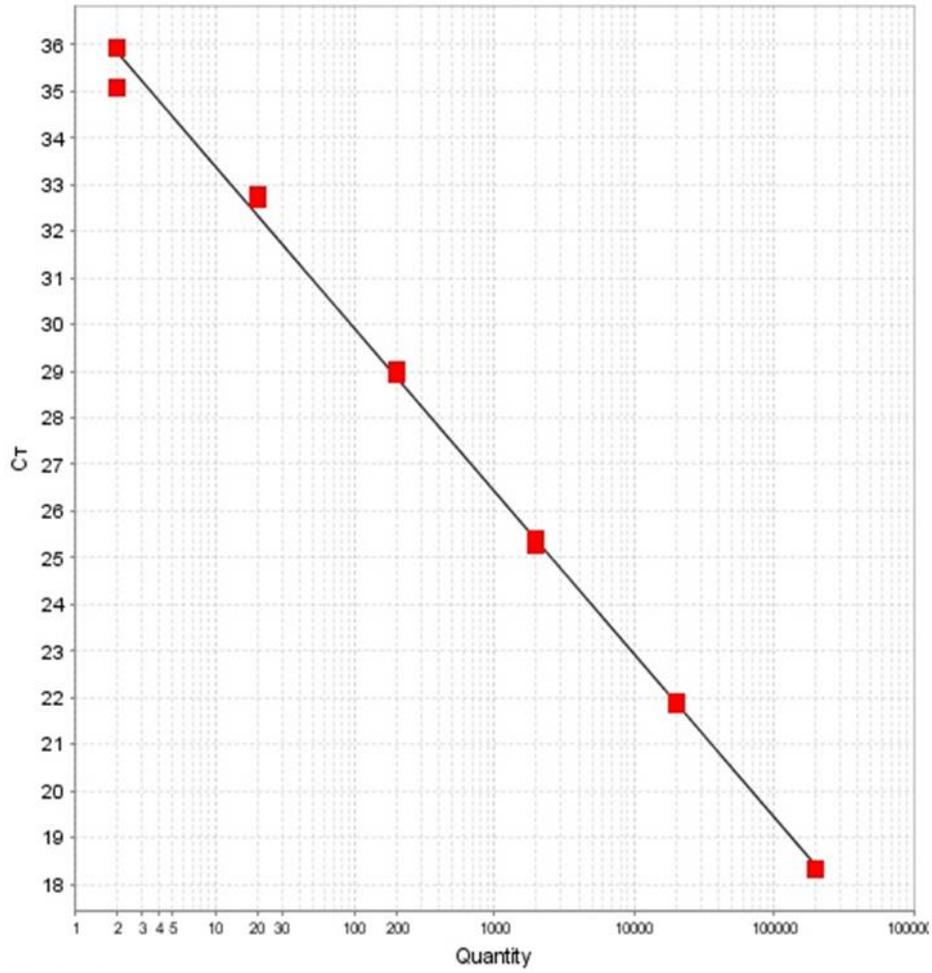


Figura 14. Ejemplo de una curva estándar elaborada con el resultado de las Ct obtenidos de cada estándar contra el logaritmo de la concentración.

1.3 Criterios para evaluar los estudios histopatológicos

Las secciones de tejido de HP como las de IHQ se revisaron por microscopia óptica, utilizando un microscopio Zeiss Axiostar Plus, documentándose representativamente las zonas evaluadas de cada corte con una cámara digital (Olympus Stylus Tough-8000). El análisis histológico se llevó a cabo utilizando el objetivo de 40x.

Se desarrolló un sistema de evaluación de las alteraciones que van del 0 al 6; como lo reporta Benevides et al. (2013), en donde se asignaron los siguientes valores: 0-2 leve; de 2-4 fue moderado y de 4-6 fue severo. (Cuadro 3)

ALTERACIÓN	MEDIDA	DESCRIPCIÓN
Necrosis	distribución	0-6 (0=sin cambios, 1-2=focal o multifocal, 3-4=zonal, 5-6=difusa)
	grado	0-6 (0=sin cambios, 1-2=insípida o leve, 3-4=moderada, 5-6=severa)
Infiltrado de células	grado	Agregados de células inflamatorias 0-6 (0=nada, 1-2=leve, 3-4=moderado, 5-6=abundante)
Presencia de taquizoítos	grado	Libres o en cúmulos 0-6 (0=ausencia, 1-2=pocos, 3-4=moderados, 5-6=abundantes)
Inmunohistoquímica		Inmunopositivo=1, No inmunopositivo=0

Cuadro 4. Categorización de las alteraciones observadas en los tejidos materno-fetales.

Para confirmar que las alteraciones observadas en las laminillas teñidas con H&E se debieron a la presencia de *T. gondii*, los tejidos también fueron

evaluados por inmunohistoquímica. Para considerar un caso como positivo a transmisión vertical; se evaluaron primeramente los órganos de las hembras (hígado y bazo) en busca de estructuras inmunopositivas que sustentaran la infección materna (Figura 15). Posteriormente se evaluaron las placentas, y finalmente los fetos. Solo los casos en donde los órganos maternos y fetales presentaron estructuras parasitarias con la marca inmunopositiva, bien definida fueron considerados positivos.

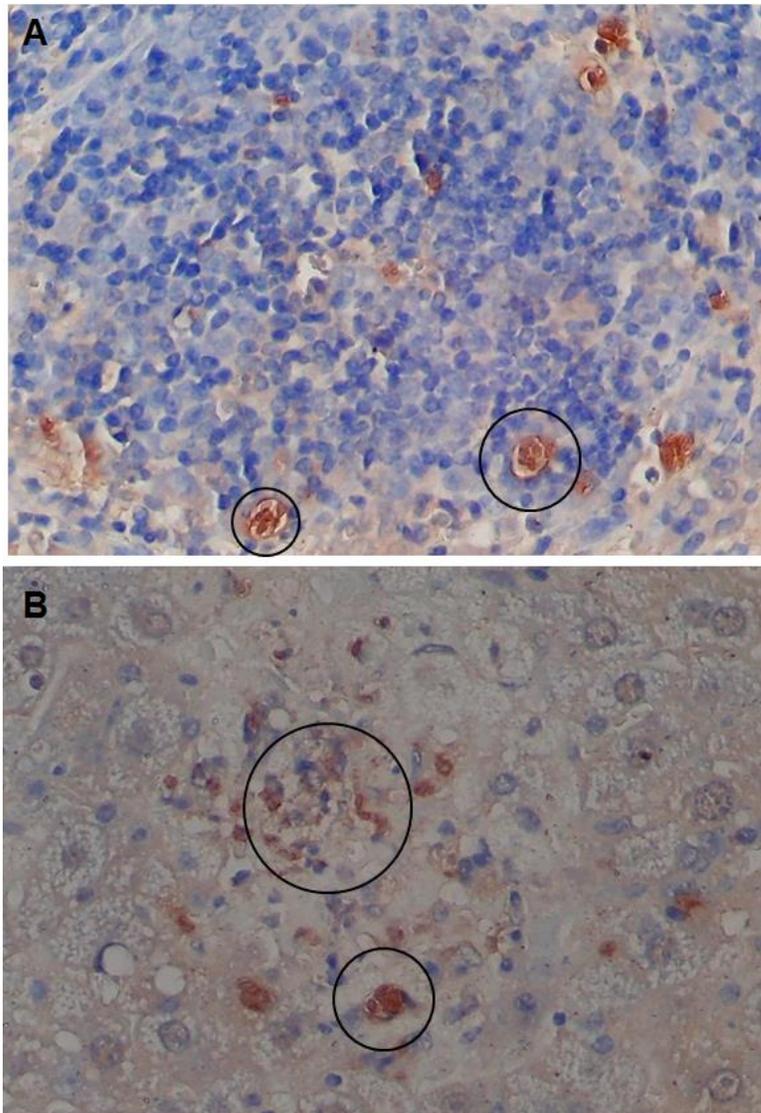


Figura 15. Inmunohistoquímica de tejidos maternos. Microfotografías de inmunohistoquímica para *T. gondii*, de secciones de bazo (A) e hígado (B) provenientes de hembras infectadas con 10 millones de taquizoítos. Se observan las estructuras parasitarias inmunopositivas (círculos). 40x

IX. REFERENCIAS

1. Ajzenberg, D.; Bañuls, A.L.; Su, C.; Dumetre, A.; Demar, M.; Carne, B. et al. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology, 34(10), 1185-1196.
2. Ajzenberg, D.; Bañuls, A.L.; Tibayrenc, M.; Dardè, M.L. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. International Journal for Parasitology, 32 (1), 27-38.
3. Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessières, M.H.; Thulliez, P.; Filisetti, D. et al. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 1, 186 (5), 684-9.
4. Alvarado-Esquivel, C.; Sifuentes-Alvarez, A.; Narro-Duarte, S.G.; Estrada-Martínez, S.; Díaz-García, J.H.; Liesenfeld, O. et al. (2006). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in a public hospital in northern Mexico. BMC Infectious diseases, 6, 113.
5. Ambroise-Thomas, P.; Petersen, E. (2000). Congenital toxoplasmosis. Scientific Background, Clinical Management and Control. Ed. Springer-Verlag Francia, 324.

6. Barragan, A.; Sibley, L.D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol*, 11 (9), 426-430.
7. Benevides, L.; Cardoso, R.C.; Milanezi, C.M.; Castro-Filice, L.S.; Barenco, P.V.C.; Sousa, R.O. et al. (2013). *Toxoplasma gondii* soluble Tachyzoite Antigen Triggers Protective Mechanisms against Fatal Intestinal Pathology in Oral Infection of C57BL/6 Mice. *Plos one*, 8 (9)
8. Bennett, R.; Christiansen, K.; Clifton-Hadley, R.; (1999). Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, 39, 155–171.
9. Cañedo-Solares, I.; Ortíz-Alegría L.B.; Figueroa-Damian, R.; Bustos-Bahena, M.L.; González-Henkel, H.; Calderon-Segura, E. Et al (2009). Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *Journal of Perinatology*, 29 (10), 668-672.
10. Carruthers, V.B. (2006). Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *Internacional Journal for Parasitology*. 36 (5), 595-600.
11. Cedillo-Peláez, C. (2009). Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre de México. Tesis de Maestría en Ciencias. México, D.F. México.

Universidad Nacional Autónoma de México.

12. Cedillo-Peláez, C., Cañedo-Solares, I., et al. (2012). Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(4), 411–3.
13. Cedillo-Peláez, C.; Rico-Torres, C.P.; Salas-Garrido, C.G.; Correa, D. (2011). Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 180 (3-4), 368–371.
14. Cañedo-Solares, I.; Ortíz-Alegría L.B.; Figueroa-Damian, R.; Bustos-Bahena, M.L.; González-Henkel, H.; Calderón-Segura, E. Et al (2009). Toxoplasmosis in pregnancy: determination of IgM, IgG and avidity in filter paper-embedded blood. *Journal of Perinatology*, 29 (10), 668-672.
15. Correa, D.; Cañedo, I.; Hernández, J.L.; Cobaliase, E. (2001). *Toxoplasma gondii*: un parásito oportunista en: Zoonosis Emergentes y Reemergentes. Bacterias, Parásitos, Virus, Hongos y Priones. Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. (libro electrónico)
16. Correa, D.; Caballero-Ortega, H.; Hernández-Islas, J.L.; Becerra-Torres, E.; Olmedo-Hernández, M. et al. (2009). Toxoplasmosis. En: Froylán Ibarra Velarde, Yolanda Vera Montenegro y Yazmín Alcalá Canto, editores. Parasitología

Veterinaria, Vol.1 Protozoarios. México, 123-130.

17. Cowen, D.; Wolf, A. (1950). Experimental congenital toxoplasmosis. The vagina as a portal of entry of *Toxoplasma* in the mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, 92, 393–402.
18. Darcy, F.; Zenner, L. (1993). Experimental models of toxoplasmosis. *Research in Immunology*, 144, 16–23.
19. Dardè, M.L. (2004). Genetic análisis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*. 40 (1): 57-63.
20. Derouin, F.; Garin, Y.J. (1991). *Toxoplasma gondii*: Blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. *Exp. Parasitol*, 73, 460-468.
21. Derouin, F.; Mazon, M.C.; Garin, Y.J. (1987). Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J.Clin. Microbiology*, 1597-1600.
22. Díaz-Díaz, A.; Aristizábal, B.H. (2013). Métodos tradicionales y moleculares en el diagnóstico y su aplicación en el contexto clínico. Artículo de Revisión. *Medicina U.P.B.*, 32 (1), 54-67.

23. Dubey, J.P.; Shen, S.K. (1991). Rat model of congenital toxoplasmosis. *Infect Immun.* 59 (9), 3301-2.
24. Dubey, J.P. (1996). Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *J. Parasitol*, 82, 951-956.
25. Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press. 2nd Ed. USA.
26. Dubey, J.P.; Jones, J.L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38 (11), 1257-1278.
27. Dubey, J.P.; Quirk, T.; Pitt, J.A.; Velmurugan, G.V.; Kwok, O.C.H.; Leclair, D. et al. (2008). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccons (Procyon lotor), cats (Felis domesticus), striped skunk (Mephitis mephitis), black bear (Ursus americanus) and cougar (Puma concolor) from Canada. *Journal of Parasitology*, 94 (1), 42-45.
28. Dunn, D.; Wallon, M.; Peyron, F.; Petersen, E.; Peckham, C.; Gilbert, R. (1999). Mother to child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*, 353, 1829-33.

29. Dupouy-Camet, J.; Lavareda de Souza, S.; Maslo, C.; Paugam, A.; Saimot, A.G.; Benarous, R.; Tourte-Schaefer, C.; Derouin, F. (1993). Detection of *Toxoplasma gondii* in venous Blood from AIDS patients by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1866-1869.
30. Elvez-Rubinstein, A.; Ajzenberg, D.; Cohen, R.; Dumétre, A.; Yera, H.; Gondon, E. et al. (2009). Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *Journal of infectious diseases*, 199 (2), 280-285.
31. Freyre, A.; Falcón, J.; Méndez, J.; Rodríguez, A.; Correa, L.; González, M.; (2006a). *Toxoplasma gondii*: partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. *Experimental Parasitology*, 112, 8–12.
32. Freyre, A.; Falcón, J.; Méndez, J.; Rodríguez, A.; Correa, L.; González, M. (2006b). Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*, 113, 154–160.
33. Freyre, A.; Fialho, C.G.; Bigatti, L.E.; Falcón, J.; Méndez, J.; González, M. (2009). *Toxoplasma gondii*: congenital transmission in a hamster model. *Experimental Parasitology*, 122, 140–144.

34. Fricker-Hidalgo, H.; Pelloux, H.; Racinet, C.; Grefenstette, I.; Bost-Bru, C.; Goullier-Fleuret, et al. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentas from infected women by Polymerase Chain Reaction, *in vivo* and *in vitro* cultures. *Placenta*, 19, 545-549.
35. Fuentes, I.; Rubio, J.M.; Ramírez, C.; Alvar, J. (2001). Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: Direct analysis from clinical samples. *Journal clinical Microbiology*, 39 (4), 1566-1570.
36. Fux, B.; Ferreira, A.; Cassali, G.; Tafuri, W.L.; Vitor, R.W.; (2000). Experimental toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 121–126.
37. Galván-Ramírez, M.L.; Mondragón-Flores, R. (2001). *Toxoplasmosis Humana*, Ed. Cuellar, México. Primera edición. Capítulo 1. Taxonomía y ultraestructura.
38. Gandahasada, S. (1991). Study on the prevalence of toxoplasmosis in Indonesia: a review. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 22, 93–98.
39. He, N.; Aosai, F.; Luo W-T; Ueda M; Yang, T-H.; Yamashita, K. et al. (1997) Parasite load in pregnant mice infected by *Toxoplasma gondii* assayed by quantitative

competitive-PCR. *Parasitol Int*, 46, 143–147.

40. Heffess, C.S.; Mullick, F.G. (1995). *Métodos histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington, D.C., EU.

41. Hill, D.; Chirukandot, S.; Dubey, J.P. (2005) Biological and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, 6 (1), 41-61.

42. Hitt, J.A.; Filice, G.A. (1992). Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture and mouse inoculation. *J. Clin. Microbiology*, 3181-3184.

43. Hunter, C.A.; Sibley, D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature reviews. Microbiology*, 10 (11), 766-778.

44. Jensen, L.; Heegaard, P.M.; Lind, P.A. (1998) Study of virulence parameters for *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Parasitol. Res.*, 84, 382-387.

45. Jhonson, A.M.; Dubey, J.P.; Dame, J.B. (1986). Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. *Aust. J. Esxo. Biol. Med Sci*, 64, 351-355.

46. Johnson, L.L. (1994). Resistance to *Toxoplasma gondii* in mice infected as

neonates or exposed in utero. *Infect. and Immunity*, 3075-3079.

47. Khan, A.; Jordan, C.; Muccioli, C.; Vallochi, A.L.; Rizzo, L.V.; Belfort, R. et al. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 942–949.
48. Kim, K. (2004). Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Tropica*, 91 (1), 69-81.
49. Kim, K.; Weiss, L.M. (2008). *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes and Infection*, 10 (9), 978-984.
50. Kompalic-Cristo, A.; Frotta, C.; Suárez-Mutis, M.; Fernandes, O.; Britto, C. (2007). Evaluation of a real time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Reserch*, 101 (3), 619–25.
51. Laliberte, J.; Carruthers, V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (12), 1900-1915.
52. Mcleod, R.; Mack, D.; Brown, C. (1991). *Toxoplasma gondii* new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol*, 72, 109-121.

53. Montoya, J.G.; Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363: 1965-1976.
54. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999
55. Petersen, E.; Pollak, A.; Reiter-Owona, I. (2001). Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 31, 115–144.
56. Pezerico, S.B.; Langoni, H.; Da Silva, A.V.; Da Silva, R.C. (2009). Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. *Exp Parasitol*, 123 (2), 168-172.
57. Ramos-Vara, J.A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42, 405-426.
58. Remington, J.; McLeod, S.R.; Thulliez, P.; Desmonts, G. (2006). Toxoplasmosis. In *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, ed. Elsevier Saunders. 947–1091.
59. Rico-Torres, C.P. (2005). Estandarización y validación a nivel laboratorio de una prueba de PCR para la detección directa de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

60. Rico-Torres, C.P.; Figueroa-Damián, R.; López-Candiani, C.; Macías-Avilés, H.A.; Cedillo-Peláez, C.; Cañedo-Solares, I. et al. (2012). Molecular diagnosis and genotyping of cases of perinatal toxoplasmosis in Mexico. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31 (4), 411-413.
61. Rico-Torres, Claudia Patricia; Del Viento-Camacho, Alejandra; Caballero-Ortega, Heriberto; Besné-Mérida, Alejandro; Luna-Pastén, Héctor; Correa Dolores; Palma-García, José Manuel. (2015). First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: tissue distribution and genetic characterization. *Veterinary Parasitology*, doi: 10.1016/j.vetpar.2015.02.004.
62. Roberts, C.W.; Alexander, J. (1992). Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*, 104, 19–23.
63. Saeij, J.P.; Boyle, J.P.; Boothroyd, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*, 21 (10), 476-481.
64. Sambrook, J.; Russell, D. (2001). *Molecular cloning . A laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y.

65. Sibley, L.D. (2003). *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic*. 4 (9), 581-586.
66. Su, C.; Khan, A.; Zhou, P.; Majumdar, D.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.L. et al. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5844–9.
67. Su, C.; Zhang, X.; Dubey, J.P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, 36 (7), 841-848.
68. Sumyuen, M.H.; Garin, Y.J.F.; Derouin, F. (1995). Early Kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain . *J.Parasitol.* 81, 327-329.
69. Suzuki, Y.; Yang, Q.; Remington, J.S. (1995). Genetic resistance against acute Toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol*, 81, 1032-1034.
70. Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30 (12-13), 1217-1258.

71. Vado-Solís, I.A.; Suárez-Solís V.; Jiménez-Delgadillo B.; Zavala-Velázquez, J.E.; Segura-Correa, J.C. (2013). *Toxoplasma gondii* Presence in women with spontaneous abortion in Yucatan, Mexico. *Journal of parasitology*, 99 (2), 383-385.
72. Vela-Amieva, M.; Cañedo-Solares, I.; Gutiérrez-Castrejón, P.; Pérez-Andrade, M.; González- Contreras, C. et al. (2005). Short report: Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii*. *Congenital Infection in Mexico. Am J Trop Med Hyg*, 72 (2), 142-144.
73. Velasco-Castrejón, O.; Salvatierra-Izaba, B.; Valdespino, J.L.; Sedano-Lara, A.M.; Calindo-Virgen, S.; Magos, C. et al. (1991). Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. *Sal. Púb.Méx*, 34, 222-229.
74. Wang, T.; Liu, M.; Xiao-Jie, G.; Zhi-Jun, Zhao.; Xiao-Guang, C.; Zhao-Rong, L. (2010). *Toxoplasma gondii*: The effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Experimental Parasitolog.* doi:10.1016/j.exppara.2010.07.003
75. Wong, S.Y.; Remington, J.S. (1994). Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin. Infect. Dis*, 18, 853-862.